

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192401 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.30

(51) Int. Cl. A61K 39/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.27

(54) ОПТИМИЗИРОВАННЫЙ БЕСКЛЕТОЧНЫЙ СИНТЕЗ ПЛАЗМИДНОГО АНТИГЕНА ИНВАЗИИ В И РОДСТВЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/828,364

(32) 2019.04.02

(33) US

(86) PCT/US2020/025384

(87) WO 2020/205584 2020.10.08

(71) Заявитель:
ВАКСАЙТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Капур Нираджд, Фэйрман Джеффери
(US)

(74) Представитель:

Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Костюшенкова
М.Ю., Строкова О.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрен бесклеточный способ синтеза антигена, представляющего собой плазмидный антиген инвазии В (IpaB), ассоциированного с бактерией рода *Shigella*, включающий экзогенное добавление очищенного белка-шаперона IpgC к смеси, полученной посредством бесклеточного синтеза. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены мутантные варианты антигена IpaB, содержащие неприродные аминокислоты, включенные во время бесклеточного синтеза, обеспечивающие ковалентное конъюгирование с полисахаридом О-антигена *Shigella*. Дополнительно предусмотрены антигены IpaB и их конъюгаты, а также иммуногенные композиции, полученные с использованием синтезированных антигенов IpaB и их конъюгатов, и способы применения.

A1

202192401

202192401

A1

ОПТИМИЗИРОВАННЫЙ БЕСКЛЕТОЧНЫЙ СИНТЕЗ ПЛАЗМИДНОГО АНТИГЕНА ИНВАЗИИ В И РОДСТВЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/828364, поданной 2 апреля 2019 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки со всей своей полноте.

ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Перечень последовательностей, ассоциированный с настоящей заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной версии и включен в данный документ посредством ссылки в описании. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, представляет собой STRO_007_01WO_ST25.txt. Текстовый файл имеет размер 37,6 кб, был создан 27 марта 2020 г. и представлен в электронном виде с помощью EFS-Web.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится, как правило, к предупреждению и лечению дизентерии, вызванной *Shigella* с высокими значениями выхода, и более конкретно, относится к способам синтеза антигена *Shigella* и к иммуногенным композициям, полученным с использованием указанных антигенов *Shigella*.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Шигеллез или дизентерия, вызванная *Shigella*, вызваны инвазией бактерий рода *Shigella* в эпителиальные клетки толстой кишки. Дизентерия, вызванная *Shigella*, вносит значительный вклад в смертность детей первого года жизни во многих регионах мира и также вызывает вспышки эпидемий среди социальных работников и других путешественников. Известно более 40 серотипов *Shigella*, классифицированных на основе разнообразия полисахаридов О-антигена. Считается, что *S. flexneri* и *S. dysentery* представляют собой агенты, главным образом ответственные за эндемическую и эпидемическую дизентерию (Arabshahi et al. (2018) *Bioengineered* 9(1):170-177).

[0005] В области техники существует потребность в композициях и способах, подходящих для лечения и предупреждения инфекции, вызванной *Shigella*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0006] В настоящем изобретении предусмотрены способы и композиции для решения этих проблем, таким образом предусмотрены иммуногенные композиции конъюгатов IpaB и способы применения в предупреждении и лечении инфекций, вызванных *Shigella*.

[0007] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен полипептидный антиген, представляющий собой плазмидный антиген инвазии В (IpaB), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту (npAA), включенную в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB, где npAA включена в положении, выбранном из K241, K262, K269, K283, K289, K299, C309, K312, S329, S333, D347, E360, K368, E372, K376, D380, K384, E387, D392, K394, K395, K397, K424, K429, K436, K440, K448, K451, K470 и K482 SEQ ID NO: 1.

[0008] В некоторых вариантах осуществления npAA включена в положении, выбранном из K289, K299, K368, K395, K436 и K470. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит npAA, включенную в каждом из положений K289, K368 и K395 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0009] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит npAA, включенную в каждом из положений K299, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0010] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит npAA, включенную в каждом из положений K299, K368 и K395 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

[0011] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K289, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

[0012] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K299, K395, K436 и K470 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0013] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K299, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

[0014] В некоторых вариантах осуществления ppAA содержит клик-химическую реакционноспособную группу. В некоторых вариантах осуществления ppAA выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления ppAA представляет собой pAMF.

[0015] В некоторых вариантах осуществления антиген IpaB конъюгирован с полисахаридом О-антигена *Shigella* (OPS). В некоторых вариантах осуществления OPS выбран из серотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7a, 7b или их комбинаций.

[0016] В некоторых вариантах осуществления полипептид IpaB является очищенным.

[0017] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена иммуногенная композиция, содержащая антиген IpaB, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно вспомогательное вещество. В

некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно вспомогательное вещество выбрано из сред-носителей, растворителей, эмульгаторов, стабилизаторов, консервантов, изотонических средств, буферных систем, диспергирующих веществ, разбавителей, модификаторов вязкости и усилителей поглощения. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена в виде стерильного раствора для инъекций. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена в лиофилизированной форме.

[0018] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ экспрессии полипептидного антигена, представляющего собой плазмидный антиген инвазии В (IpaB), из бактерии рода *Shigella*, включающий экспрессию полипептидного антигена IpaB с применением бесклеточного синтеза белка в присутствии экзогенного белка-шаперона IpgC. В некоторых вариантах осуществления бактерия рода *Shigella* включает виды *Shigella*, выбранные из *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. Boydii* и *S. sonnei*.

[0019] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной с последовательностью полипептидного антигена IpaB дикого типа из бактерии рода *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

[0020] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна неприродная аминокислота (nnAA) включена в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 nnAA включены в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB. В некоторых вариантах осуществления от 2 до 10 nnAA включены в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB. В некоторых вариантах осуществления nnAA включена в одном или нескольких положениях, выбранных из K241, K262, K269, K283, K289, K299, C309, K312, S329, S333, D347,

E360, K368, E372, K376, D380, K384, E387, D392, K394, K395, K397, K424, K429, K436, K440, K448, K451, K470 и K482 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления ппАА включена в положения, выбранном из K289, K299, K368, K395, K436 и K470.

[0021] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K289, K368 и K395 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0022] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0023] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K368 и K395 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

[0024] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K289, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

[0025] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K395, K436 и K470 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0026] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

[0027] В некоторых вариантах осуществления ппАА выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой

кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления ppAA представляет собой pAMF.

[0028] В некоторых вариантах осуществления белок-шаперон IrgC содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 95% идентичной с SEQ ID NO: 8.

[0029] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает очистку полипептидного антигена IраВ. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IраВ очищают способом, который обеспечивает присутствие по сути всего антигена в димерной форме в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген очищают в присутствии детергента, эффективного для разрушения белка-шаперона IrgC без существенного влияния на полипептидный антиген IраВ. В некоторых вариантах осуществления детергент представляет собой лаурилдиметиламиноксид (LDAO). В некоторых вариантах осуществления LDAO присутствует в количестве 0,1% об./об. или меньше.

[0030] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен очищенный антиген IраВ, полученный с помощью способов, описанных в данном документе.

[0031] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*, включающий введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенной композиции, описанной в данном документе, для иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенной композиции, описанной в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*.

[0032] В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию вводят в виде внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию вводят трансмукозально. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию вводят однократно. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию вводят два или более раз. В некоторых вариантах осуществления субъект у субъекта проявляются симптомы дизентерии, вызванной *Shigella*, и иммуногенную композицию вводят в качестве терапевтической вакцины.

[0033] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения риска развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*, при этом способ, включает введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенной композиции, описанной в данном документе, для снижения риска развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенной композиции, описанной в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для снижения риска развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет по меньшей мере один фактор риска развития дизентерии, вызванной *Shigella*.

[0034] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ индуцирования защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella* у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенной композиции, описанной в данном документе, для индуцирования у субъекта защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенной композиции, описанной в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для индуцирования у субъекта защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0035] На ФИГ. 1 схематически показана роль плазмидного антигена инвазии IpaB в секреторной системе типа 3 бактерии рода *Shigella*.

[0036] На ФИГ. 2 указаны уровни экспрессии IpaB, синтезированного с применением бесклеточной системы экспрессии белка при повышенных концентрациях pDNA IpaB, как описано в примере 1.

[0037] На ФИГ. 3 указаны уровни экспрессии IpaB, синтезированного с применением бесклеточной системы экспрессии белка с титрованной pDNA IpgC, как описано в примере 2.

[0038] На ФИГ. 4 указаны уровни экспрессии IpaB, синтезированного с применением бесклеточной системы экспрессии белка при повышенных концентрациях очищенного белка IpaB, добавленного экзогенно к смеси, полученной посредством бесклеточного синтеза, как описано в примере 3.

[0039] На ФИГ. 5 показан анализ вестерн-блот, отражающий эффект экзогенного добавления увеличенного количества очищенного IpgC на выход растворимого IpaB, как описано в примере 4.

[0040] На ФИГ. 6А, 6В и 6С также показаны результаты, полученные в примере 4. На ФИГ. 6А показаны столбчатая диаграмма и автордиограмма, демонстрирующие эффект экзогенного добавления увеличенного количества очищенного IpgC на выход растворимого IpaB, подтверждая результаты, показанные на ФИГ. 5. На ФИГ. 6В показан анализ SDS-PAGE фракций элюирования с применением колонки для аффинной хроматографии HisTrap, демонстрирующий относительные количества IpaB и IpgC, присутствующие до и после промывания с помощью детергента. На ФИГ. 6С показаны результаты анализа SEC-MALS структуры очищенного IpaB в растворе.

[0041] На ФИГ. 7 схематически показаны результаты сайт-направленного сканирующего мутагенеза и анализ экспрессии, демонстрирующие сайт, в которых неприродная аминокислота pAMF эффективно включена, как объяснено в примере 5.

[0042] На ФИГ. 8 показаны результаты, полученные после бесклеточного синтеза IpaB с pAMF, включенной во множество сайтов, как также описано в примере 5.

[0043] На ФИГ. 9 указана экспрессия мутантных вариантов IpaB, содержащих 3- и 4-pAMF, посредством мечения с помощью TAMRA и посредством окрашивания с помощью Safe Blue.

[0044] На ФИГ. 10 указан средний молекулярный вес мутантных вариантов IpaB после конъюгации.

[0045] На ФИГ. 11 показано сравнение реактивности сыворотки человека с IpaB, мутантными вариантами IpaB и конъюгатами IpaB-OPS.

[0046] На ФИГ. 12A – ФИГ. 12B показаны эффекты активной иммунизации IpaB, конъюгатами IpaB-OPS и конъюгатами CRM-OPS после проверочного заражения *S. flexneri 2a*. На ФИГ. 12A показан процент выживаемости. На ФИГ. 12B показаны титры антител, измеренные посредством ELISA.

[0047] На ФИГ. 13A – ФИГ. 13E показаны дополнительные результаты после иммунизации IpaB, конъюгатами IpaB-OPS и конъюгатами CRM-OPS после проверочного заражения *S. flexneri 2a*. На ФИГ. 13A показаны изменения веса с течением времени. На ФИГ. 13B показаны оценки активности с течением времени. На ФИГ. 13C показаны оценки положения с течением времени. На ФИГ. 13D показаны оценки дегидратации с течением времени. На ФИГ. 13E показано состояние шерсти с течением времени.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Обзор

[0048] Шигеллез остается серьезным и распространенным заболеванием. Шигеллы не только вызывают водянистую диарею, а также представляют собой главную причину дизентерии (лихорадка, судороги и кровь и/или слизь в кале). В основном не оценено то, что дизентерия, а не водянистая диарея, замедляет рост у детей.

[0049] Хотя было обнаружено, что *Shigella dysenteriae* типа 1 является причиной эпидемической дизентерии в Японии в 1898 г., не существует ни разрешенной к применению вакцины для нее, ни согласия относительно механизма(механизмов) иммунитета хозяина к *Shigella*. Разработке вакцины препятствовали четыре фактора: (i) неэффективность парентерально инъецированных

инактивированных цельноклеточных вакцин, которая приводила к убеждению, что сывороточные антитела не вызывают иммунитет; (ii) отсутствие подходящей экспериментальной модели на животном; (iii) только косвенное доказательство иммунного(иммунных) механизма(механизмов) у людей; и (iv) проблемы в отношении экспрессии антигенов *Shigella* в традиционных клеточных системах экспрессии, значительно препятствующие коммерческому промышленному масштабированию для производства конкурентоспособных кандидатных вакцин.

[0050] Инвазия *Shigella* в эпителиальные клетки является независимой от продуктов области 31 т.н. на 230 т.н. плазмиды вирулентности, которая содержит оперон *ipa*, который кодирует главные мишени иммунного ответа хозяина, гены *mxi* и *sra*, продукты которых составляют систему секреции 3 типа (T3SS), необходимую для правильного распределения белков Ipa, и *virG* (*icsA*), который кодирует поверхностный белок, который направляет внутриклеточное движение бактерии (Picking et al. (1996) *Protein Expression and Purification* 8:401-408). Три белка, кодируемые с помощью плазмиды вирулентности *S. flexneri*., определили в качестве важных эффекторов процесса клеточной инвазии: антигены плазмидной инвазии (Ipa) B, C и D.

[0051] Плазмидный антиген инвазии B («IpaB»), белок с массой 62 кДа, также упоминаемый как инвазин IpaB, представляет собой порообразующий компонент, присутствующий на дистальном кончике аппарата с молекулярным шприцем в контексте T3SA. Функционально IpaB способствует образованию пор и последующей секреции токсинов и факторов вирулентности в клетках-хозяевах, что отчасти опосредует воспаление кишечника и кровавую диарею, ассоциированную с дизентерией, вызванной *Shigella*. Было показано, что вакцинация против IpaB являлась высоко иммунной при контролируемых бактериальных инфекциях на мышинных моделях *Shigella*, и было показано, что специфичные к IpaB антитела отрицательно коррелировали с тяжестью шигеллеза у людей. См., например, Martinez-Becerra et al. (2012) *Infect. Immun.* 80(3):1222-1231; Martinez-Becerra et al. (2013) *Infect. Immun.* 81(12):447-4477 и Shimanovich et al. (2017) *Clin. Vaccine Immunol.* 24(2). Несмотря на огромный потенциал, применение IpaB в качестве сильнодействующей кандидатной вакцины ограничивалось низким уровнем

экспрессии антигена в традиционных клеточных гетерологичных системах экспрессии.

[0052] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют значение общепринятое для специалиста в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Специфическая терминология, характеризующаяся особой важностью в отношении описания настоящего изобретения, определяется ниже. В этом описании и прилагаемой формуле настоящего изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекст явно не указывает иное. Таким образом, например, термин «полипептид» относится не только к одному полипептиду, но также и к комбинации двух или более различных полипептидов, которые могут быть или могут не быть комбинированными, «адъювант» относится к одному адъюванту, а также к двум или более адъювантам, которые могут использовать отдельно или комбинировать в одну композицию, и т. п.

