

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21)

202293551

(13)

A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.06

(51) Int. Cl. **C07K 14/195** (2006.01)
C07K 14/39 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.24

**(54) ПРИМЕНЕНИЯ, СПОСОБЫ И ПРОДУКТЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ОЛИГОМЕРНЫМ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДСВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКАМ**

(31) 2009730.9

(32) 2020.06.25

(33) GB

(86) PCT/EP2021/067413

(87) WO 2021/260144 2021.12.30

(71) Заявитель:
УНИВЕРСИТЕТ И ОСЛО (NO)

(72) Изобретатель:

**Хатлем Даниел, Линке Дирк (NO),
Барбирц Штефани Бригитте (DE)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предложено и описано применение олигомерного белка в качестве связывающего агента для связывания с липополисахаридом (LPS), где указанный олигомерный белок имеет суперспиральную структуру, содержащую по меньшей мере два мономерных пептида, где каждый из мономерных пептидов, которые могут быть одинаковыми или разными, способен образовывать α -спираль и содержит по меньшей мере одну сердцевинную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичность последовательности с гептадной повторяющейся последовательностью SEQ ID NO: 1. Также в настоящем изобретении предложены и описаны способы связывания, обнаружения и удаления LPS, и продукты, содержащие указанный олигомерный белок.

A1

202293551

202293551

A1

**Применения, способы и продукты, относящиеся к олигомерным
липополисахарид-связывающим белкам**

Область изобретения

Здесь описано применение олигомерного белка, имеющего суперспиральную структуру, в качестве связывающего агента для связывания с липополисахаридом (LPS). Также здесь описаны способы связывания, обнаружения и удаления LPS, и продукты, содержащие указанный олигомерный белок.

Предшествующий уровень техники

Липополисахариды, также известные как эндотоксины (термины “LPS” и “эндотоксин” используются здесь взаимозаменяемо), являются существенным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Они состоят из трёх структурных компонентов: группировки липида А; сердцевинного олигосахарида; и О-антигена. Компонент липида А содержит два фосфоглюкозаминовые молекулы с четырьмя О-связанными и двумя N-связанными ацильными цепями, которые встроены в наружную мембрану бактерий и, таким образом, заякоривает LPS в бактериальной мембране. Сердцевинный олигосахарид (COS) представляет собой неповторяющуюся структуру, состоящую из различных сахаров, и связан с липидом А через гликозидную связь. Наконец, О- антиген представляет собой полимер, состоящий из от 4 до 40 единиц повторяющейся структуры четырехсахарного мономера в среднем из 30 повторов (Peterson and McGroarty, 1985). О-антиген связан с предпоследним сахаром в COS на противоположном конце от липида А, хотя в некоторых формах LPS О-антиген отсутствует. LPS, лишенный О-антигена, традиционно называют “грубым” LPS, в отличие от “гладкого” LPS дикого типа (Hitchcock et al., 1986).

Компонент липида А в LPS и сахара, наиболее близкие к нему, являются высоко консервативными среди видов грамотрицательных бактерий, тогда как оставшийся сердцевинный олигосахарид и О-антиген значительно менее консервативны, и могут варьировать между бактериальными видами и даже между серотипами (Bertani and Ruiz, 2018).

Эндотоксины чрезвычайно токсичны для животных, особенно для человека, вследствие склонности липида А активировать толл-подобный рецептор 4, и, таким

образом, вызывают экстремальную иммунную реакцию, которая может вызвать сепсис и токсический шок в дозах всего лишь 1 мкг на кг массы тела. Из-за вездесущности грамотрицательных бактерий в биологических средах эндотоксины являются обычной примесью при производстве лекарственных средств, вакцин и лабораторного оборудования и реактивов. С учетом потенциального воздействия на здоровье, связанного с загрязнением эндотоксинами, крайне важно удалить, насколько это возможно, любой эндотоксин, который может присутствовать в продуктах, предназначенных для потребления человеком, до применения.

В настоящее время доступны различные способы и продукты для удаления эндотоксина. Для лабораторного применения они включают фильтры для центрифужной колонки или проточные колонки, заполненные смолой, которые связаны с одной или более чем одной эндотоксин-связывающей молекулы. Образец может наноситься на эти фильтры или колонки, и эндотоксин-связывающие молекулы будут связываться с любыми эндотоксинами, которые присутствуют, таким образом удаляя их из образца. Известные эндотоксин-связывающие молекулы, которые могут использоваться в этих продуктах, включают связывающий липид А антибиотик полимиксин В и полилизиновые полимеры, которые связывают эндотоксины посредством электростатических взаимодействий. Тем не менее, существуют проблемы с этими доступными в настоящее время эндотоксин-связывающими молекулами. Известно, что полимиксин В обладает связывающей аффинностью только в микромолярном диапазоне, в зависимости от рассматриваемого бактериального штамма, что делает его неподходящим для связывания с низкими концентрациями эндотоксина и удаления их из образца. Полилизин, между тем, имеет высокий положительный заряд и, таким образом, взаимодействует с отрицательно заряженными фосфатными группами липида А и сахарами сердцевинного олигосахарида неспецифическим образом. Поэтому этот механизм действия не подходит для применения при всех значениях pH или для всех типов LPS. Кроме того, он может также взаимодействовать с другими отрицательно заряженными молекулами, которые могут присутствовать в образце, и, следовательно, удалять их.