Синтез антигена IpaB

[0053] Известно, что способность *Shigella* колонизировать клетку-хозяина требует наличия T3SS, системы, которая позволяет бактериальным белкам перемещаться в клетки-хозяев для изменения функции клеток в пользу патогена. *Shigella* и определенные другие грам-отрицательные бактериальные организмы характеризуются наличием аппарата секреции типа 3 (T3SA), закрепленного в бактериальной оболочке с помощью основы или базального тела, из которого выходит игла, связанная с основой с помощью внутреннего стержня. Белки T3SA включают структурные белки, которые составляют основу, внутренний стержень и иглу; эффекторные белки, которые секретируются в клетку-хозяина или иным образом участвуют в процессах способствования инфекции и/или подавления защиты клеток-хозяев; и белки-шапероны, которые связывают эффекторный белок в бактериальной цитоплазме, защищают их от разрушения и агрегации и направляют их к комплексу иглы для инъекции в клетку-хозяина. В настоящем контексте IpaB характеризуется в качестве эффекторного белка, так как он служит для способствования формирования пор в мембране клетки-хозяина и таким образом облегчения секреции токсинов и факторов вирулентности в клетку-хозяина. Белок-

шаперон, применяемый в данном документе для повышения уровня экспрессии IpaB при бесклеточном синтезе белка (CFPS), представляет собой IpgC.

[0054] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ синтеза антигена IpaB с применением масштабируемого бесклеточного синтеза белка (CFPS), как описано в патенте США № 9040253, патенте США № 9650621 и Murray et al. (2013) *Current Opin. Chem. Biol.* 17(3): 420-26, все из которых включены посредством ссылки в данный документ. Способ оптимизирован для обеспечения усиленной экспрессии антигена IpaB при уровне, составляющем по меньшей мере 200 мкг/мл, таком как по меньшей мере 400 мкг/мл, по меньшей мере 600 мкг/мл или выше, включая диапазоны уровней экспрессии от 200 мкг/мл до 800 мкг/мл, от 200 мкг/мл до 700 мкг/мл, от 200 мкг/мл до 650 мкг/мл, от 200 мкг/мл до 600 мкг/мл, от 400 мкг/мл до 800 мкг/мл, от 400 мкг/мл до 700 мкг/мл, от 400 мкг/мл до 650 мкг/мл, от 400 мкг/мл до 600 мкг/мл и т.п. Способ включает экзогенное добавление IpgC к системе CFPS, белка-шаперона T3SS для IpaB, который характеризовался в литературе как характеризующийся связывающим взаимодействием IpaB/IpgC. См. Birket et al. (2007) *Biochemistry* 46:8128-37; and Lokareddy et al. (2010) *J. Biol. Chem.* 285(51): 39965-75. Вышеупомянутые уровни экспрессии антигена IpaB резко контрастируют с выходами IpaB, упомянутыми в литературе; Picking et al. (1996) *Protein Expression and Purification* 8:401-408, например, при достижении выходов от 2 мг до 4 мг на 1,6 л, эквивалентных только от 1,25 мкг/мл до 2,5 мкг/мл.

[0055] Способ может характеризоваться как улучшенный способ экспрессии полипептидного антигена с применением бесклеточного синтеза белка, где улучшение включает синтез антигена IpaB в присутствии экзогенно добавленного, очищенного белка-шаперона IpgC, т.е. IpgC добавлен в смесь CFPS. Как установлено в примерах в данном документе, добавление IpgC к смеси, полученной посредством бесклеточного синтеза, значительно повышает получаемый уровень экспрессии IpaB относительно бесклеточного синтеза IpaB при отсутствии IpgC и, определенно, учитывая экспрессию антигена в традиционных клеточных гетерологичных системах экспрессии, как отмечалось выше. В некоторых вариантах осуществления белок-шаперон IpgC содержит аминокислотную последовательность, которая является на по

меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность белка-шаперона IrgC содержит SEQ ID NO: 8 или состоит из нее.

Антигены IраВ

[0056] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полипептидные антигены IраВ, синтезированные в соответствии со способами, описанными в данном документе. Термин «полипептид» предназначен для включения любой структуры, содержащей одну или более аминокислот, и таким образом включает дипептиды, олигопептиды, полипептиды, полипептидные фрагменты или белки. Аминокислоты, формирующие весь полипептид или его часть, могут представлять собой любую из двадцати традиционных, встречающихся в природе аминокислот, т. е. аланина (А), цистеина (С), аспарагиновой кислоты (D), глутаминовой кислоты (Е), фенилаланина (F), глицина (G), гистидина (H), изолейцина (I), лизина (K), лейцина (L), метионина (M), аспарагина (N), пролина (P), глутамина (Q), аргинина (R), серина (S), треонина (T), валина (V), триптофана (W) и тирозина (Y), а также нетрадиционных аминокислот, таких как изомеры или модификации традиционных аминокислот, например, D-аминокислот, небелковых аминокислот, аминокислот, подвергшихся посттрансляционной модификации, аминокислот, модифицированных ферментативным путем, β -аминокислот, конструкций или структур, предназначенных для имитации аминокислот (например, α,α -двухзамещенных аминокислот, N-алкил аминокислоты, молочной кислоты, β -аланина, нафтилаланина, 3-пиридилаланина, 4-гидроксипролина, O-фосфосерина, N-ацетилсерина, N-формилметионина, 3-метилгистидина, 5-гидроксилизина и норлейцина), и других нетрадиционных аминокислот, описанных, например, в патенте США № 5679782 для Rosenberg et al. Полипептиды, описанные в данном документе, могут включать одну или более неприродных аминокислот, несущих функциональную группу, которая делает возможным конъюгирование с вторичным антигеном, например, полисахаридом. Полипептиды могут быть (a) природными, (b) полученными посредством химического синтеза, (c) полученными с помощью технологии рекомбинантной ДНК, (d) полученными посредством биохимической или ферментативной фрагментации больших молекул, (e) полученными с помощью

способов, полученных в результате комбинации способов (a) с помощью (d) перечисленных выше или (f) полученных любыми другими способами для получения пептидов, такими как бесклеточный синтез белка, описанный ниже.

[0057] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность, по сути гомологичную последовательности антигена IpaB дикого типа из бактерии рода *Shigella*, такой как *S. dysenteriae* (UniProt ID: Q03945), *S. flexneri* (UniProt ID: P18011), *S. boydii* (UniProt ID: Q8KXT4) или *S. sonnei* (UniProt ID: Q3YTQ2). В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 99% или 100% идентичной с последовательностью полипептидного антигена IpaB дикого типа из бактерии рода *Shigella*.

[0058] Термины «идентичность последовательностей», «процент гомологии последовательностей» и «гомология последовательностей» в контексте полипептидной последовательности относятся к двум или более последовательностям, которые являются такими же или характеризуются установленным процентом аминокислотных (или нуклеотидных) остатков, которые являются такими же при сравнении и выравнивании для максимального соответствия по заданной длине (окно сравнения), как измерено с применением алгоритма сравнения последовательностей, например, BLASTP или алгоритма поиска гомологий Смита-Уотермана. В настоящем контексте процент гомологии последовательностей можно определить по всей длине полипептида или только по части. Один способ подсчета процента гомологии последовательностей представляет собой программу BLASTP, характеризующуюся по умолчанию установленными длиной слова (W), составляющей 3, ожиданием (E) 10 и матрицей замен BLOSUM62; см., например, Henikoff et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915. Для иллюстративного определения выравнивания последовательностей и % идентичности последовательностей применяют программы BESTFIT или GAP в пакете GCG Wisconsin Software (Accelrys, Мадисон, Висконсин) с применением предоставленных параметров по умолчанию. Если эти предпочтительные способы расчета

идентичности последовательностей дают различные количества, контроль осуществляют посредством способа, обеспечивающего более высокую идентичность последовательностей. Термин «по сути гомологичный» относится к проценту гомологии последовательностей по заданной длине (например, «х» аминокислоты полипептида) составляющему по меньшей мере 50%, таким образом в том числе, например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% и 100%.

[0059] Полная последовательность полипептидного антигена IраВ дикого типа из *S. flexneri*, представляющего собой белок массой 62160 Да, содержащий 580 аминокислотных остатков, представлена под SEQ ID NO: 1. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IраВ является на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 100% идентичным с SEQ ID NO: 1.

[0060] Полипептидный антиген IраВ может представлять собой полноразмерный белок IраВ или часть белка IраВ при условии, что выбранная часть способствует образованию полипептидного фрагмента, который обладает способностью генерировать терапевтический или профилактический иммуногенный ответ на инфекцию, вызванную бактерией рода *Shigella*. Как правило, эти иммуногенные части или фрагменты целого белка состоят из по меньшей мере 20 аминокислотных остатков в длину. При условии, что сохраняются требуемые иммуногенные свойства, длина полипептидного антигена IраВ является вопросом выбора схемы и может составлять по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аминокислотных остатков, включая полную длину белка, но не превышая ее. Полипептидный антиген IраВ может не представлять собой точную копию нативного белка, которому он соответствует. Например, N-концевой метионил, который можно рассматривать в качестве находящегося вне последовательности антигена IраВ для расчета максимального процента идентичности или гомологии, часто присутствует из-за добавления иницирующего кодона. Добавления, делеции и замены (часто консервативные замены) могут также происходить при сохранении пригодных иммуногенных свойств. Регулярное тестирование на животных и людях

может легко демонстрировать, генерирует ли полипептидный антиген IpaB, синтезированный, как описано в данном документе, терапевтический или профилактический иммуногенный ответ на инфекцию, вызванную бактерией рода *Shigella*.

[0061] После бесклеточного синтеза антигена IpaB в присутствии шаперона IrgC антиген IpaB можно легко очищать посредством нанесения смеси, полученной посредством синтеза CFPS, на подходящую колонку для аффинной хроматографии (например, колонку для аффинной хроматографии HisTrap) и промывания детергентом. Детергент должен быть выбран таким образом, чтобы он преимущественно вызывал разрушение IrgC, но не влиял на IpaB. Способ предусматривает по сути все из антигенов IpaB в димерной форме в водном (например, буферном) растворе, как объяснено в примере 4 и показано на ФИГ. 6С. Один пример подходящего детергента представляет собой лаурилдиметиламиноксид (LDAO), хотя можно выбрать другие функционально эквивалентные детергенты, как будет понятно специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления LDAO присутствует в концентрации 0,1% об./об. или меньше. Например, в некоторых вариантах осуществления LDAO присутствует в концентрации приблизительно 0,001% об./об., приблизительно 0,002% об./об., приблизительно 0,003% об./об., приблизительно 0,004% об./об., приблизительно 0,005% об./об., приблизительно 0,006% об./об., приблизительно 0,007% об./об., приблизительно 0,008% об./об., приблизительно 0,009% об./об., приблизительно 0,01% об./об., приблизительно 0,02% об./об., приблизительно 0,03% об./об., приблизительно 0,04% об./об., приблизительно 0,05% об./об., приблизительно 0,06% об./об., приблизительно 0,07% об./об., приблизительно 0,08% об./об., приблизительно 0,09% об./об. или приблизительно 0,1% об./об.

[0062] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен очищенный полипептидный антиген IpaB. Как применяется в данном документе, когда термин «очищенный» применяют со ссылкой на молекулу, это значит, что концентрация очищаемой молекулы увеличилась относительно концентрации молекулы в ее природной окружающей среде. Термин может также относиться к очищению химически синтезированной молекулы из реакционной смеси,

в которой молекулу получали в качестве продукта реакции. Как применяется в данном документе, когда термин «выделенный» применяют со ссылкой на молекулу, термин означает, что концентрация очищаемой молекулы увеличилась относительно концентрации молекулы в ее природной среде. Например, полинуклеотид или полипептид, естественно присутствующий в живом организме, не является «выделенным», но такой же полинуклеотид или полипептид, отделенный от сосуществующих материалов в их естественном состоянии, является «выделенным». Выделенный фрагмент, независимо от того, выделен ли он из естественной среды или из неестественной среды (например, рекомбинантная экспрессия, бесклеточная экспрессия, химический синтез и т. д.), является предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 1% чистым, на 5% чистым, на 10% чистым, на 20% чистым, на 30% чистым, на 40% чистым, на 50% чистым, на 60% чистым, на 70% чистым, на 80% чистым, на 90% чистым, на 95% чистым или на 99% чистым, или они могут быть на 100% чистыми. Применяемый в данном документе термин «% чистоты» указывает на процент композиции, которая состоит из молекулы, представляющей интерес, по весу.

Включение ппАА в антиген IраВ

[0063] В некоторых вариантах осуществления остатки неприродных аминокислот («ппАА») включают в антиген IраВ во время бесклеточного синтеза. Способ, применяемый для включения остатков ппАА во время CFPS, детально описан в патентной публикации США № 2018/0333484 A1 (SutroVax, Inc.), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Целью включения ппАА является обеспечение химической «ручки» на антигене IраВ, которая облегчает ковалентное конъюгирование с полисахаридом О-антигена *Shigella* (OPS), предпочтительно посредством «клик-химической» реакции (такой, которая происходит между азид-функционализированной ппАА, такой как 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановая кислота или «pAMF», и алкин-функционализированным полисахаридом). Синтез CFPS ппАА-замещенного антигена IраВ описан в примере 5.

[0064] В некоторых вариантах осуществления одна или более ппАА содержат клик-химическую реакционноспособную группу. В данном документе «клик-

химическая реакционноспособная группа» относится к фрагменту, такому как азид или алкин, способному вступать в клик-химическую реакцию со второй клик-химической реакционноспособной группой. В некоторых вариантах осуществления одна клик-химическая реакционноспособная группа реагирует со второй клик-химической реакционноспособной группой для формирования замещенного триазола. Примеры этого типа клик-реакций можно найти, например, в международной публикации PCT № WO 2018/126229. Общие примеры безметалловых клик-реакций, применяемых в случаях биомедицинских применений, можно найти, например, в Kim, *et al.*, *Chemical Science*, 2019, 10, 7835-7851. Примеры ппАА, содержащих клик-химическую реакционноспособную группу, включают (4-азидофенил)пропановую кислоту (pAF), 2-амино-4-азидобутановую кислоту, 2-азидо-3-фенилпропионовую кислоту, 2-амино-3-азидопропановую кислоту, 2-амино-3-(4-азидометил)фенил)пропановую кислоту (pAMF), 2-амино-3-(5-азидометил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(4-азидометил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(6-азидометил)пиридин-3-ил)пропановую кислоту и 2-амино-5-азидопентановую кислоту.

[0065] В некоторых вариантах осуществления одна или более ппАА включены в последовательность полипептидного антигена IpaB. В некоторых вариантах осуществления от 2 до 10 ппАА включены в последовательность полипептидного антигена IpaB. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 ппАА включены в последовательность полипептидного антигена IpaB. В некоторых вариантах осуществления сайты, на которых включена ппАА, выбраны из K241, K262, K269, K283, K289, K299, C309, K312, S329, S333, D347, E360, K368, E372, K376, D380, K384, E387, D392, K394, K395, K397, K424, K429, K436, K440, K448, K451, K470 и K482 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления сайты, на которых включена ппАА, выбраны из K289, K299, K368, K395, K436 и K470. Описание ппАА, включенной в конкретный сайт, относится к замене указанной аминокислоты в указанном положении ппАА. Например, включение ппАА в

положении K289 значит, что остаток лизина, присутствующий в положении 289, заменен nnAA.

[0066] Аминокислотные последовательности иллюстративных полипептидных антигенов IpaB, содержащих одну или более nnAA, представлены ниже в таблице 1. X = сайт включения nnAA

Таблица 1. Иллюстративный антиген IpaB

Антиген IpaB	Последовательность	SEQ ID
IpaB дикого типа	MHNVNTTTTGLSLAKILASTELGDNTIQAGNDAAN KLFSLTADLTANKNINTTNAHSTSNILIPELKAPKSL NASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQ ARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEEKQINKLKN ADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPDSPKSKLSREEIQ LTIKKDAAVKDRTLIEQKTLHSKSLTDKSMQLEKEI DSFSAFSNTASAEQLSTQQKSLTGLASVTQLMATFIQ LVGKNNEESLKNDLALFQSLQESRKTEMERKSDEY AAEVRKAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAF SGGASLALADVGLALMVTDIVQAATGNSFMEQAL NPIMKAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVDSKKAKMI GSILGAIAGALVLVAADVVLVATVGKQAAAKLAENI GKIIGKTLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVARNKFL GAAGDEVISKQIISTHLNQAVLLGESVNSATQAGGS VASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIE KFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQT A	1
Мутантный вариант IpaB 1 K289/K368/K395	MHNVNTTTTGLSLAKILASTELGDNTIQAGNDAAN KLFSLTADLTANKNINTTNAHSTSNILIPELKAPKSL NASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQ ARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEEKQINKLKN ADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPDSPKSKLSREEIQ LTIKKDAAVKDRTLIEQKTLHSKSLTDKSMQLEKEI DSFSAFSNTASAEQLSTQQKSLTGLASVTQLMATFIQ LVGKNNEESLKNDLALFQSLQESRKTEMERXSDEY AAEVRKAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAF SGGASLALADVGLALMVTDIVQAATGNSFMEQAL NPIMXAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVDSKXAKMI GSILGAIAGALVLVAADVVLVATVGKQAAAKLAENI GKIIGKTLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVARNKFL GAAGDEVISKQIISTHLNQAVLLGESVNSATQAGGS VASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIE KFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQT A	2
Мутантный	MHNVNTTTTGLSLAKILASTELGDNTIQAGNDAAN	3

Антиген IpaB	Последовательность	SEQ ID
вариант IpaB 2 K299/K395/K436	KLFSLTIADLTANKNINTTNAHSTSNILIPELKAPKSL NASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQ ARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEEKQINKLKN ADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPDSPPEKKKLSREEIQ LTIKKDAAVKDRTLIEQKTLSTHHSKSLTDKSMQLEKEI DSFSAFSNTASAEQLSTQQKSLTGLASVTQLMATFIQ LVGKNNEESLKNDLALFQSLQESRKTEMERKSDEY AAEVRXAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAF SGGASLALADVGLALMVTDAIVQAATGNSFMEQAL NPIMKAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVDSKXAKMI GSILGAIAGALVLVAADVVLVATVGKQAAAKLAENI GXIIGKTLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVARNKFL GAAGDEVISKQIISTHLNQAVLLGESVNSATQAGGS VASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIE KFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQT A	
Мутантный вариант IpaB 3 K299/K368/K395	MHNVNNTTTTGLSLAKILASTELGDNTIQAGNDAAN KLFSLTIADLTANKNINTTNAHSTSNILIPELKAPKSL NASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQ ARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEEKQINKLKN ADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPDSPPEKKKLSREEIQ LTIKKDAAVKDRTLIEQKTLSTHHSKSLTDKSMQLEKEI DSFSAFSNTASAEQLSTQQKSLTGLASVTQLMATFIQ LVGKNNEESLKNDLALFQSLQESRKTEMERKSDEY AAEVRXAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAF SGGASLALADVGLALMVTDAIVQAATGNSFMEQAL NPIMXAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVDSKXAKMI GSILGAIAGALVLVAADVVLVATVGKQAAAKLAENI GKIIGKTLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVARNKFL GAAGDEVISKQIISTHLNQAVLLGESVNSATQAGGS VASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIE KFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQT A	4
Мутантный вариант IpaB 4 K289/K368/K395/K436	MHNVNNTTTTGLSLAKILASTELGDNTIQAGNDAAN KLFSLTIADLTANKNINTTNAHSTSNILIPELKAPKSL NASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQ ARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEEKQINKLKN ADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPDSPPEKKKLSREEIQ LTIKKDAAVKDRTLIEQKTLSTHHSKSLTDKSMQLEKEI DSFSAFSNTASAEQLSTQQKSLTGLASVTQLMATFIQ LVGKNNEESLKNDLALFQSLQESRKTEMERXSDEY AAEVRKAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAF SGGASLALADVGLALMVTDAIVQAATGNSFMEQAL NPIMXAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVDSKXAKMI GSILGAIAGALVLVAADVVLVATVGKQAAAKLAENI	5

Антиген IpaB	Последовательность	SEQ ID
	G <u>X</u> IIGKTLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVVARLNKFLGAAGDEVISKQIISTHLNQAVLLGESVNSATQAGGSVASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIEKFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQTTA	
Мутантный вариант IpaB 5 K299/K395/K436/K470	MHNVNTTTTGLSLAKILASTELGDNTIQAGNDAANKLFSLTIADLTANKNINTTNAHSTSNILIPELKAPKSLNASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEEKQINKLKNADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPDSPPEKKKLSREEIQLTIKKDAAVKDRTLIEQKTLSEHSKLTDKSMQLEKEIDSFSAFSNTASAEQLSTQQKSLTGLASVTQLMATFIQLVGKNNEESLKNLALFQSLQESRKTEMERKSDEYAAEVR <u>X</u> AEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAFSGGASLALADVGLALMVTDAIVQAATGNSFMEQALNPIMKAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVDSK <u>X</u> AKMIGSILGAIAGALVLVAADVVLVATVGKQAAAKLAENIG <u>X</u> IIGKTLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVVARLN <u>X</u> FLGAAGDEVISKQIISTHLNQAVLLGESVNSATQAGGSVASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIEKFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQTTA	6
Мутантный вариант IpaB 6 K299/K368/K395/K436	MHNVNTTTTGLSLAKILASTELGDNTIQAGNDAANKLFSLTIADLTANKNINTTNAHSTSNILIPELKAPKSLNASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEEKQINKLKNADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPDSPPEKKKLSREEIQLTIKKDAAVKDRTLIEQKTLSEHSKLTDKSMQLEKEIDSFSAFSNTASAEQLSTQQKSLTGLASVTQLMATFIQLVGKNNEESLKNLALFQSLQESRKTEMERKSDEYAAEVR <u>X</u> AEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAFSGGASLALADVGLALMVTDAIVQAATGNSFMEQALNPIM <u>X</u> AVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVDSK <u>X</u> AKMIGSILGAIAGALVLVAADVVLVATVGKQAAAKLAENIG <u>X</u> IIGKTLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVVARLNKFLGAAGDEVISKQIISTHLNQAVLLGESVNSATQAGGSVASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIEKFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQTTA	7

[0067] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K289, K368 и K395 SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB

содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K299, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0068] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K299, K368 и K395 SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K289, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

[0069] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K299, K395, K436 и K470 SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K299, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Конъюгаты IpaB-полисахарид

[0070] В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген IpaB, описанный в данном документе, конъюгирован с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления полисахарид представляет собой полисахарид О-антигена *Shigella* (OPS). Домен OPS липополисахарида (LPS) является как важным фактором вирулентности, так и защитным антигеном *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления OPS выбран из серотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7a, 7b или их комбинаций.

[0071] В некоторых вариантах осуществления полисахарид OPS очищен из бактериальных культур *Shigella* или бактериальных штаммов (см. пример 6). Способы очищения являются известными в данной области техники, см., например, WO 2010/049806, международная публикация PCT № WO 2013/020090 и van Sorge, *et al.*, *Cell Host Microbe.*, 2014, 15(6), 729-740. В некоторых вариантах осуществления конъюгированный полисахарид представляет собой синтезированный полисахарид. Способы синтеза полисахарида являются известными в данной области техники, см., например, Zhao, *et al.*, *Org. Chem. Front.*, 2019, 6, 3589-3596. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные полисахариды являются модифицированными с помощью клик-химических реакционноспособных групп для облегчения конъюгации с антигеном IpaB. Например, в некоторых вариантах осуществления конъюгированные полисахариды являются модифицированными с помощью дибензоциклооктин-амин (DBCO) или DBCO-PEG (например, DBCO-PEG-NH₂).

Иммуногенные композиции

[0072] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены иммуногенные композиции, содержащие антигены IpaB, описанные в данном документе. Применяемый в данном документе термин «иммуногенный» относится к способности антигена (например, полипептида) вызывать иммунный ответ, гуморальный или клеточный иммунный ответ и предпочтительно оба. В предпочтительном варианте осуществления субъект будет демонстрировать терапевтический либо защитный иммунологический ответ на введение «эффективного количества» или «иммунологически эффективного количества» иммуногенной композиции в данном документе так, что устойчивость к новой инфекции будет увеличена и/или клиническая тяжесть заболевания будет уменьшена. Иммунологический ответ обычно проявляется в ослаблении проявления или устранении по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией.

[0073] В некоторых вариантах осуществления антигены IpaB конъюгированы с полисахаридом OPS. Иммуногенные композиции могут дополнительно содержать одно или более вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества представляют собой иммунологически и фармакологически инертные компоненты, которые являются «фармацевтически приемлемыми». «Фармакологически приемлемый»

компонент в данном документе представляет собой компонент, который (1) можно включать в иммуногенную композицию, вводимую субъекту, не вызывая значительных нежелательных биологических эффектов или взаимодействуя отрицательным образом с любым из других компонентов состава; и который (2) отвечает критериям, выставленным для неактивных веществ, разработанным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США, и предпочтительно назначенный как «рассматриваемый как безопасный» («GRAS»). Тип вспомогательного вещества или вспомогательных веществ, включенных в иммуногенные композиции, описанные в данном документе, будет зависеть отчасти от выбранного способа введения и конкретного типа состава или лекарственной формы, например, инъекционные жидкие составы, составы в форме интраназальных спреев и т. п.; способы введения и соответствующие составы обсуждаются *ниже*. В целом, однако, инертные компоненты, которые можно преимущественно включать в иммуногенные композиции, описанные в данном документе, включают, без ограничения, носители, растворители, эмульгаторы, стабилизаторы, консерванты, изотонические средства, буферные системы, диспергирующие вещества, разбавители, модификаторы вязкости, усилители поглощения и их комбинации. Тщательное обсуждение фармацевтически приемлемых инертных вспомогательных веществ является доступным в Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., ISBN: 0683306472.

[0074] Иммуногенная композиция может также содержать дополнительные антигены, такие как антигены, которые также индуцируют гуморальный ответ на инфекцию, вызванную *Shigella*, и/или факторы вирулентности или которые направлены на патогены отличающиеся от организмов *Shigella*.

[0075] В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в данном документе, представлены в виде стерильных составов для введения субъекту, например, в качестве суспензии, раствора или в лиофилизированной форме для регидратации перед применением.

[0076] В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция дополнительно содержит один или более адъювантов.

Адьюванты

[0077] В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции дополнительно содержат один или более адьювантов для усиления иммунного ответа на один или более антигенов в иммуногенной композиции. Подходящие адьюванты вакцины для включения в состав по настоящему изобретению описаны в соответствующих текстах и литературе и будут являться очевидными для специалистов в данной области техники. Иллюстративные адьюванты в данном документе включают соли на основе квасцов, такие как фосфат алюминия и гидроксид алюминия.

[0078] Репрезентативные основные группы адьювантов являются следующими.

[0079] Адьюванты минеральных солей: в том числе адьюванты на основе квасцов, такие как фосфат алюминия, гидроксид алюминия и сульфат алюминия, а также другие адьюванты минеральных солей, такие как фосфат, гидроксид и соли серной кислоты и кальция, железа и циркония.

[0080] Сапониновые составы: в том числе сапонин Квиллайи, Quil A и сапонин, полученный из Quil A, QS-21, а также иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), образованные посредством смешивания холестерина, фосфолипида и сапонины.

[0081] Полученные от бактерий и родственные с бактериями адьюванты: в том числе без ограничения пептидогликаны и липополисахариды клеточной стенки, полученные из грам-отрицательных бактерий, таких как *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum*, *C. granulosum*, *Bordetella pertussis* и *Neisseria meningitis*, такие как липид А, монофосфорилированный липид А (MPLA), другие производные и миметики липида А (например, RC529), энтеробактериальные липополисахариды («LPS»), лиганды TLR4 и димиколат трегалозы («TDM»).

[0082] Мурамилпептиды: такие как N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин («MDP») и аналоги и производные MDP, например, треонил-MDP и нор-MDP.

[0083] Адьюванты на масляной основе: в том числе эмульсии типа «масло в воде» (O/W) и «вода в масле» (W/O), такие как эмульсии сквален-вода (например, MF59, AS03, AF03), полный адьювант Фрейнда («CFA») и неполный адьювант Фрейнда («IFA»).

[0084] Липосомные адъюванты: адъюванты с микросферами, образованные из биоразлагаемых и нетоксичных полимеров, таких как поли(α -гидрокси кислота), поли(гидроксимасляная) кислота, сложный полиортоэфир, полиангидрид, поликапролактон и т. п.

[0085] Иммуномодуляторы человека: в том числе цитокины, такие как интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12), интерфероны (например, интерферон- γ), макрофагальный колониестимулирующий фактор и фактор некроза опухоли.

[0086] Биоадгезивы и мукоадгезивы: такие как хитозан и его производные и эстерифицированные гиалуроновая кислота и микросферы или мукоадгезивы, такие как перекрестные производные поли(акриловой кислоты), поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, полисахариды и карбоксиметилцеллюлоза.

[0087] Соединения имидазохинолона: в том числе имиквимод и его гомологи, например, резиквимод.

[0088] Агонисты TLR-9: такие как Hsp90 и олигодезоксинуклеотиды, содержащие неметилованные мотивы CpG (см., например, Bode et al. (2011) Expert Rev. Vaccines 10(4): 499-511); и

[0089] Углеводные адъюванты: в том числе адъюванты, полученные из инулина, гамма-инулин и альгаммулин и другие углеводные адъюванты, такие как полисахариды на основе глюкозы и маннозы, в том числе гликаны, декстраны, лентинаны, глюкоманнаны, галактоманнаны, леваны и кисланы.

Введение и применение

[0090] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*, включающие введение субъекту эффективного количества иммуногенных композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения риска дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*, у субъекта, включающие профилактическое введение субъекту эффективного количества иммуногенных композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрены способы индуцирования защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella* у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества иммуногенных композиций, описанных в данном документе.

[0091] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенных композиций, описанных в данном документе, для иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенных композиций, описанных в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенных композиций, описанных в данном документе, для снижения риска развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенных композиций, описанных в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для снижения риска развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенных композиций, описанных в данном документе, для индуцирования у субъекта защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение иммуногенных композиций, описанных в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для индуцирования у субъекта защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella*.

[0092] В данном документе термин «субъект» относится к млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой мышь, крысу, собаку, морскую свинку, овцу, отличающегося от человека примата или человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления возраст субъектов-людей составляет 18 лет или старше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъектов-людей составляет менее 18 лет.

[0093] Способ может включать введение иммуногенной композиции терапевтически, т. е. для лечения субъекта, страдающего дизентерией, вызванной *Shigella*. Способ может также включать введение иммуногенной композиции профилактически, что означает, например, что способ снижает риск развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*. Когда иммуногенную композицию применяют профилактически, субъект может быть предрасположен к инфекции, вызванной *Shigella*, в результате влияния любого числа факторов риска, в том числе расположения, ограниченного доступа к чистой воде, проживания в условиях скученности и т. п.

[0094] «Иммунологически эффективное количество» или «эффективное количество» иммуногенной композиции представляет собой количество, которое, как однократная доза либо как часть серии из двух и более доз, является эффективным для лечения или предупреждения дизентерии, вызванной *Shigella*. Вводимое количество будет варьировать в соответствии с несколькими факторами, в том числе с общим состоянием здоровья и физическим состоянием субъекта, возрастом субъекта, способностью иммунной системы субъекта синтезировать соответствующие антитела, формой композиции (например, инъекционная жидкость, назальный спрей и т. д.), и другими факторами, известными практикующему врачу, контролирующего введение.