Другие способы включают ионообменную хроматографию. Она обычно используется в фармацевтической промышленности для очистки фармацевтических продуктов, и, как правило, основана на электростатических взаимодействиях между отрицательно заряженными LPS и положительно заряженным иммобилизованным

лигандом. Тем не менее, использование ионообменной хроматографии для удаления эндотоксинов из высокозаряженных образцов может быть проблематичным. Например, если образец содержит положительно заряженные частицы, то эти частицы будут конкурировать с иммобилизованным лигандом для захвата LPS. И наоборот, если образец содержит частицы с высоким отрицательным зарядом (не LPS), то эти частицы будут конкурировать с LPS за связывание с иммобилизованным лигандом. В обоих случаях эти нежелательные реакции снижают эффективность удаления LPS. Электростатические взаимодействия, которые лежат в основе методов ионообменной хроматографии, также могут быть нарушены в образцах с высокой ионной силой, и, таким образом, эти способы не являются подходящими для всех сценариев.

В дополнение к удалению эндотоксинов от образцов также желательно обнаруживать эндотоксины, таким образом, чтобы терапевтические продукты, устройства, реактивы и т.д. могли быть сертифицированы как “не содержащие эндотоксины” и поэтому безопасные для применения в терапевтических задачах. В этом отношении наиболее распространенным способом обнаружения эндотоксинов в настоящее время является анализ лизата амебоцитов *Limulus* (LAL). Анализ LAL одобрен FDA (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США) и EFSA (Европейское агентство по безопасности продуктов питания) для обнаружения эндотоксинов в медицинских и терапевтических продуктах с диапазоном обнаружения до концентрации 1 пикомоль (0,1 EU/мл). В этом анализе используется лизат клеток амебоцитов, обнаруженных в крови мечехвостов рода *Limulus*, который содержит сложную смесь белков и ферментов. В частности, анализ LAL основан на активности фермента “фактор С (фактор свертывания *limulus*)” (обычно известный просто как Фактор С), который запускается при связывании с LPS. Фактор С представляет собой сериновую протеазу трипсинового типа, которая активирует сложный каскад последующих ферментативных реакций, которые в конечном итоге указывают на присутствие LPS. Тем не менее, этот реакционный каскад также может быть активирован бета-глюканами, которые обычно встречаются в ряде бактерий, грибов и растений. Соответственно, бета-глюканы могут вызывать ложноположительные результаты в анализах LAL. Кроме того, лизат амебоцитов очень дорог в производстве, и современные способы производства не являются стабильными.

Чрезмерный вылов мечехвостов привел к призывам к разработке альтернативных методов обнаружения эндотоксина. Был разработан похожий анализ, в котором для

расщепления хромогенного субстрата используется рекомбинантно экспрессируемый фактор С, что позволяет обнаруживать LPS в большей степени прямым образом. Тем не менее, из-за сложности композиции цена по-прежнему высока.

Кроме того, активность фактора С может быть легко нарушена, например, из-за изменений температуры или pH, денатурирующих соединений, таких как органические растворители, мочевины или сильные детергенты, и ингибиторы протеазы. Между различными препаратами фактора С могут также наблюдаться изменения от партии к партии. Это затрудняет работу фермента, и означает то, что результаты, полученные с помощью анализов LAL, которые основаны на факторе С, часто не являются последовательными или воспроизводимыми.

Еще одной проблемой в обнаружении LPS, которая влияет на все способы обнаружения, является склонность LPS к агрегации. В области техники известно, что молекулы эндотоксина имеют тенденцию образовывать агрегаты в водных растворах. Эта агрегация усиливается присутствием катионов (в частности, двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} и Mg^{2+}) в растворе, и также присутствием детергентов, которые могут образовывать мицеллы вокруг LPS. Эта агрегация имеет эффект снижения количества измеряемого LPS в растворе и, следовательно, ингибирует обнаружение низких концентраций LPS. Этот эффект известен как “маскирование LPS”, и может быть вызван широким спектром различных агентов. Например, в образцах крови имеется множество соединений, которые могут маскировать LPS, таких как LPS-связывающие белки, антитела против LPS и двухвалентные катионы. Кроме того, молекулы эндотоксина из различных бактериальных источников могут иметь разные молекулярные массы, и могут проявлять различное поведение агрегации, что приводит к переменным результатам при измерении одной и той же концентрации LPS из разных источников. Соответственно, может быть полезно обеспечить улучшенный LPS-связывающий агент, который можно использовать для удаления или обнаружения LPS.

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения разработали новый LPS-связывающий агент в виде олигомерного белка, имеющего альфа-спиральную суперспиральную структуру.

Новый раскрытый здесь LPS-связывающий агент основан на альфа-спиральной суперспиральной структуре, которая может быть обнаружена в транскрипционном факторе дрожжей GCN4, где короткая С-концевая последовательность белка образует

высокостабильную димерную суперспиральную структуру, названную лейциновой молнией.

Соответственно, в первом аспекте здесь предложено применение олигомерного белка в качестве связывающего агента для связывания с липополисахаридом (LPS), где олигомерный белок имеет суперспиральную структуру, содержащую по меньшей мере 2 мономерных пептида, где каждый из мономерных пептидов, которые могут быть одинаковыми или разными, способен образовывать α -спираль и содержит по меньшей мере одну сердцевинную последовательность, имеющую последовательность по меньшей мере на 60% идентичную повторяющейся гептадной последовательности SEQ ID NO: 1.

В соответствии с характерной особенностью суперспиральных белков, которые содержат или состоят из амфипатических α -спиралей (или α -спиральных цепей), олигомерный суперспиральный белок имеет гидрофобную сердцевину. Гидрофобная сердцевина содержит гидрофобные остатки, обращенные друг на друга в структуре гидрофобной сердцевины.

Таким образом, в частности, сердцевинная последовательность пептидного мономера может содержать по меньшей мере 3 гептадных мотива a-b-c-d-e-f-g или их варианты, где каждый вариант содержит не больше чем 1 вставку или делецию в гептадном мотиве. Кроме того, в одном из воплощений по меньшей мере 50% аминокислотных остатков, соответствующих положениям a и d гептадных мотивов или их вариантов, представляют собой гидрофобные остатки. В еще одном воплощении по меньшей мере 75% аминокислотных остатков, соответствующих положениям a и d гептадных мотивов или их вариантов, представляют собой гидрофобные остатки.

Соответственно, в одном из воплощений этого аспекта здесь предложено применение олигомерного белка в качестве связывающего агента для связывания с липополисахаридом (LPS), где олигомерный белок имеет суперспиральную структуру, содержащую по меньшей мере 2 мономерных пептида, где каждый из мономерных пептидов, которые могут быть одинаковыми или разными, способен образовывать α -спираль и содержит по меньшей мере одну сердцевинную последовательность, имеющую последовательность по меньшей мере на 60% идентичную повторяющейся гептадной последовательности SEQ ID NO: 1, где указанная сердцевинная последовательность содержит по меньшей мере 3 гептадных мотива a-b-c-d-e-f-g или их варианты, где каждый вариант содержит не больше чем 1 вставку или делецию в

гептадном мотиве, где по меньшей мере 50% аминокислотных остатков, соответствующих положениям а и d гептадных мотивов или их вариантов, представляют собой гидрофобные остатки.

Композиция аминокислотных остатков гидрофобной сердцевины белка с суперспиральной сердцевиной не обязательно должна состоять полностью или исключительно из гидрофобных остатков, и могут быть представлены другие остатки, включая гидрофильные, например, полярные остатки. Таки образом, в некоторых воплощениях по меньшей мере 52,5, 55, 60, 62,5, 70 или 75% аминокислотных остатков, соответствующих положениям а и d гептадных мотивов или их вариантов, представляют собой гидрофобные остатки.

Во втором аспекте здесь предложен способ связывания LPS, где способ включает приведение в контакт LPS, или образца, содержащего LPS, с определенным здесь олигомерным белком для обеспечения связывания белка с LPS с образованием белково-липополисахаридного комплекса.

В одном из воплощений способ представляет собой способ *in vitro*.

В третьем аспекте здесь предложен набор для применения в качестве определенного здесь связывающего агента для связывания с LPS или для применения в определенном здесь способе связывания LPS, где указанный набор содержит:

- (1) определенный здесь олигомерный белок; и
- (2) по меньшей мере один неденатурирующий детергент.

Описанные здесь применение и способ могут быть предназначены для применения при обнаружении в образце LPS и/или удалении LPS из образца.

Вследствие способности связываться с широким диапазоном эндотоксинов с высокой аффинностью олигомерный белок в соответствии с настоящим изобретением подходит для использования для разнообразных применений, включающих связывание, обнаружение и удаление эндотоксина. В этой связи олигомерный белок в соответствии с настоящим изобретением может быть иммобилизован на твердом субстрате. Олигомерный белок может быть иммобилизован, например, на смоле для применения в колонке или фильтре, например, в фильтре центрифужной колонки или в проточной колонке, для связывания с эндотоксинами и удаления их из образца, нанесенного на указанный фильтр или колонку, как в изложенных выше способах удаления эндотоксинов. Олигомерный белок также может использоваться в системах обнаружения эндотоксинов как для обнаружения присутствия эндотоксинов в представленном

образце, и также для сертификации образцов, реактивов, продуктов и т.п. в отношении отсутствия эндотоксинов, когда эндотоксины не обнаруживаются. В этой связи олигомерный белок может находиться в виде конъюгата или слитого белка со вторым компонентом, такого как конъюгат с детектируемой группировкой или слитый белок с подходящим партнером слияния, для облегчения обнаружения эндотоксинов.

В четвертом аспекте здесь предложен продукт, содержащий определенный здесь олигомерный белок, иммобилизованный на твердом субстрате.

В соответствии с упомянутым выше, понятно, что определенный здесь олигомерный белок взаимодействует с LPS через компонент липида А. Таким образом, в пятом аспекте здесь предложено применение определенного здесь олигомерного белка в качестве связывающего агента для связывания с липидом А в LPS.

Аналогично, в шестом аспекте здесь предложен способ связывания липида А в LPS, где указанный способ включает приведение в контакт липида А или образца, содержащего липид А, с определенным здесь олигомерным белком для обеспечения связывания белка с липидом А с образованием белково-липополисахаридного комплекса.