[0095] Термин «лечение» относится к терапевтическому лечению посредством введения иммуногенной композиции, где целью является уменьшение проявления или устранение инфекции. Например, «лечение» может включать непосредственное воздействие, подавление, ингибирование и устранение инфекции, а также уменьшение тяжести, отсрочку начала и/или уменьшение выраженности симптомов, ассоциированных с инфекцией. Если явно не указано другое или не подразумевается контекстом, термин «лечение» охватывает «предупреждение» (или профилактику, или профилактическое лечение), где «предупреждение» может относиться к уменьшению риска того, что у субъекта разовьется инфекция, отсрочке начала проявления симптомов, предупреждению рецидива инфекции или предупреждению развития инфекции.

[0096] В данном документе термин «защитный иммунный ответ» охватывает вызывание гуморального ответа к *Shigella* у субъекта. Титры антител, образованные после введения иммуногенных композиций, описанных в данном документе, можно определить с помощью способов, известных в данной области техники, например, с помощью анализов ELISA образцов сыворотки, полученных от иммунизированных субъектов. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в данном документе, вызывают гуморальный ответ у субъектов, подвергшихся лечению, где образованные антитела связываются со множеством (*m. e.*, двумя или более) серотипами *Shigella*.

[0097] Введение иммуногенной композиции можно проводить с применением любого эффективного способа системной доставки. Композицию обычно вводят парентерально, например, посредством инъекции, в том числе внутривенной, внутримышечной, внутрибрюшинной, интерстициальной или подкожной инъекции; инъекцию также можно осуществлять в десны, в таком случае иммуногенную композицию инъецируют непосредственно в десну. В дополнение, композицию можно вводить трансмукозально, например, интраназальным, сублингвальным, трансбуккальным, интравагинальным и ректальным путями. Однако, также предусмотрены другие способы введения и настоящее изобретение не ограничивается в этом отношении. В качестве примера другие способы введения включают пероральную и трансдермальную доставку, а также введение ингаляционно или с применением подкожного имплантата.

[0098] Способ введения в значительной степени определяет тип состава или лекарственную форму, которая содержит иммуногенную композицию. Композиции, составленные для парентерального применения, включают стерильные водные и неводные растворы, суспензии и эмульсии. Инъекционные водные растворы содержат действующее вещество в водорастворимой форме. Примеры неводных растворителей или носителей включают жирные масла, такие как оливковое масло или кукурузное масло, синтетические эстеры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, спирты с низкой молекулярной массой, такие как пропиленгликоль, синтетические гидрофильные полимеры, такие как полиэтиленгликоль, липосомы и т. п. Составы для парентерального введения могут также содержать вспомогательные вещества,

такие как растворители, эмульгаторы, стабилизаторы, консерванты, изотонические средства, буферные системы, диспергирующие вещества, разбавители, модификаторы вязкости, усилители поглощения и их комбинации. Инъекционные составы становятся стерильными посредством включения стерилизующего средства, фильтрацией через фильтр, задерживающий бактерии, посредством облучения или нагревания. Их также можно изготавливать с применением стерильной среды для инъекций. Иммуногенная композиция или ее отдельные компоненты могут быть также в высушенной, например, лиофилизированной форме, которую можно регидратировать с помощью подходящего носителя непосредственно перед введением посредством инъекции.

[0099] Из трансмукозальных путей интраназальное введение, как правило, хотя и необязательно, является предпочтительным. Составы для интраназального введения, в том числе интраназально введенные иммуногенные композиции, являются известными в данной области техники и должны быть составлены со ссылкой на Руководство FDA для промышленности. Назальный спрей и раствор для ингаляций, суспензия и лекарственные средства в виде спрея. Составы для интраназального введения представляют собой жидкости, т. е. растворы, эмульсии, суспензии или т. п., для введения в качестве спреев, интраназальных инъекций или капель и могут содержать адъюванты и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, как указано выше. Из-за относительно большого размера антигенов в составах системная доставка интраназальным путем требует включения усилителя трансмукозального поглощения в иммуногенной композиции. Примеры подходящих усилителей трансмукозального поглощения включают, без ограничения, алкилсахариды, циклодекстрины и хитозаны, см. Maggio (2014) *J. Excip. Food Chem.* 5(2): 100-12; and Merkus et al. (1999) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 41-57. Концентрация усилителя выбрана, чтобы гарантировать, что иммунологически эффективное количество состава проходит через носовые мембраны и в системный кровоток с эффективной скоростью транспорта. Различные анатомические и физиологические заключения, определяющие композицию и природу иммуногенной композиции для интраназального введения обсуждаются, например, в Auroga (октябрь 2002) *Drug Development & Delivery* 2(7), включенной посредством ссылки в данном документе.

[0100] Другие пути введения и соответствующие составы включают, без ограничений, сублингвальное введение с быстрорастворимой лекарственной формой, такой как быстрорастворимая таблетка; трансбуккальное введение с применением буккального пластыря или других буккальных систем доставки; интравагинальное введение с применением пессария, мази или крема; ректальную доставку с применением ректального суппозитория, мази или крема, трансдермальное введение с применением трансдермального пластыря или состава; подкожное введение с инъекированным имплантом или гранулой; ингаляцию с применением состава для легких в виде сухого порошка; и пероральное введение с применением пероральных лекарственных форм, таких как таблетка, капсула и т. п.

[0101] Как упоминалось ранее в данном документе, иммуногенную композицию вводят субъекту в контексте подходящей схемы приема. Композицию можно вводить однократно или два или более раз в течение длительного периода времени. Например, после начальной «первичной» дозы может следовать по крайней мере одна «увеличивающаяся» доза. Интервал времени между первичной и последующей увеличивающейся дозой и между увеличивающимися дозами обычно находится в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 24 недель, более обычно в диапазоне от приблизительно 2 до 12 недель, таком как от 2 до 8 недель, 3-6 недель и т. д. Независимо от способа введения, например, внутримышечная инъекция, инъекция в десны, интраназальное введение и т. п., объем однократной дозы вакцины будет, как правило, находиться в диапазоне от приблизительно 1 мкл до приблизительно 500 мкл, обычно в диапазоне от приблизительно 1 мкл до приблизительно 250 мкл, более обычно в диапазоне от приблизительно 2,5 мкл до приблизительно 200 мкл и предпочтительно в диапазоне от приблизительно 5 мкл до приблизительно 150 мкл. Следует понимать, что концентрация общего антигена в иммуногенной композиции соответствует иммунологически эффективной дозе композиции на единицу объема, исходя из вышеупомянутых рекомендаций для объема доз.

[0102] Для удобства применения иммуногенную композицию по настоящему изобретению можно включать в упакованный продукт или «набор», содержащий инструкции для самостоятельного введения или введения практикующим врачом.

Набор включает герметичный контейнер, содержащий дозу иммуногенной композиции, обычно «однократную дозу», подходящую для случая однократного употребления, которая является иммунологически эффективной. Вакцина может быть в жидкой форме и таким образом готовой к введению в качестве инъекции или т. п. или она может быть в другой форме, которая требует от пользователя проводить процесс приготовления перед введением, например, гидратацию лиофилизированного состава, активацию инертного компонента или т. п. Набор может также включать два или более герметичных контейнера с первичной дозой в первом контейнере и увеличивающейся дозой в одном или более дополнительных контейнерах или иммуногенной композицией *Shigella* в первом контейнере и вакциной, направленной против другой инфекции, которая может быть или может не быть родственной с инфекцией, вызванной *Shigella*, в другом контейнере.

[0103] Следует понимать, что, хотя настоящее изобретение описано совместно с рядом конкретных вариантов осуществления, вышеупомянутое описание, а также экспериментальный раздел, который следует после, предназначены для иллюстрации и не для ограничения объема изобретения. В связи с этим не делается попыток продемонстрировать детали по настоящему изобретению более подробно, чем необходимо для общего понимания настоящего изобретения, при этом описания вместе с графическими материалами и/или примерами будет достаточно для специалистов в данной области техники, чтобы понять, как настоящее изобретение можно воплотить на практике. Настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта настоящего изобретения, изложенные в пунктах формулы изобретения, прилагаемой к данному документу, как разрешено в применимой юрисдикции. Кроме того, любая комбинация элементов по настоящему изобретению, описанная в данном документе, охвачена настоящим изобретением, если в данном документе не указано иное или это явно не противоречит контексту.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0104] Дополнительные пронумерованные варианты осуществления в соответствии с настоящим изобретением предусматривают следующее.

[0105] Вариант осуществления 1. Полипептидный антиген, представляющий собой плазмидный антиген инвазии В (IpaB), содержащий по меньшей мере одну

неприродную аминокислоту (nnAA), включенную в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB, где nnAA включена в положении, выбранном из K241, K262, K269, K283, K289, K299, C309, K312, S329, S333, D347, E360, K368, E372, K376, D380, K384, E387, D392, K394, K395, K397, K424, K429, K436, K440, K448, K451, K470 и K482 SEQ ID NO: 1.

[0106] Вариант осуществления 2. Антиген IpaB по варианту осуществления 1, где nnAA включена в положении, выбранном из K289, K299, K368, K395, K436 и K470.

[0107] Вариант осуществления 3. Антиген IpaB по варианту осуществления 2, где полипептидный антиген IpaB содержит nnAA, включенную в каждом из положений K289, K368 и K395 SEQ ID NO: 1.

[0108] Вариант осуществления 4. Антиген IpaB по варианту осуществления 3, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0109] Вариант осуществления 5. Антиген IpaB по варианту осуществления 2, где полипептидный антиген IpaB содержит nnAA, включенную в каждом из положений K299, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

[0110] Вариант осуществления 6. Антиген IpaB по варианту осуществления 5, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0111] Вариант осуществления 7. Антиген IpaB по варианту осуществления 2, где полипептидный антиген IpaB содержит nnAA, включенную в каждом из положений K299, K368 и K395 SEQ ID NO: 1.

[0112] Вариант осуществления 8. Антиген IpaB по варианту осуществления 7, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

[0113] Вариант осуществления 9. Антиген IpaB по варианту осуществления 2, где полипептидный антиген IpaB содержит nnAA, включенную в каждом из положений K289, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

[0114] Вариант осуществления 10. Антиген IpaB по варианту осуществления 9, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

[0115] Вариант осуществления 11. Антиген IpaB по варианту осуществления 2, где полипептидный антиген IpaB содержит nnAA, включенную в каждом из положений K299, K395, K436 и K470 SEQ ID NO: 1.

[0116] Вариант осуществления 12. Антиген IpaB по варианту осуществления 11, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0117] Вариант осуществления 13. Антиген IpaB по варианту осуществления 2, где полипептидный антиген IpaB содержит nnAA, включенную в каждом из положений K299, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

[0118] Вариант осуществления 14. Антиген IpaB по варианту осуществления 13, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

[0119] Вариант осуществления 15. Антиген IpaB по любому из вариантов осуществления 1-14, где nnAA содержит клик-химическую реакционноспособную группу.

[0120] Вариант осуществления 16. Антиген IpaB по варианту осуществления 15, где nnAA выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации.

[0121] Вариант осуществления 17. Антиген IpaB по варианту осуществления 16, где nnAA представляет собой pAMF.

[0122] Вариант осуществления 18. Антиген IpaB по вариантам осуществления 1-17, конъюгирован с полисахаридом О-антигена Shigella (OPS).

[0123] Вариант осуществления 19. Полипептидный антиген IpaB по варианту осуществления 18, где OPS выбран из серотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7a, 7b или их комбинаций.

[0124] Вариант осуществления 20. Полипептидный антиген IpaB по любому из вариантов осуществления 1-19, где полипептидный антиген IpaB является очищенным.

[0125] Вариант осуществления 21. Иммуногенная композиция, содержащая антиген IpaB по любому из вариантов осуществления 1-20.

[0126] Вариант осуществления 22. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 21, дополнительно содержащая по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

[0127] Вариант осуществления 23. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 22, где по меньшей мере одно вспомогательное вещество выбрано из носителей, растворителей, эмульгаторов, стабилизаторов, консервантов, изотонических средств, буферных систем, диспергирующих веществ, разбавителей, модификаторов вязкости и усилителей поглощения.

[0128] Вариант осуществления 24. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 21-23, дополнительно содержащая адъювант.

[0129] Вариант осуществления 25. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 21-24, составленная в виде стерильного раствора для инъекций.

[0130] Вариант осуществления 26. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 21-24, составленная в лиофилизированной форме.

[0131] Вариант осуществления 27. Способ экспрессии полипептидного антигена, представляющего собой плазмидный антиген инвазии В (IpaB), из бактерии рода *Shigella*, включающий экспрессию полипептидного антигена IpaB с применением бесклеточного синтеза белка в присутствии экзогенного белка-шаперона IpgC.

[0132] Вариант осуществления 28. Способ по варианту осуществления 27, где бактерия рода *Shigella* включает виды *Shigella*, выбранные из *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. Boydii* и *S. sonnei*.

[0133] Вариант осуществления 29. Способ по варианту осуществления 27 или варианту осуществления 28, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной с последовательностью полипептидного антигена IpaB дикого типа из бактерии рода *Shigella*.

[0134] Вариант осуществления 30. Способ по варианту осуществления 27 или варианту осуществления 28, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

[0135] Вариант осуществления 31. Способ по варианту осуществления 27, где по меньшей мере одна неприродная аминокислота (nnAA) включена в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB.

[0136] Вариант осуществления 32. Способ по варианту осуществления 31, где по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 nnAA включены в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB.

[0137] Вариант осуществления 33. Способ по варианту осуществления 31, где от 2 до 10 nnAA включены в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB.

[0138] Вариант осуществления 34. Способ по любому из вариантов осуществления 31-33, где nnAA включена в одном или нескольких положениях, выбранных из K241, K262, K269, K283, K289, K299, C309, K312, S329, S333, D347, E360, K368, E372, K376, D380, K384, E387, D392, K394, K395, K397, K424, K429, K436, K440, K448, K451, K470 и K482 SEQ ID NO: 1.

[0139] Вариант осуществления 35. Способ по любому из вариантов осуществления 31-33, где ппАА включена в положении, выбранном из K289, K299, K368, K395, K436 и K470.

[0140] Вариант осуществления 36. Способ по варианту осуществления 31, где полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K289, K368 и K395 SEQ ID NO: 1.

[0141] Вариант осуществления 37. Способ по варианту осуществления 36, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0142] Вариант осуществления 38. Способ по варианту осуществления 31, где полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

[0143] Вариант осуществления 39. Способ по варианту осуществления 38, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0144] Вариант осуществления 40. Способ по варианту осуществления 31, где полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K368 и K395 SEQ ID NO: 1.

[0145] Вариант осуществления 41. Способ по варианту осуществления 40, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

[0146] Вариант осуществления 42. Способ по варианту осуществления 31, где полипептидный антиген IpaB содержит ппАА, включенную в каждом из положений K289, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

[0147] Вариант осуществления 43. Способ по варианту осуществления 42, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

[0148] Вариант осуществления 44. Способ по варианту осуществления 31, где полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K299, K395, K436 и K470 SEQ ID NO: 1.

[0149] Вариант осуществления 45. Способ по варианту осуществления 44, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0150] Вариант осуществления 46. Способ по варианту осуществления 31, где полипептидный антиген IpaB содержит ppAA, включенную в каждом из положений K299, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

[0151] Вариант осуществления 47. Способ по варианту осуществления 44, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

[0152] Вариант осуществления 48. Способ по любому из вариантов осуществления 31-44, где ppAA выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации.

[0153] Вариант осуществления 49. Способ по варианту осуществления 48, где ppAA представляет собой pAMF.