В седьмом аспекте здесь предложен набор для применения в качестве определенного здесь связывающего агента для связывания с липидом А или для применения в определенном здесь способе связывания липида А, где указанный набор включает:

- (1) определенный здесь олигомерный белок; и
- (2) по меньшей мере один денатурирующий детергент.

Описанный здесь олигомерный белок представляет альтернативный связывающий агент для связывания с LPS. В одном из воплощений предложен улучшенный связывающий агент для LPS.

Предложенный здесь LPS-связывающий агент обладает множеством преимуществ. Кроме того, он может решать множество изложенных выше проблем, которые ассоциируются с известными способами связывания и обнаружения LPS.

С точки зрения обнаружения LPS описанный здесь олигомерный белок устраняет необходимость применения дорогостоящего лизата, полученного из мечехвостов, и устраняет проблемы единообразия и воспроизводимости, которые ассоциируются с применением способов обнаружения LPS, которые основаны на применении Фактора С, таких как анализ LAL, и его рекомбинантных вариантов.

Кроме того, описанный здесь олигомерный белок способен растворять агрегаты LPS. Соответственно, олигомерный белок может уменьшать маскировку LPS и эффективно увеличивать измеряемую концентрацию LPS в образце, содержащем такие агрегаты LPS. Это позволяет обнаруживать низкие концентрации LPS в образце.

Описанный здесь олигомерный белок содержит относительно короткую пептидную последовательность, и, таким образом, в некоторых воплощениях он может быть получен синтетически без необходимости в каких-либо биологических системах экспрессии.

Подробное описание изобретения

Раскрытый здесь олигомерный белок обладает олигомерной альфа-спиральной суперспиральной структурой. Суперспирали представляют собой повсеместно распространенные белковые элементы, состоящие из двух или более чем двух амфипатических α -спиралей, завитых в суперспиральные узлы (Lupas and Gruber, 2005). Ключевая характеристика амфипатических альфа-спиральных суперспиралей представляет собой повторяющийся гептадный мотив a-b-c-d-e-f-g, в котором позиции a и d преимущественно заняты гидрофобными остатками, а позиции b, c, e, f и g преимущественно заняты гидрофильными остатками. Альфа-спирали содержат 3,6 остатков на поворот, что означает то, что повторяющийся гептадный мотив расположен среди остатков в положениях a и d на одной и той же стороне спиральной структуры. Это облегчает образование высокостабильных суперспиралей с гидрофобными остатками, обращенными друг к другу, вследствие чего они названы гидрофобной сердцевинной, тогда как гидрофильные остатки направлены наружу. Следует отметить то, что хотя гидрофобная сердцевина суперспирального белка как правило содержит преимущественно гидрофобные остатки, не обязательно, чтобы все остатки в сердцевинной структуре были гидрофобными, и известны суперспиральные белки, которые могут включать другие остатки, расположенные в сердцевинной структуре, например, полярные остатки, которые тем не менее способны сохранять суперспиральную структуру.

Олигомерный белок, описанный здесь, основан на варианте последовательности лейциновой молнии белка GCN4, известном как CN4-pIL, где GCN4-p'ad' относится к аминокислотам, которые представлены в положениях a и d в гептадном мотиве. Продемонстрировано то, что путем мутации остатков гидрофобной сердцевинной, представленных в положениях a и d, в частности, путем варьирования отношения

остатков лейцина и изолейцина, представленных в этих позициях, возможно изменять предпочтительное олигомерное состояние белковой структуры из димеров в тримеры (GCN4-pII) и тетрамеры (GCN4-pLI) (Harbury et al., 1993; Delano and Brünger, 1994).

Стабильность этих суперспиральных элементов и их склонность образовывать олигомеры привело к применению суперспиральных структур GCN4 в качестве химерных удлинений (т.е. партнеров слияния), вызывающих олигомеризацию и стабилизацию олигомерных структур в слитых белках, а также для увеличения растворимости таких белков. В связи с этим авторы настоящего изобретения исходно предприняли попытку исследовать предполагаемое взаимодействие между LPS и двумя доменами, относящимися к тримерному ауто транспортеру адгезину SadA. Для исследования этого белка приготовили две конструкции SadA K9 и K14 (см. Пример 1 ниже), обе из которых стабилизировали путем ограничения по бокам сегментами GCN4-pII. Тем не менее, неожиданно обнаружили то, что адаптеры GCN4-pII, которые использовали для стабилизации конструкций SadA, демонстрировали чрезвычайно высокую аффинность в отношении LPS с K_D (константой диссоциации) в наномолярном диапазоне.

В соответствии с этим случайным открытием авторы настоящего изобретения разработали олигомерный белок, имеющий суперспиральную структуру, основанную на белке GCN4-pII, которую можно использовать в качестве связывающего агента для связывания с LPS. Дополнительные эксперименты выявили то, что взаимодействие между этим белком и LPS происходит путем связывания белка с компонентом липида А в LPS. В отмечено выше, структура компонента липида А является высококонсервативной среди грамотрицательных видов бактерий, и, таким образом, понятно, что олигомерный белок в соответствии с настоящим изобретением способен связываться с широким диапазоном бактериальных эндотоксинов с чрезвычайно высокой аффинностью. Кроме того, олигомерный белок в соответствии с настоящим изобретением может рекомбинантно сверхэкспрессироваться в типичных системах экспрессии и может быть очищен из телец включения без взаимодействия с какими-либо встречающимися в природе эндотоксинами, что обеспечивает широкомасштабную стабильную и экономически эффективную продукцию.