[0154] Вариант осуществления 50. Способ по любому из вариантов осуществления 27-49, где белок-шаперон IpgC содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 95% идентичной с SEQ ID NO: 8.

[0155] Вариант осуществления 51. Способ по любому из вариантов осуществления 27-50, дополнительно включающий очистку полипептидного антигена IpaB.

[0156] Вариант осуществления 52. Способ по варианту осуществления 51, где полипептидный антиген IpaB очищают способом, который обеспечивает присутствие по сути всего антигена в димерной форме в водном растворе.

[0157] Вариант осуществления 53. Способ по варианту осуществления 52, где полипептидный антиген IpaB очищают в присутствии детергента, эффективного для разрушения белка-шаперона IpgC без существенного влияния на полипептидный антиген IpaB.

[0158] Вариант осуществления 54. Способ по варианту осуществления 53, где детергент представляет собой лаурилдиметиламинооксид (LDAO).

[0159] Вариант осуществления 55. Способ по варианту осуществления 54, где LDAO присутствует в количестве 0,1% об./об. или меньше.

[0160] Вариант осуществления 56. Очищенный антиген IpaB, полученный посредством способа по любому из вариантов осуществления 27-55.

[0161] Вариант осуществления 57. Способ иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*, включающий введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26.

[0162] Вариант осуществления 58. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26 для иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*.

[0163] Вариант осуществления 59. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26 при изготовлении лекарственного препарата для иммунизации субъекта против дизентерии, вызванной *Shigella*.

[0164] Вариант осуществления 60. Способ по варианту осуществления 57 или применение по варианту осуществления 58 или по варианту осуществления 59, где иммуногенную композицию вводят в виде внутримышечной инъекции.

[0165] Вариант осуществления 61. Способ по варианту осуществления 57 или применение по варианту осуществления 58 или по варианту осуществления 59, где иммуногенную композицию вводят трансмукозально.

[0166] Вариант осуществления 62. Способ по варианту осуществления 57 или применение по варианту осуществления 58 или по варианту осуществления 59, где иммуногенную композицию вводят однократно.

[0167] Вариант осуществления 63. Способ по варианту осуществления 57 или применение по варианту осуществления 58 или по варианту осуществления 59, где иммуногенную композицию вводят два или более раз.

[0168] Вариант осуществления 64. Способ по варианту осуществления 57 или применение по варианту осуществления 58 или по варианту осуществления 59, где субъект у субъекта проявляются симптомы дизентерии, вызванной *Shigella*, и иммуногенную композицию вводят в качестве терапевтической вакцины.

[0169] Вариант осуществления 65. Способ снижения риска развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26.

[0170] Вариант осуществления 66. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26 для снижения риска развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*.

[0171] Вариант осуществления 67. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26 при изготовлении лекарственного препарата для снижения риска развития у субъекта дизентерийной инфекции, вызванной *Shigella*.

[0172] Вариант осуществления 68. Способ по варианту осуществления 65 или применение по варианту осуществления 66 или по варианту осуществления 67, где субъект имеет по меньшей мере один фактор риска развития дизентерии, вызванной *Shigella*.

[0173] Вариант осуществления 69. Способ индуцирования защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella* у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26.

[0174] Вариант осуществления 70. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26 для индуцирования защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella* у субъекта.

[0175] Вариант осуществления 71. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 21-26 при изготовлении лекарственного препарата для индуцирования защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella* у субъекта.

ПРИМЕРЫ

[0176] Если не определено иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, характеризуются общепринятым значением. Практикующие врачи особенно обращаются к Green & Sambrook (eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 99) (New York: John Wiley & Sons, 2012) и Plotkin et al., *Vaccines*, Sixth Ed. (London: Elsevier, 2013). Примеры подходящих молекулярных методик для образования рекомбинантных нуклеиновых кислот, клонирования, активации и дериватизации биомолекул, очистки и идентификации белков и пептидов и другие подходящие методики также описаны и/или цитируются в публикации патента США № 2018/0333484 A1 на имя Fairman et al. (SutroVax, Inc.), ранее включенной посредством ссылки. Для примеров методик и компонентов, необходимых для парентерального введения биомолекул, описанных в данном документе, практикующие врачи обращаются к Remington, *Essentials of Pharmaceutics*, Pharmaceutical Press, London (2012). Способы бесклеточного синтеза белка также описаны в Spirin & Swartz (2008) *Cell-free Protein Synthesis*, Wiley-VCH, Вайнхайм, Германия. Способы включения неприродных аминокислот в белки с применением бесклеточного синтеза описаны в Shimizu et al. (2006) *FEBS Journal*, 273, 4133-4140; Chong (2014) *Curr Protoc Mol Biol*. 108:16.30.1-11; и Fairman et al., цитированный выше.

Пример 1. Бесклеточный синтез IpaB

[0177] Экспрессию IpaB (SEQ ID NO: 1) осуществляли в экстракте, полученном посредством бесклеточного синтеза белка (CFPS), предоставленном Sutro Biopharma, Inc. (Южный Сан Франциско, Калифорния). Особенности и получение экстракта описаны в других публикациях; в этом случае экстракт, как правило, получали, как описано в Zawada et al. (2011) *Biotechnol. Bioeng.* 108(7): 1570-1578. Конечная концентрация в реакции бесклеточного синтеза белка составляла 35% (по объему) клеточного экстракта, 5 мкМ РНК-синтетазы ('RS'), 2 ммоль GSSG (окисленного глутатиона), 8 мМ глутамата магния, 10 мМ глутамата аммония, 130 мМ глутамата калия, 35 мМ пирувата натрия, 1,2 мМ AMP, 0,86 мМ каждой из GMP, UMP, CMP, 2 ммоль аминокислот (за исключением 0,5 мМ для тирозина и фенилаланина), 4 мМ оксалата натрия, 1 мМ путресцина, 1,5 мМ спермидина, 15 мМ фосфата калия и 100 нМ РНК-полимеразы T7. Реакции бесклеточного синтеза инициировали посредством добавления плазмидной ДНК, кодирующей IpaB.

[0178] Реакционные смеси инкубировали 14 ч. в виброцентрифуге при 650 об./мин. в 48-луночных планшетах Flower (m2p-labs # MTP-48-B). После периода инкубации реакционную смесь выдерживали при 4°C, пока ее обрабатывали для очищения или анализа. После реакции бесклеточного синтеза белка смесь, содержащую IpaB, переносили на 96-луночный планшет (DyNa Block™, 2 мл; Labnet, Эдисон, Нью-Джерси) и центрифугировали при 5000×g в течение 15 минут при 40°C.

[0179] Образцы смеси CFPS до и после центрифугирования собирали и анализировали с применением способа включения лейцина 14C, как описано в Kirchman et al. (1985) *Applied and Environmental Microbiology* 49(3):599-607, для оценки количества растворимого белка (образца после центрифугирования) и общего белка (образца до центрифугирования). Результаты показаны на графике на ФИГ. 2 (вместе с результатами электрофореза SDS-PAGE), который указывает на экспрессию IpaB в зависимости от дозы pDNA. Как можно увидеть на фигуре, уровень растворимого белка составлял больше, чем 200 мкг/мл при всех концентрациях pDNA IpaB, хотя уровни экспрессии выходили на плато при концентрациях pDNA больших, чем 1 мкг/мл.

Пример 2. Бесклеточный синтез IpaB с титрованием pDNA IpgC

[0180] Процедуру примера 1 повторяли с pDNA IpgC, титрованной в смесь, полученную посредством бесклеточного синтеза при различных концентрациях. Уровень IpaB, экспрессируемого при различных концентрациях добавленной pDNA IpgC, оценивали с применением способа включения лейцина ^{14}C , как и раньше. Результаты показаны на ФИГ. 3. Как указано на фигуре, титрование pDNA IpgC отрицательно влияло на экспрессию IpaB в системе бесклеточного синтеза с возрастающими концентрациями pDNA IpgC, приводящими к сниженным уровням экспрессии IpaB.

Пример 3. Бесклеточный синтез IpaB с титрованием белка IpgC

[0181] Процедуру примера 1 повторяли, но с очищенным белком IpgC, экзогенно добавленным к смеси, полученной посредством бесклеточного синтеза при различных концентрациях. Уровень IpaB, экспрессируемый при различных концентрациях добавленного IpgC, оценивали с применением способа включения лейцина ^{14}C , как и раньше. Результаты показаны на ФИГ. 4. Анализ, представленный на фигуре, демонстрирует заметное увеличение экспрессии IpaB дозозависимым образом в отношении IpgC относительно результатов, полученных в примере 1.

Пример 4. Повышение экспрессии IpaB, очистка и характеристика

[0182] Экспрессию IpaB, меченного гистидином, осуществляли с увеличивающимся количеством очищенного белка IpgC в 10-сантиметровых чашках Петри при комнатной температуре. Анализ вестерн-блот (ФИГ. 5) с применением пероксидазы хрена α -his6 (HRP) демонстрировал, что экзогенное добавление увеличивающегося количества очищенного IpgC способствовало сопутствующему повышению выхода растворимого IpaB с почти полным восстановлением осажденного белка из гранулы при самой высокой дозе. Этот результат также показан на столбчатой диаграмме и авторадиограмме на ФИГ. 6А (где «FL-IpaB» представляет собой полноразмерный белок дикого типа IpaB под SEQ ID NO: 1).

[0183] После бесклеточного синтеза IpaB с очищенным IpgC, добавленным экзогенно, IpaB можно очистить посредством удаления IpgC с применением промывания детергентом. На ФИГ. 6В показан анализ SDS-PAGE фракций

элюирования с применением колонки для аффинной хроматографии HisTrap, демонстрирующий относительные количества IpaB и IpgC, присутствующих до и после промывания с помощью 0,1% (об./об.) из 30% исходного лаурилдиметиламинооксида (LDAO).

[0184] Структуру очищенного IpaB, полученную таким образом, оценивали в растворе с применением эксклюзионной хроматографии с многоугловым рассеянием света (SEC-MALS). Результаты анализа SEC-MALS, показанные на ФИГ. 6С, указывают на то, что IpaB главным образом существуют в качестве димера при молекулярном весе, составляющем приблизительно 111,5 кДа.

Пример 5. Бесклеточный синтез IpaB с включенной неприродной аминокислотой

[0185] Включение 2-амино-3-(4-азидометил)фенил)пропановой кислоты («pAMF») ppAA в последовательность антигена IpaB под SEQ ID NO: 1. Сайт-направленный сканирующий мутагенез и анализ экспрессии проводили по сути, как описано в публикациях патентов США №№ Zimmerman et al., США 2016/0257946 A1 и Fairman et al., US 2018/333484 A1, обе включены посредством ссылки в данном документе, для помощи в идентификации сайтов для включения ppAA. В результатах показано, что включение pAMF являлось высокоэффективным на нескольких отдельных сайтах в ядре IpaB, в частности на K241, K262, K269, K283, K289, K299, C309, K312, S329, S333, D347, E360, K368, E372, K376, D380, K384, E387, D392, K394, K395, K397, K424, K429, K436, K440, K448, K451, K470 и K482; см. ФИГ. 7. Из этих сайтов, шесть отдельных сайтов были выбраны -- K289, K299, K368, K395, K436 и K470 -- и комбинированы эмпирически для образования двух наборов из трех pAMF (мутантных вариантов IpaB 1, 2 и 3, SEQ ID NO 2, 3 и 4, соответственно) и четырех сайтов pAMF (мутантных вариантов IpaB 4, 5 и 6, SEQ ID NO 5, 6 и 7, соответственно). Данные на ФИГ. 8 показывают, что экспрессия IpaB, содержащего много pAMF, являлась схожей с экспрессией полноразмерного IpaB дикого типа, оцененного в примере 4 и представленной на ФИГ. 6А.

[0186] Ковалентное конъюгирование со вторым антигеном осуществляют с применением методологии, детально описанной в публикации патента США № US 2018/333484 A1 и также описанной в примере 8. Антиген может представлять собой

полисахарид О-антигена *Shigella*, выбранный из серотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7a, 7b и их комбинаций.

Пример 6. Очистка OPS

[0187] OPS собирали непосредственно из липополисахарида (LPS) в клеточной биомассе *Shigella*, трансформированной с помощью плазмиды pSEC10-wzzB для сверхэкспрессии wzzB, приводящей к увеличенной длине цепи OPS, и кондиционированной среды для ферментации и для роста (дополненной аминокислотами), или культур во встряхиваемой колбе (STm D65) посредством снижения pH культуры до 3,5-3,7 с помощью ледяной уксусной кислоты и инкубации при 100°C в течение 4 ч. в стеклянных колбах, погруженных в кипящую водяную баню. Супернатанты после гидролиза отделяли из нерастворимого материала посредством центрифугирования при 10к x g при 4°C в течение 30 минут с применением ротора GS3 в рефрижераторной центрифуге Sorvall RC5. Фракцию супернатанта переносили до 1 М NaCl и фильтровали посредством микрофльтрации с тангенциальным потоком через 0,2 мкм фильтр с полыми волокнами при 4,5 фунт/кв. дюйм трансмембранного давления (TMP), пропуская через фильтр полный объем, с последующей промывкой эквивалентным объемом 1 М NaCl. Концентрацию очищенного с помощью 0,2 мкм 1 М NaCl пермеата затем увеличивали в 10 раз на мембране Hydrosart TFF весом 30 кДа при 14 фунт/кв. дюйм TMP и подвергали диафльтрации против 35 диаобъемов 1 М NaCl с последующим использованием 10 диаобъемов 50 мМ Tris с pH 7.

[0188] Фракцию ретентата в 20 мМ Tris с pH 7, 50 мМ NaCl затем пропускали через 3 x 3 мл анионообменные мембраны Sartobind NanoQ, связанные в серии, с применением устройства для очищения АКТА при 10 мл/мин. в 20 мМ Tris с pH 7, 50 мМ NaCl. Проточную фракцию доводили до 25% (об./об.) сульфата аммония и инкубировали в течение ночи при 4°C. Осажденный материал удаляли посредством центрифугирования 10к x g/4°C в течение 30 мин. с применением ротора GS3 в рефрижераторной центрифуге Sorvall RC5 с последующей фильтрацией через блок вакуумного фильтра Stericup 0,45 мкм (Millipore, Массачусетс). Концентрацию фильтратов затем увеличивали в 10 раз с помощью TFF с устройством Slice 200 TFF с применением мембраны Hydrosart весом 10 кДа при 7,5 фунт/кв. дюйм TMP и

подвергали диафильтрации против 10 диаобъемов деионизированной воды. Ретентаты TFF лиофилизировали и хранили при -20°C до применения.

Пример 7. Бесклеточный синтез мутантных вариантов IpaB, содержащих много pAMF, в присутствии IpgC

[0189] Включение pAMF во множественные сайты в антигене IpaB выполняли в соответствии со способами, описанными в примере 5. Экспрессию мутантных вариантов IpaB (SEQ ID NO: 1, контроль) дикого типа и мутантных вариантов с pAMF во множественных сайтах (SEQ ID NO: 2-7) осуществляли при комнатной температуре (2,5 мкг ДНК/мл) в присутствии 0,2 мг/мл IpgC в 10-сантиметровых планшетах для тканевых культур в течение ночи с применением способов из примера 4. Культуры собирали и загружали на колонки для аффинной хроматографии hisTRAP™ объемом 1 мл для очищения. 2 мкл каждого из супернатанта, гранул и проточных фракций, и 10 мкл фракций элюирования собирали и инкубировали с DBCO-TAMRA (TAMRA: 5-карбокситетраметилродамин) для мечения перед использованием разделяющих гелей. Гели визуализировали посредством флуоресценции и также окрашивали с помощью Safe Blue.