Описанный здесь олигомерный белок содержит по меньшей мере 2 мономерных пептида. Эти мономерные пептиды представляют индивидуальные субъединицы, которые вместе образуют олигомерный белок. Каждый мономер способен образовывать

альфа-спираль. Мономеры могут быть представлены в виде отдельных пептидов с точки зрения отдельных пептидных цепей или нитей, которые взаимодействуют вместе с образованием олигомерного белка. Таким образом, в таком воплощении пептидные мономеры могут рассматриваться как индивидуальные субъединицы белка, то есть, отдельные мономерные пептидные единицы. Таким образом, в некоторых воплощениях каждую альфа-спираль в олигомерном белке можно рассматривать как соответствующую отдельному мономеру.

В других воплощениях мономерные пептиды могут быть связаны вместе. Таким образом, мономерные пептиды могут быть связаны или соединены линкерными последовательностями. В таком воплощении олигомерный белок имеет одноцепочечный формат с точки зрения его первичной структуры или последовательности, хотя безусловно мономерные пептиды взаимодействуют с образованием олигомерной суперспиральной структуры, которая, как можно видеть, имеет “цепи”, которые взаимодействуют с образованием суперспиральной структуры. В таком воплощении мономерные пептиды можно рассматривать как домены одноцепочечной белковой последовательности. Более конкретно, олигомерный белок, как можно видеть, имеет 3D структуру, образованную мономерными пептидными доменами.

Каждый мономерный пептид содержит по меньшей мере одну сердцевинную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью последовательности с повторяющейся гептадной последовательностью SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 представляет вариант последовательности модельного пептида GCN4-pII, который основан на последовательности в результате димеризации мотива по С-концу белка GCN4, и который содержит повторяющийся гептадный мотив a-b-c-d-e-f-g, где изолейциновые остатки представлены в положениях a и d в мотиве, как представлено ниже. В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность может обладать по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 1.

Идентичность последовательности может быть определена при помощи любого из подходящих средств, известных в области техники, например, с использованием базы данных белков SWISS-PROT с использованием FASTA pep-cmp с переменным pamfactor, и штрафом за пропуск, равным 12,0, и штрафом за удлинение пропуска, равным, 4,0, и

окном в 2 аминокислоты. Другие программы определения идентичности аминокислотной последовательности включают программу BestFit в 10 версии пакета программ Genetics Computer Group (GCG) от University of Wisconsin. В этой программе используется алгоритм локальной гомологии Smith и Waterman со значениями по умолчанию: штраф за пропуск - 8, штраф за удлинение пропуска = 2, среднее совмещение = 2,912, среднее ошибочное спаривание = -2,003. В одном из воплощений указанное сравнение осуществляют вдоль всей длины сердцевинной последовательности.

SEQ ID NO: 1:

M K Q I E D K I E E I L S K I Y H I E N E I A R I K K L I K

d e f g a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g a

Можно видеть то, что SEQ ID NO: 1 содержит несколько повторов гептадного мотива a-b-c-d-e-f-g. Как изображено выше, остатки a и d представляют собой I. Тем не менее, как будет обсуждаться более подробно ниже, они могут варьировать, и в одном из воплощений они могут представлять собой I или L, или их производные, или другие гидрофобные остатки. Как указано выше, не все остатки a и d в гептадном мотиве должны быть гидрофобными. Этого достаточно для того, чтобы образовывалось достаточное количество гидрофобных остатков для образования олигомерной суперспиральной структуры. Это может зависеть от контекста последовательности и других остатков, которые представлены в последовательности мономерных пептидов.

В одном из воплощений сердцевинная последовательность каждого мономерного пептида содержит по меньшей мере 3 гептадных мотива a-b-c-d-e-f-g или их варианты. Хотя гептадный мотив обычно обозначается как a-b-c-d-e-f-g, тогда на практике отсутствует требование того, чтобы гептадная повторяющаяся последовательность в сердцевинной последовательности начиналась с позиции a. Повторы мотива, где за позицией g следует позиция a и, таким образом, гептадный мотив может начинаться с любой позиции, при условии, что она содержит все 7 позиций a-b-c-d-e-f-g в последовательном порядке. Соответственно, например, мотив d-e-f-g-a-b-c представляет собой подходящий гептадный мотив.

В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность может содержать один или более чем один вариант гептадного мотива a-b-c-d-e-f-g, где каждый вариант содержит не больше чем одну вставку или делецию в гептадном мотиве. Эти варианты гептадного мотива a-b-c-d-e-f-g, содержащие вставку или делецию, совокупно названы

как “варианты мотива”. В этом контексте термины “вставка” и “делеция” относятся к добавлению одного остатка в гептадный мотив и удалению одного остатка из гептадного мотива, соответственно.