[0190] Осуществляли экспрессию мутантных вариантов IpaB, содержащих 3 остатка pAMF (мутантный вариант 1: K289, K367, K395 – SEQ ID NO: 2; мутантный вариант 2: K299, K395, K436 – SEQ ID NO: 3; мутантный вариант 3: K299, K368, K395 – SEQ ID NO: 4) и очищали их в дополнение к мутантным вариантам IpaB, содержащим 4 остатка pAMF (мутантный вариант 4: K289, K368, K395, K436 – SEQ ID NO: 5; мутантный вариант 5: K299, K395, K436, K470 – SEQ ID NO: 6; мутантный вариант 6: K299, K368, K395, K436 – SEQ ID NO: 7). Экспрессия каждого из этих мутантных вариантов в присутствии IpgC показана на ФИГ. 9. Мутантный вариант 1 демонстрировал наибольший уровень восстановления из фракции элюирования после экспрессии и очищения.

Пример 8. Конъюгация мутантных вариантов IpaB с DBCO-derivatизированными OPS

[0191] Мутантные варианты IpaB 1 (SEQ ID NO: 2), 2 (SEQ ID NO: 3), 3 (SEQ ID NO: 4) и 4 (SEQ ID NO: 5) конъюгировали с DBCO-derivatизированным OPS

посредством реакции фрагмента циклооктина группы DBCO с азидным фрагментом боковой цепи неприродной аминокислоты (pAMF), включенной в мутантные IpaB. Протокол анализа образцов для реакции конъюгации между DBCO и азидными группами можно найти, например, в Zimmerman *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, 2014, 25(2), 351-361; Yin *et al.*, *Sci Rep* 7, 3026 (2017); и Kapoor *et al.*, *Biochemistry*, 2018, 57(5), 516-519. Посредством диализа неочищенного конъюгата с применением мембраны массой 100 кДа удаляли большую часть свободного полисахарида из реакционной смеси.

[0192] Молекулярная масса конъюгата, образованного с мутантными вариантами IpaB 1-4, показана на ФИГ. 10. Было обнаружено, что после очищения посредством диализа конъюгат мутантного варианта IpaB 1 (SEQ ID NO: 2) характеризовался самой большой средней молекулярной массой (529,20).

Пример 9. Реактивность сыворотки человека с IpaB и конъюгатами IpaB:OPS

[0193] Определение наличия IpaB и конъюгатов IpaB:OPS с помощью сыворотки крови человека, полученной от индивидуумов в регионах, эндемических для *Shigella*, осуществляли посредством ELISA. ELISA осуществляли, следуя общему протоколу, изложенному ниже в примере 10, с применением вторичного антитела к Ig человека. На ФИГ. 11 показана реактивность (измеренная в OD₄₅₀) IpaB, мутантных вариантов IpaB 1-4 и конъюгатов OPS мутантных вариантов IpaB 1-4 в зависимости от концентрации в сыворотке крови. Все четыре конъюгата (1-4, SEQ ID NO: 2-5) демонстрировали более высокую реактивность с сывороткой крови человека, чем IpaB и мутантный вариант IpaB отдельно, как показано на ФИГ. 11.

Пример 10. Активная иммунизация мышей - заражение *S. flexneri 2a*

[0194] Эксперименты проводили для оценки эффективности IpaB-OPS (мутантного варианта IpaB № 1), CRM-OPS, IpaB и контрольных иммунизаций квасцами в отношении ответов животных на заражение *S. flexneri 2a*. Самок мышей BALB/c группировали, как показано в таблице 2.

Таблица 2. Группы иммунизации для заражения *S. flexneri 2a*

Группа	Мыши(n)	Вакцина	Объем	Доза
--------	---------	---------	-------	------

A	20	OPS:IraB <i>S. flexneri</i> 2a в разбавителе вакцины	100 мкл (50 мкл на ногу)	10 мкг
B	20	CRM:OPS в разбавителе вакцины	100 мкл (50 мкл на ногу)	10 мкг
C	20	IraB в разбавителе вакцины (положительный контроль)	100 мкл (50 мкл на ногу)	10 мкг
D	20	Адьювант	100 мкл (50 мкл на ногу)	н. о.
E	10	Не обработанные (отрицательный контроль)	н. о.	н. о.

[0195] После периода акклиматизации 200 мкл крови собирали от каждой мыши посредством кровотечения из ретроорбитального синуса под анестезией изофлураном, вводимым через высокоточный паровой ингалятор (Система для анестезии животных передвижной лаборатории VetEquip) при 40000 ppm $\pm$ 15% изофлурана в 100% O₂ с сохранением 1-2%. За мышами тщательно наблюдали после применения анестезии для правильного восстановления. Ушную бирку (стерилизованную 70% этанолом) и нанесенную с помощью стерилизованного (70% этанолом) аппликатора, размещали в центре ушной раковины каждого животного во время начального забора крови.

[0196] Во время процедур иммунизации введение осуществляли внутримышечно (IM) в соответствии с таблицей 2 выше. Осуществляли 3 вакцинации с разницей в 14 дней (иммунизация 1: день 0; иммунизация 2: день 13; иммунизация 3: день 21). Кровь получали до и после каждой вакцинации, а сыворотку отделяли для измерений уровня антител. Мышей заражали *S. flexneri* 2a в дозе $9,5 \times 10^7$ КОЕ в $\sim$ 10 мкл объема через примерно 4 недели после третьей прививочной дозы.

[0197] Уровень антител IgG сыворотки крови, специфичные для LPS, IraB и CRM *Shigella flexneri*, измеряли посредством ELISA. Рабочий раствор для каждого антигена готовили следующим образом: 5,0 мкг/мл очищенного штамма LPS 2457T, растворяли в карбонатном покрывающем буфере с pH 9,6, 0,2 мкг/мл очищенного IraB в 1X PBS с pH 7,4, 2,0 мкг/мл очищенного CRM в 1X PBS с pH 7,4. Впоследствии, титрационный микропланшет с U-образным дном Immulon 2HB

(Thermo Labsystems #3655) покрывали посредством добавления 100 мкл подходящего рабочего раствора в каждую лунку планшета. Планшеты затем инкубировали при 37°C в течение 3 ч. После этой инкубации планшеты шесть раз промывали PBS-Tween (0,05%) с двухминутным периодом замачивания между промывками. Затем планшеты блокировали в течение ночи при 4°C 1X PBS, содержащим 10% обезжиренное сухое молоко (NFDМ), при 250 мкл/лунку. После блокирования планшеты промывали снова, как указано выше.

[0198] Образцы для анализа и положительные контрольные образцы разбавляли в PBS-Tween 10% NFDМ и добавляли в планшеты. Образцы и положительные контрольные образцы тестировали в двух повторностях в сериях 2-кратного разбавления, выполненного на каждом планшете. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C и затем промывали PBS-Tween, как описано выше. Далее, козьи антитела к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (SeraCare #5220-0460) разбавляли до соотношения 1:1000 или 1:2000 соответственно в PBS-Tween 10% NFDМ. Во все лунки помещали 100 мкл подходящего раствора антител и планшеты инкубировали в течение 1 ч. при 37°C. Планшеты снова промывали и добавляли 100 мкл TMB Microwell Peroxidase Substrate (SeraCare #5120-0047) в каждую лунку. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте при перемешивании. Колориметрическую реакцию останавливали посредством добавления 100 мкл 1 М фосфорной кислоты во все лунки. Величины поглощения при 450 нм немедленно измеряли с применением микропланшетного ридера Multiskan FCTM.

[0199] На ФИГ. 12А и ФИГ. 12В показаны результаты заражений *S. flexneri 2a*. На ФИГ. 12А показан процент выживаемости после заражения *S. flexneri 2a*. Мыши, обработанные конъюгатом IраВ-OPS, демонстрировали 90% выживаемости через 8 дней по сравнению с 40% выживаемости в группах, обработанных конъюгатом CRM-OPS или квасцами отдельно. На ФИГ. 12В показан эксперимент титрования антител к OPS Elisa, демонстрирующий высокий уровень титра конъюгата IраВ-OPS по сравнению с IраВ и контрольными группами перед забором крови. Даже несмотря на то, что конъюгат CRM-OPS демонстрировал устойчивый титр, он не предоставлял такого же уровня защиты, как IраВ-OPS предоставлял мышам после иммунизации.

[0200] На ФИГ. 13А-Е показаны дополнительные результаты после заражения *S. flexneri*. Мыши, иммунизированные CRM-OPS, демонстрировали самый низкий средний вес через 8 дней после заражения (ФИГ. 13А). На ФИГ. 13В-Е показаны качественные результаты, измеренные по шкале 1-3, где самая высокая оценка указывала на худшее состояние. В целом, мыши, которым вводили квасцы, демонстрировали оценку, соответствующую наиболее тяжелому состоянию, в любой точке во время эксперимента (*например*, оценка 3 за состояние позы и шерсти), тогда как иммунизированные CRM-OPS мыши демонстрировали оценку, соответствующую наиболее тяжелому состоянию, через 8 дней после заражения в дополнение к высокой смертности, обсуждаемой ранее.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0201] Все ссылки, статьи, публикации, патенты, публикации патентов и заявки на патенты, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки во всех их полноте для всех целей. Однако, упоминание любой ссылки, статьи, публикации, патента, публикации патента и заявки на патент, цитируемых в данном документе, не является и не должно восприниматься в качестве подтверждения или любой формы предположения, что они представляют собой окончательный предыдущий уровень техники или образуют часть известного уровня техники в любой стране мира.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептидный антиген, представляющий собой плазмидный антиген инвазии В (IraB), содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту (npAA), включенную в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IraB, где npAA включена в положении, выбранном из K241, K262, K269, K283, K289, K299, C309, K312, S329, S333, D347, E360, K368, E372, K376, D380, K384, E387, D392, K394, K395, K397, K424, K429, K436, K440, K448, K451, K470 и K482 SEQ ID NO: 1.
2. Антиген IraB по п. 1, где npAA включена в положении, выбранном из K289, K299, K368, K395, K436 и K470.
3. Антиген IraB по п. 2, где полипептидный антиген IraB содержит npAA, включенную в каждом из положений K289, K368 и K395 SEQ ID NO: 1.
4. Антиген IraB по п. 3, где полипептидный антиген IraB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.
5. Антиген IraB по п. 2, где полипептидный антиген IraB содержит npAA, включенную в каждом из положений K299, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.
6. Антиген IraB по п. 5, где полипептидный антиген IraB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.
7. Антиген IraB по п. 2, где полипептидный антиген IraB содержит npAA, включенную в каждом из положений K299, K368 и K395 SEQ ID NO: 1.
8. Антиген IraB по п. 7, где полипептидный антиген IraB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.
9. Антиген IraB по п. 2, где полипептидный антиген IraB содержит npAA, включенную в каждом из положений K289, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.
10. Антиген IraB по п. 9, где полипептидный антиген IraB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.
11. Антиген IraB по п. 2, где полипептидный антиген IraB содержит npAA, включенную в каждом из положений K299, K395, K436 и K470 SEQ ID NO: 1.

12. Антиген IpaB по п. 11, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

13. Антиген IpaB по п. 2, где полипептидный антиген IpaB содержит nnAA, включенную в каждом из положений K299, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

14. Антиген IpaB по п. 13, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

15. Антиген IpaB по любому из пп. 1-14, где nnAA содержит клик-химическую реакционноспособную группу.

16. Антиген IpaB по п. 15, где nnAA выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации.

17. Антиген IpaB по п. 16, где nnAA представляет собой pAMF.

18. Антиген IpaB по пп. 1—17, конъюгированный с полисахаридом O-антигена *Shigella* (OPS).

19. Полипептидный антиген IpaB по п. 18, где OPS выбран из серотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7a, 7b или их комбинаций.

20. Полипептидный антиген IpaB по любому из пп. 1—19, где полипептидный антиген IpaB является очищенным.

21. Иммуногенная композиция, содержащая антиген IpaB по любому из пп. 1-20.

22. Иммуногенная композиция по п. 21, дополнительно содержащая по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

23. Иммуногенная композиция по п. 22, где по меньшей мере одно вспомогательное вещество выбрано из носителей, растворителей, эмульгаторов, стабилизаторов, консервантов, изотонических средств, буферных систем,

диспергирующих веществ, разбавителей, модификаторов вязкости и усилителей поглощения.

24. Иммуногенная композиция по любому из пп. 21—23, дополнительно содержащая адъювант.

25. Иммуногенная композиция по любому из пп. 21—24, составленная в виде стерильного раствора для инъекций.

26. Иммуногенная композиция по любому из пп. 21—24, составленная в лиофилизированной форме.

27. Способ экспрессии полипептидного антигена, представляющего собой плазмидный антиген инвазии В (IpaB), из бактерии рода *Shigella*, включающий экспрессию полипептидного антигена IpaB с применением бесклеточного синтеза белка в присутствии экзогенного белка-шаперона IpgC.

28. Способ по п. 27, где бактерия рода *Shigella* включает виды *Shigella*, выбранные из *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. Boydii* и *S. sonnei*.

29. Способ по п. 27 или по п. 28, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной с последовательностью полипептидного антигена IpaB дикого типа из бактерии рода *Shigella*.

30. Способ по п. 27 или по п. 28, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

31. Способ по п. 27, где по меньшей мере одна неприродная аминокислота (npAA) включена в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB.

32. Способ по п. 31, где по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 npAA включены в аминокислотную последовательность полипептидного антигена IpaB.

33. Способ по п. 31, где от 2 до 10 ппАА включены в аминокислотную последовательность полипептидного антигена ІраВ.

34. Способ по любому из пп. 31-33, где ппАА включена в одном или нескольких положениях, выбранных из K241, K262, K269, K283, K289, K299, C309, K312, S329, S333, D347, E360, K368, E372, K376, D380, K384, E387, D392, K394, K395, K397, K424, K429, K436, K440, K448, K451, K470 и K482 SEQ ID NO: 1.

35. Способ по любому из пп. 31—33, где ппАА включена в положении, выбранном из K289, K299, K368, K395, K436 и K470.

36. Способ по п. 31, где полипептидный антиген ІраВ содержит ппАА, включенную в каждом из положений K289, K368 и K395 SEQ ID NO: 1.

37. Способ по п. 36, где полипептидный антиген ІраВ содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

38. Способ по п. 31, где полипептидный антиген ІраВ содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

39. Способ по п. 38, где полипептидный антиген ІраВ содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

40. Способ по п. 31, где полипептидный антиген ІраВ содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K368 и K395 SEQ ID NO: 1.

41. Способ по п. 40, где полипептидный антиген ІраВ содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

42. Способ по п. 31, где полипептидный антиген ІраВ содержит ппАА, включенную в каждом из положений K289, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

43. Способ по п. 42, где полипептидный антиген ІраВ содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

44. Способ по п. 31, где полипептидный антиген ІраВ содержит ппАА, включенную в каждом из положений K299, K395, K436 и K470 SEQ ID NO: 1.

45. Способ по п. 44, где полипептидный антиген ІраВ содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

46. Способ по п. 31, где полипептидный антиген IpaB содержит nnAA, включенную в каждом из положений K299, K368, K395 и K436 SEQ ID NO: 1.

47. Способ по п. 44, где полипептидный антиген IpaB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

48. Способ по любому из пп. 31-44, где nnAA выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации.

49. Способ по п. 48, где nnAA представляет собой pAMF.

50. Способ по любому из пп. 27—49, где белок-шаперон IrgC содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 95% идентичной с SEQ ID NO: 8.

51. Способ по любому из пп. 27—50, дополнительно включающий очистку полипептидного антигена IpaB.