Вставка или делеция может быть осуществлена по любой позиции в гептадном мотиве, включая любой конец гептадного мотива. Например, рассматривая вставку остатка X в мотив a-b-c-d-e-f-g, получающийся в результате мотив может представлять собой X-a-b-c-d-e-f-g, a-X-b-c-d-e-f-g, a-b-X-c-d-e-f-g и т.п. Важно то, что можно видеть то, что маркировка оставшихся позиций в мотиве остается без изменения. Это применимо к случаям как вставок, так и делеций. Таким образом, например, если остаток в положении b удален, тогда оставшийся мотив может содержать последовательность a-c-d-e-f-g.

Вставка или делеция нескольких последовательных остатков не рассматривается как она вставка или делеция. Соответственно, по меньшей мере три гептадных мотива или варианта мотивов, представленных в каждой сердцевинной последовательности, не должны содержать дополнительные вставки и делеции в гептадный мотив a-b-c-d-e-f-g помимо общего количества вариантов мотивов, которые представлены. Вставки или делеции, которые являются смежными друг относительно друга в сердцевинной последовательности, допустимы только в том случае, если они расположены по смежным концам последовательных вариантов мотивов, и если каждый из последовательных вариантов мотивов содержит только одну вставку или делецию. В таком случае соседние вставки/делеции могут быть рассмотрены как продукт двух отдельных вставок/делеций в двух отдельных вариантах мотивов.

В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность содержит по меньшей мере 4 гептадных мотива или вариантов мотивов. В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность содержит от 3 до 5 гептадных мотивов или вариантов мотивов. Например, сердцевинная последовательность может содержать 3, 4 или 5 гептадных мотивов или вариантов мотивов. В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность может содержать по меньшей мере 3 гептадных мотива и ни один из вариантов мотивов. В других воплощениях сердцевинная последовательность может содержать по меньшей мере 3 варианта мотивов и ни один из гептадных мотивов. Кроме того, сердцевинная последовательность может содержать любую комбинацию по меньшей мере 3 гептадных мотивов и вариантов мотивов, и эти гептадные мотивы и варианты мотивов могут быть расположены в любой последовательности.

Как обсуждалось выше, суперспиральные белковые структуры зависят от координированного расположения гидрофобных остатков в повторяющемся гептадном мотиве, представленном в каждой альфа-спирали. Гидрофобные остатки в каждой альфа-спирали расположены таким образом, что они преимущественно представлены на одной поверхности этой альфа-спирали. В качестве альтернативы, остатки в каждой альфа-спирали расположены таким образом, что остатки, представленные на одной поверхности этой альфа-спирали преимущественно являются гидрофобными. Это обеспечивает то, что гидрофобные поверхности каждой альфа-спирали в олигомерном белке образует стабильную гидрофобную сердцевину в центре белковой структуры. Не является существенным, чтобы гидрофобные остатки были представлены как в положении a, так и в положении d, в каждом повторе гептадного мотива, но, как правило, большинство этих позиций заняты гидрофобными остатками. Для обеспечения этой структуры в определенном здесь олигомерном суперспиральном белке в одном из воплощений в сердцевинной последовательности по меньшей мере 50% аминокислотных остатков, соответствующих положениям a и d гептадных мотивов или их вариантов, представляют собой гидрофобные остатки. В соответствии с представленным на вышеприведенной схеме позиции a и d гептадного мотива в SEQ ID NO: 1 представлены положениями 4, 8, 11 15, 18, 22, 25 и 29 последовательности. Таким образом, можно видеть то, что, в качестве альтернативного определения, по меньшей мере 50% аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 4, 8, 11 15, 18, 22, 25 и 29 в SEQ ID NO.1, представляют собой гидрофобные остатки. Таким образом, в одном из воплощений по меньшей мере 4 из 8 позиций “a” или “d” в повторяющейся гептадной последовательности SEQ ID NO.1 представляют собой гидрофобные остатки.

Более конкретно, по меньшей мере 52,5%, 55%, 60%, 62,5% или 70% аминокислотных остатков, соответствующих положениям a и d гептадных мотивов, в повторяющейся гептадной последовательности SEQ ID NO: 1 являются гидрофобными. Тем не менее, в одном из типичных воплощений по меньшей мере 75% аминокислотных остатков, соответствующих положениям a и d гептадных мотивов в повторяющейся гептадной последовательности SEQ ID NO: 1, являются гидрофобными. Таким образом, в одном из воплощений по меньшей мере 6 из 8 позиций “a” или “d” в повторяющейся гептадной последовательности SEQ ID NO.1 представляют собой гидрофобные остатки.

В качестве типичного примера в последовательности SEQ ID NO: 1 по меньшей мере 4, 5, 6 или 7 из остатков а или d или позиций, соответствующих положениям 4, 8, 11 15, 18, 22, 25 и 29 в SEQ ID NO.1, могут представлять собой гидрофобные остатки.

На основании знания о суперспиральных белковых структурах и последовательностях специалисту в данной области техники было бы в пределах обычной квалификации осуществлять модификации последовательностей, включая замену остатков в положениях а и d относительно других позиций в гептадном мотиве с получением суперспиральных структур, основанных на модифицированных вариантах или вариантах пептида с SEQ ID NO: 1.

Используемый здесь термин “гидрофобные остатки” включает остатки любой аминокислоты, которая рассматривается или идентифицирована в области техники как гидрофобная. Такие аминокислоты включают следующие протеогенные аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, аланин, метионин, фенилаланин, пролин и глицин. Тем не менее, в одном из воплощений гидрофобные остатки выбраны из аминокислот: лейцина, изолейцина, валина, аланина, метионина, фенилаланина или их химических производных. В еще одном воплощении гидрофобные остатки выбраны из: лейцина, изолейцина, валина, аланина и метионина и химических производных этих аминокислот. Гидрофобные остатки, представленные в сердцевинной последовательности, также могут включать нетипичные гидрофобные аминокислоты, т.е. гидрофобные аминокислоты, обладающие боковой цепью, которые не кодируются стандартным генетическим кодом. В частности, сюда включены фторпроизводные этих аминокислот, такие как фторизолейцин и фторлейцин. Другие известные производные включают селенопроизводные, например селенометионин. Дополнительные примеры таких нетипичных гидрофобных аминокислот, включая D-аминокислотные варианты (когда включены D-аминокислоты, все аминокислоты могут представлять собой D-аминокислоты), L-N-метиламинокислотные варианты, D- α -метиламинокислотные варианты и D-N-метиламинокислотные варианты типичных гидрофобных аминокислот, определенных выше, перечислены в таблице 1 ниже.

Таблица 1

Нетипичная аминокислота	Код	Нетипичная аминокислота	Код
α -аминомасляная кислота	Abu	L-N-метилаланин	Nmala

α -амино- α -метилбутират	Mgab	L-N-метилизолейцин	Nmile
аминоциклопропан-карбоксилат	Cpro	L-N-метиллейцин	Nmleu
аминоизомасляная кислота	Aib	L-N-метилвалин	Nmval
аминонорборнил-карбоксилат	Norb	L-N-метилэтилглицин	Nmetg
α -метил- γ -аминобутират	Mgab	L-N-метилметионин	Nmmet
γ -аминомасляная кислота	Gabu	L-N-метилнорвалин	Nmnva
циклогексилаланин	Chexa	L-N-метилнорлейцин	Nmnle
циклопентилаланин	Cpen	L-N-метил- <i>mpet</i> -бутилглицин	Nmtbug
D-аланин	Dal	пеницилламин	Pen
D-валин	Dval	α -метициклогексилаланин	Mchexa
D-лейцин	Dleu	α -метил-аминоизобутират	Maib
D-изолейцин	Dile	α -нафтилаланин	Anap
D-метионин	Dmet	α -метициклопентилаланин	Mcpen
N-циклопропилглицин	Ncpro	α -метил- α -нафтилаланин	Manap
N-циклобутилглицин	Ncbut	α -метилпеницилламин	Mpen
N-циклогексилглицин	Nchex	L-норлейцин	Nle
N-циклогептилглицин	Nchep	L-норвалин	Nva
N-циклооктилглицин	Ncoct	L-метилэтилглицин	Metg
N-циклодецилглицин	Ncdec	L- <i>mpet</i> -бутилглицин	Tbug
N-циклоундецилглицин	Ncund	L-этилглицин	Etg
N-циклододецилглицин	Ncdod	L- α -метилнорлейцин	Mnle
N-(2,2-дифенилэтил)глицин	Nbhm	L- α -метилаланин	Mala
N-метилпеницилламин	Nmpen	L- α -метил- <i>mpet</i> -бутилглицин	Mtbug
N-метилциклогексилаланин	Nmchexa	L- α -метилизолейцин	Mile
N-метилциклопентилаланин	Nmcpen	L- α -метиллейцин	Mleu
N-метилглицин	Nala	L- α -метилметионин	Mmet
N-(1-метилпропил)глицин	Nile	L- α -метилнорвалин	Mnva
N-(2-метилпропил)глицин	Nleu	L- α -метилвалин	Mval
N-(3,3-дифенилпропил)глицин	Nbhe	N-(1-метилэтил)глицин	Nval
N-(2-метилтиоэтил)глицин	Nmet		
D- α -метилаланин	Dmala		
D- α -метилизолейцин	Dmile		
D- α -метиллейцин	Dmleu		
D- α -метилметионин	Dmmet		
D-N-метилаланин	Dnmala		
D-N-метилизолейцин	Dnmile		
D-N-метиллейцин	Dnmleu		
D-N-метилметионин	Dnmmet		

D-N-метилвалин	Dnmval
N-бензилглицин	Nphe
N-метилнафтилаланин	Nmanap
N-метиламиноизобутират	Nmaib

В некоторых воплощениях по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% аминокислотных остатков, соответствующих положениям а и d гептадных мотивов или их вариантов, представляют собой гидрофобные остатки. В качестве альтернативы, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 и 29 в SEQ ID NO.1, представляют собой гидрофобные остатки.

В некоторых воплощениях 100% аминокислотных остатков, соответствующих положениям а и d гептадных мотивов или их вариантов, представляют собой гидрофобные остатки. В качестве альтернативы, 100% аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 и 29 в SEQ ID NO.1, представляют собой гидрофобные остатки.