52. Способ по п. 51, где полипептидный антиген IpaB очищают способом, который обеспечивает присутствие по сути всего антигена в димерной форме в водном растворе.

53. Способ по п. 52, где полипептидный антиген IpaB очищают в присутствии детергента, эффективного для разрушения белка-шаперона IrgC без существенного влияния на полипептидный антиген IpaB.

54. Способ по п. 53, где детергент представляет собой лаурилдиметиламинооксид (LDAO).

55. Способ по п. 54, где LDAO присутствует в количестве 0,1% об./об. или меньше.

56. Очищенный антиген IpaB, полученный посредством способа по любому из пп. 27—54.

57. Способ иммунизации субъекта против *дизентерии*, вызванной *Shigella*, включающий введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26.

58. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26 для иммунизации субъекта против *дизентерии*, вызванной *Shigella*.

59. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26 при изготовлении лекарственного препарата для иммунизации субъекта против *дизентерии*, вызванной *Shigella*.

60. Способ по п. 57 или применение по п. 58 или по п. 59, где иммуногенную композицию вводят в виде внутримышечной инъекции.

61. Способ по п. 57 или применение по п. 58 или по п. 59, где иммуногенную композицию вводят трансмукозально.

62. Способ по п. 57 или применение по п. 58 или по п. 59, где иммуногенную композицию вводят однократно.

63. Способ по п. 57 или применение по п. 58 или по п. 59, где иммуногенную композицию вводят два или более раз.

64. Способ по п. 57 или применение по п. 58 или по п. 59, где у субъекта проявляются симптомы *дизентерии*, вызванной *Shigella*, и иммуногенную композицию вводят в качестве терапевтической вакцины.

65. Способ снижения риска развития у субъекта *дизентерийной* инфекции, вызванной *Shigella*, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26.

66. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26 для снижения риска развития у субъекта *дизентерийной* инфекции, вызванной *Shigella*.

67. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26 при изготовлении лекарственного препарата для снижения риска развития у субъекта *дизентерийной* инфекции, вызванной *Shigella*.

68. Способ по п. 65 или применение по п. 66 или по п. 67, где субъект имеет по меньшей мере один фактор риска развития *дизентерии*, вызванной *Shigella*.

69. Способ индуцирования защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella* у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26.

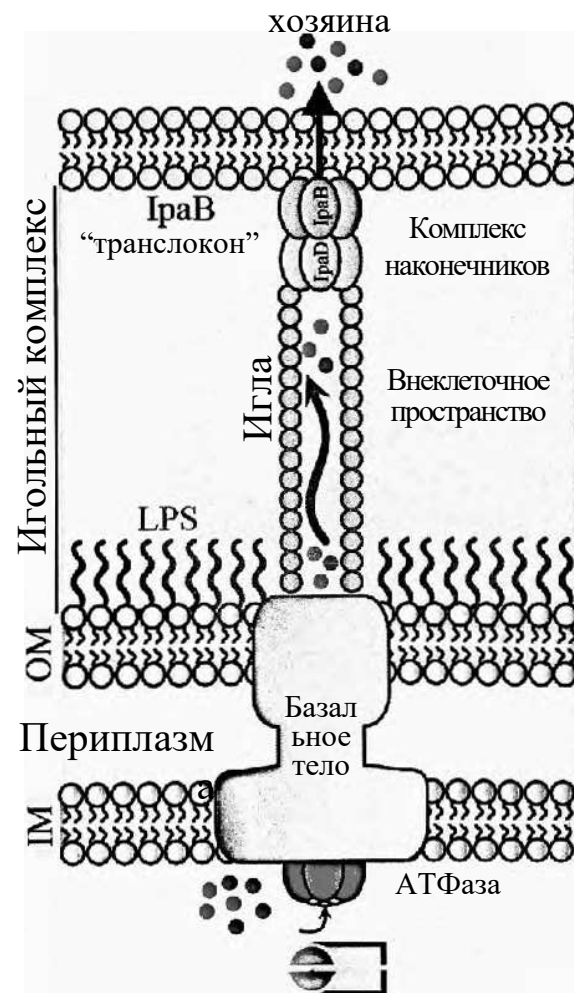
70. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26 для индуцирования защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella* у субъекта.

71. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 21—26 при изготовлении лекарственного препарата для индуцирования защитного иммунного ответа против бактерии рода *Shigella* у субъекта.

ФИГ. 1

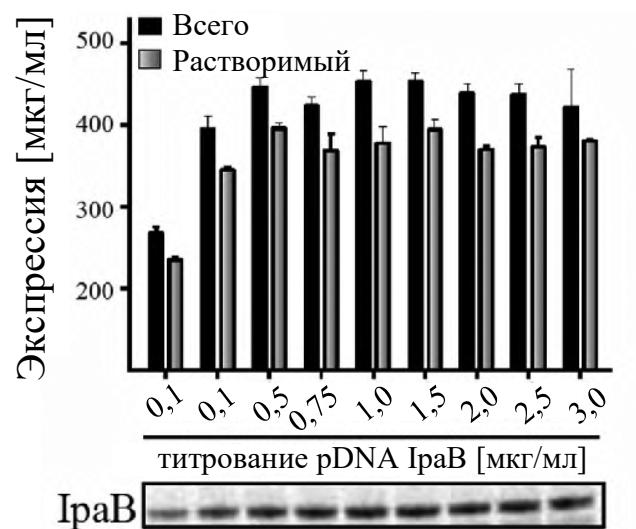
T3SA

Эффекторы, высвобожденные в цитозоль



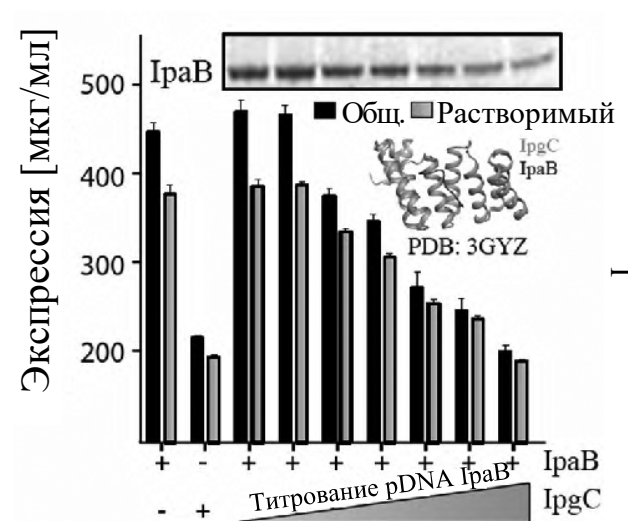
Бактериальный
цитозоль

ФИГ. 2



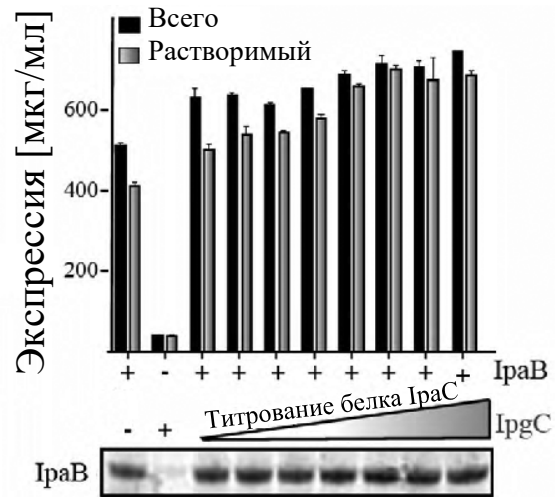
Экспрессия IpaB в зависимости от дозы pDNA

ФИГ. 3



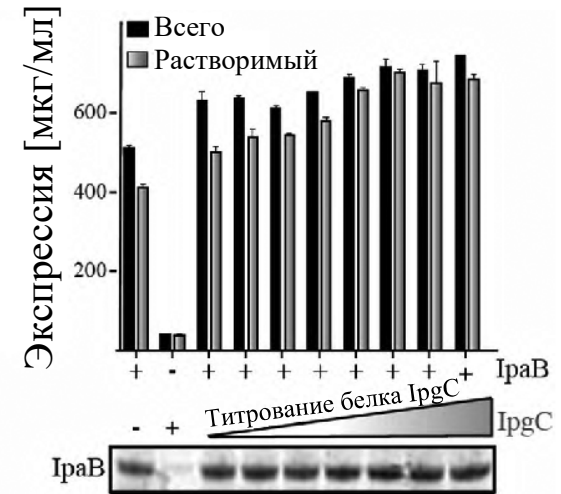
Коэкспрессия IpaB с титрованием pDNA IpgC

ФИГ. 4



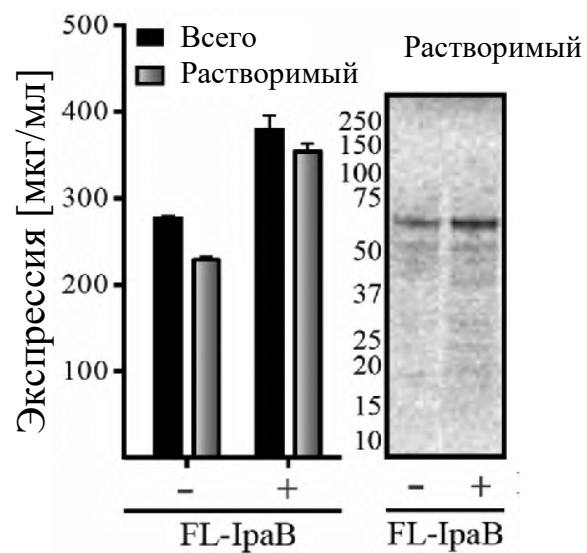
Экспрессия IraV с титрованием белка IrgC

ФИГ. 5

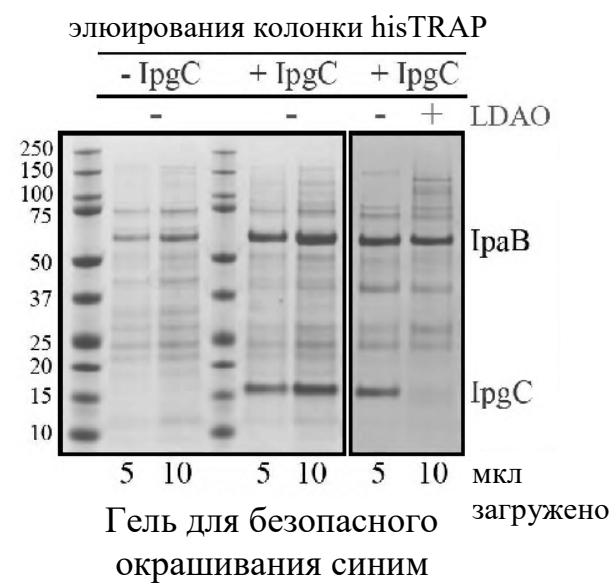


Шкала экспрессии IraV при к. т. с добавлением IrgC

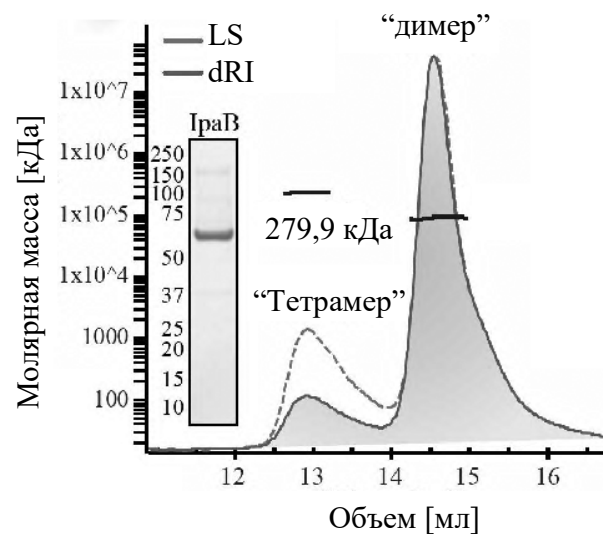
ФИГ. 6А



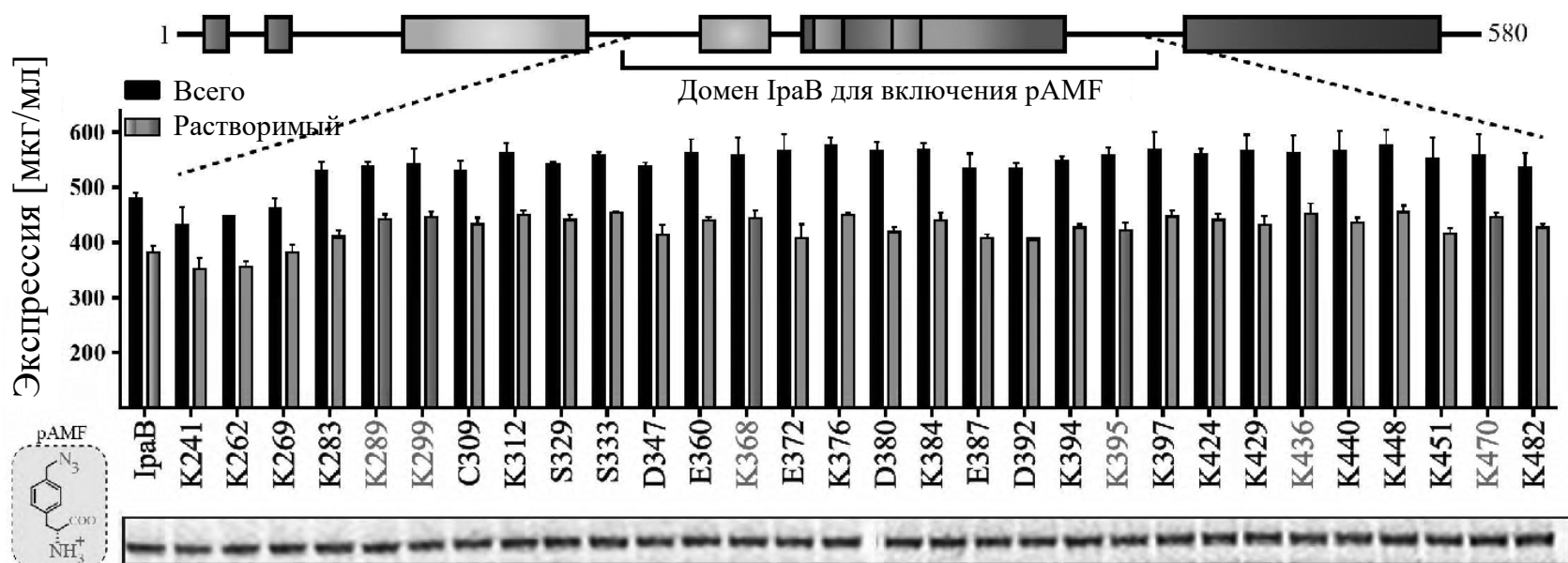
ФИГ. 6В



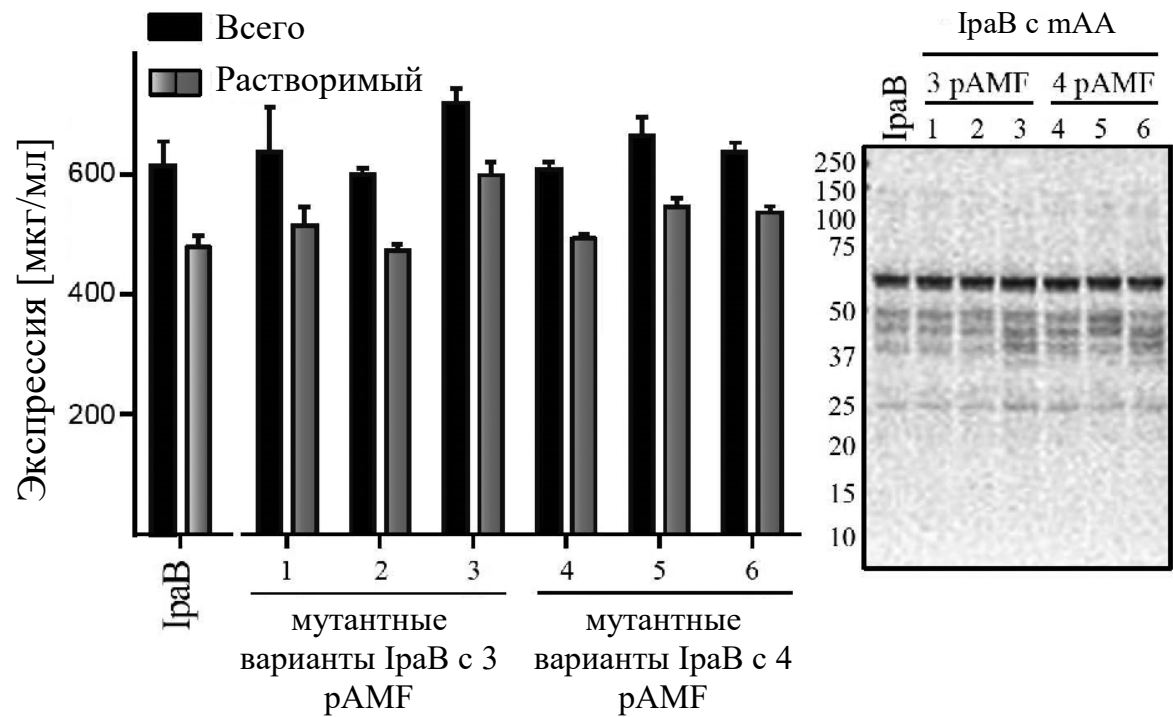
ФИГ. 6С



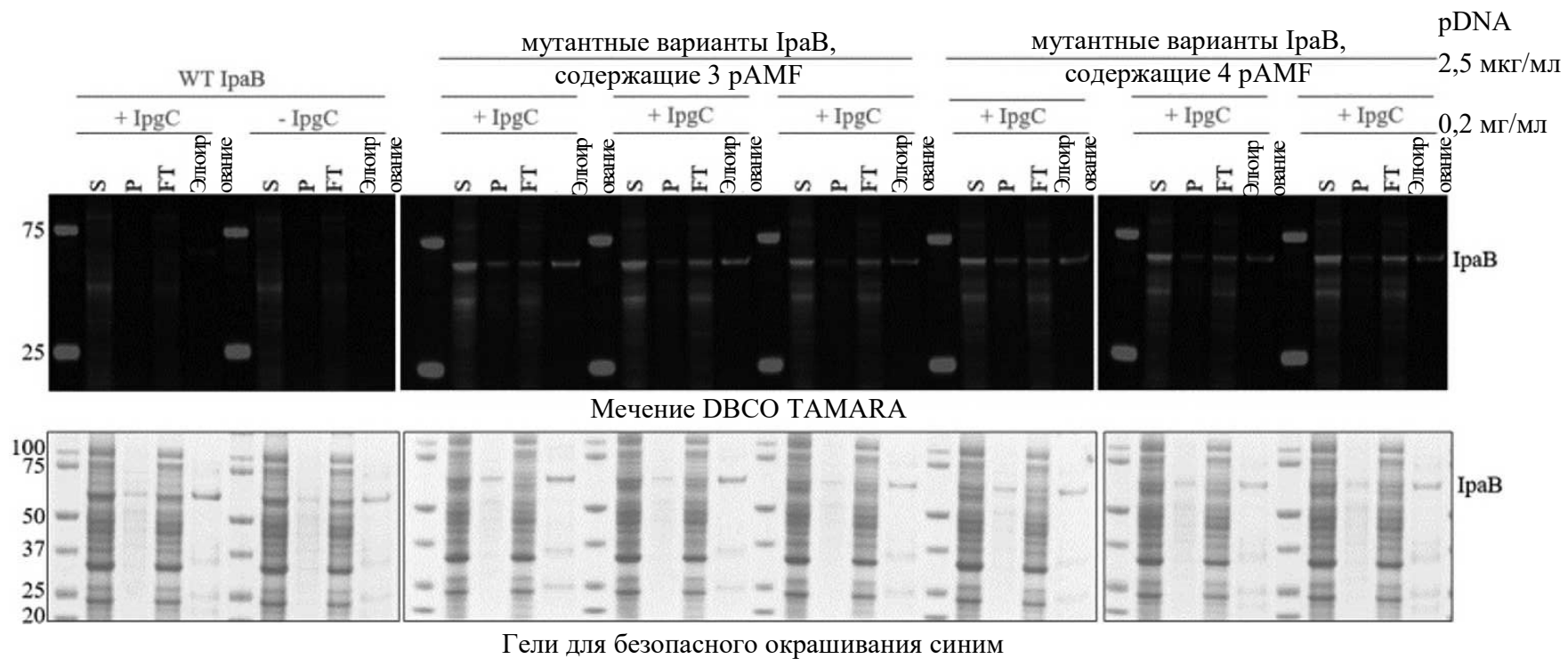
ФИГ. 7



ФИГ. 8

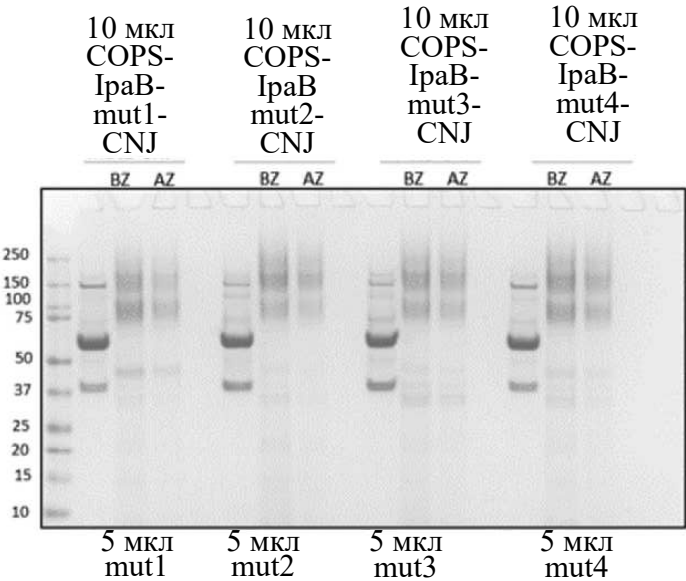


ФИГ. 9

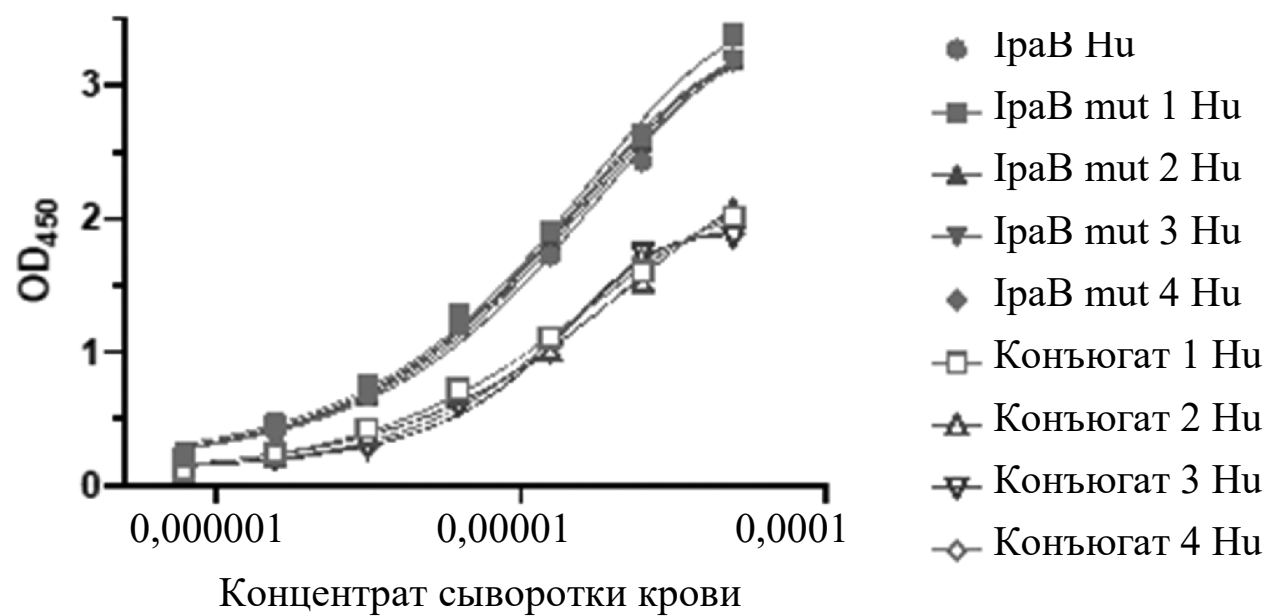


ФИГ. 10

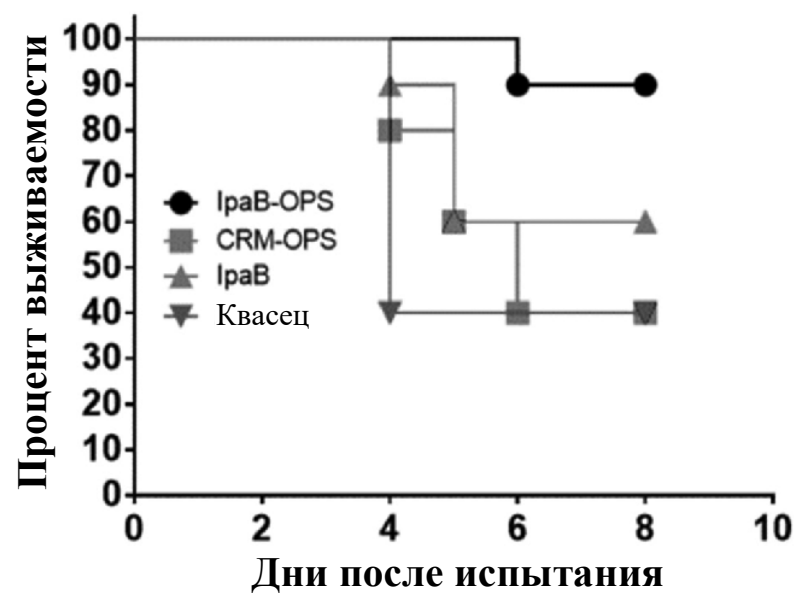
ID образца	Конц. После Zeba (мг/мл)	Осн. пик		Конц. После диализа (мг/мл)	Осн. пик
		CNJ Mw (кДа)	% свободного PS после Zeba		CNJ Mw (кДа)
Shigella-IpaB Мутантный вариант 1	0,27	372,20	61,08	0,10	529,20
Shigella-IpaB Мутантный вариант 2	0,53	216,30	47,45	0,13	282,20
Shigella-IpaB Мутантный вариант 3	0,30	224,50	84,75	0,16	318,30
Shigella-IpaB Мутантный вариант 4	0,33	276,80	69,26	0,12	381,40



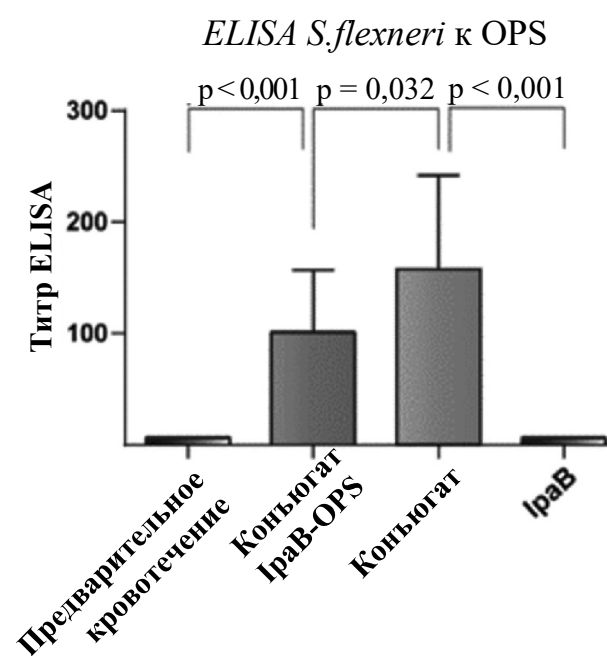
ФИГ. 11



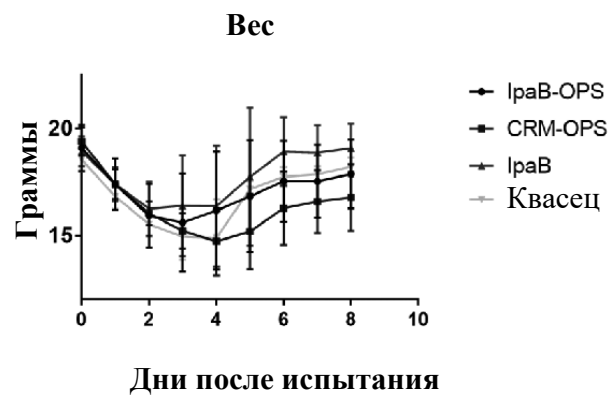
ФИГ. 12А



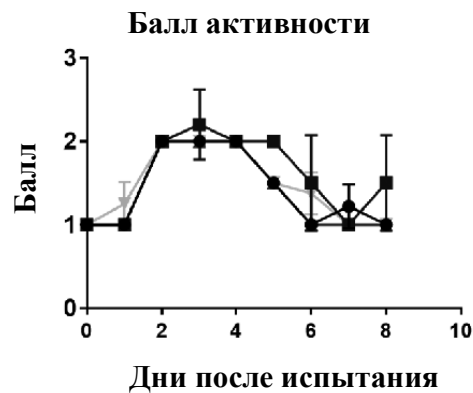
ФИГ. 12В



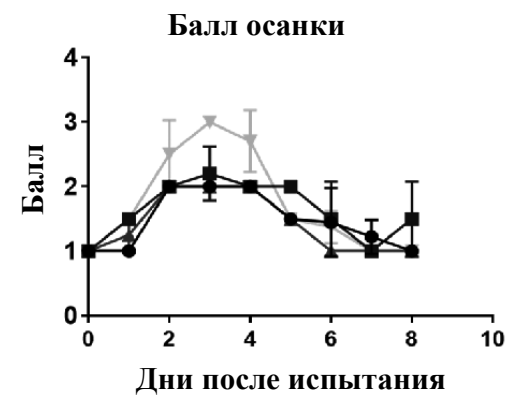
ФИГ. 13А



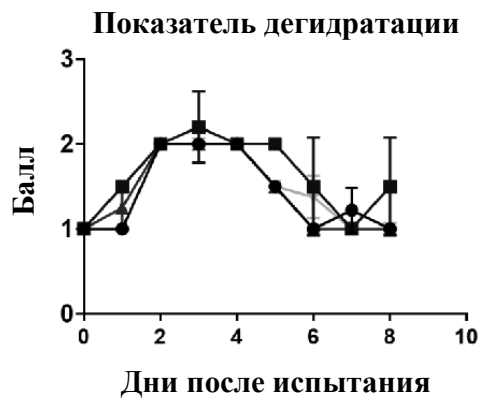
ФИГ. 13В



ФИГ. 13С



ФИГ. 13D



ФИГ. 13Е