Все гидрофобные остатки в сердцевинной последовательности могут быть одинаковыми или они могут отличаться друг от друга. В некоторых воплощениях каждый гидрофобный остаток в гептадных мотивах или их вариантах независимо выбран из группы, состоящей из лейцина, изолейцина, валина, аланина, метионина и их химических производных, включая их фторопроизводные. В одном из воплощений каждый гидрофобный остаток в гептадных мотивах или их вариантах независимо выбран из группы, состоящей из лейцина, изолейцина, валина, метионина и их химических производных, включая их фторопроизводные или селенопроизводные. В одном из воплощений каждый гидрофобный остаток в гептадных мотивах или их вариантах независимо выбран из группы, состоящей из лейцина, изолейцина и их химических производных, например, фторлейцина и фторизолейцина.

В некоторых воплощениях по меньшей мере 50% гидрофобных остатков в гептадных мотивах или их вариантах представляют собой изолейцин или фторизолейцин. В некоторых воплощениях по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% гидрофобных остатков в гептадных мотивах или их вариантах представляют собой изолейцин или фторизолейцин. В некоторых воплощениях 100% гидрофобных остатков в гептадных мотивах или их вариантах представляют собой изолейцин или фторизолейцин.

Остатки, которые не образуют часть гидрофобной сердцевины суперспиральной структуры, т.е. остатки в положениях b, c, e, f и g, как правило находятся ближе к поверхности белка, и, таким образом, обращены в окружающую среду. Идентичность этих остатков не является критичной и они могут варьировать. В некоторых воплощениях по меньшей мере 50% аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g, представляют собой полярные остатки. В некоторых воплощениях по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98, или 99% аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g, представляют собой полярные остатки. В некоторых воплощениях 100% аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g, представляют собой полярные остатки.

Используемый здесь термин “полярные остатки” включает остаток любой аминокислоты, рассматриваемой или идентифицированной в области техники как полярная. Это включает заряженные аминокислоты. Полярный аминокислотный остаток может быть выбран из остатков аминокислот: серина, треонина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, гистидина, аргинина, лизина, тирозина, цистеина, триптофана, метионина и химических производных этих аминокислот. В одном из воплощений полярный аминокислотный остаток может быть выбран из остатков аминокислот: серина, треонина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, гистидина, аргинина, лизина, тирозина. Кроме того, полярные остатки, представленные в сердцевинной последовательности, также могут включать нетипичные полярные аминокислоты, т.е. полярные аминокислоты, обладающие боковой цепью, которые не кодируются стандартным генетическим кодом. Примеры таких нетипичных полярных аминокислот, включающие D-аминокислотные варианты, амидные изостерические варианты (такие как N-метиламид, ретрообращенный амид, тиаамид, тиозфир, фосфонат, кетометилен, гидроксиметилен, фторвинил, (E)-винил, метиленамино, метилентио или алкан), L-N-метиламинокислотные варианты, D- α метиламинокислотные варианты и D-N-метиламинокислотные варианты типичных полярных аминокислот, определенных выше, перечислены в таблице 2 ниже. Как указано выше, когда используют D-аминокислоты, тогда все аминокислоты в мономерных пептидах могут представлять собой D-аминокислоты.

Таблица 2

Нетипичная аминокислота	Код	Нетипичная аминокислота	Код
L-N-метиларгинин	Nmarg	D- α -метилтреонин	Dmthr
N-(4-аминобутил)глицин	Nglu	D- α -метилсерин	Dmser
L-N-метиласпарагин	Nmasn	D- α -метилтирозин	Dmtyr
L-N-метиласпарагиновая кислота	Nmasp	N-(2-аминоэтил)глицин	Naeg
L-N-метилглутамин	Nmgln	N-(3-аминопропил)глицин	Norn
L-N-метилглутаминовая кислота	Nmglu	N-амино- α -метилбутират	Nmaabu
L-N-метилгистидин	Nmhis	N-(имидазоллилэтил)глицин	Nhis
L-N-метиллизин	Nmlys	N-(<i>napa</i> -гидроксифенил)глицин	Nhtyr
L-N-метилорнитин	Nmorn	N-(3-гуанидинопропил)глицин	Narg
L-N-метилтреонин	Nmthr	N-(1-гидроксиэтил)глицин	Nthr
L-N-метилтирозин	Nmtyr	N-(гидроксиэтил)глицин	Nser
L-N-метилсерин	Nmser	N-(2-карбоксиэтил)глицин	Nglu
D-аргинин	Darg	D-N-метиларгинин	Dnmarg
D-аспарагиновая кислота	Dasp	D-N-метиласпарагин	Dnmasn
D-глутамин	Dgln	D-N-метиласпартат	Dnmasp
D-глутаминовая кислота	Dglu	D-N-метилглутамин	Dnmgln
D-гистидин	Dhis	D-N-метилглутамат	Dnmglu
D-лизин	Dlys	D-N-метилгистидин	Dnmhis
D-орнитин	Dorn	D-N-метиллизин	Dnmlys
D-серин	Dser	D-N-метилорнитин	Dnmorn
D-треонин	Dthr	D-N-метилсерин	Dnmser
D-тирозин	Dtyr	D-N-метилтирозин	Dnmtyr
D- α -метиларгинин	Dmarg	D-N-метилтреонин	Dnmthr
D- α -метиласпарагин	Dmasn	L- α -метиларгинин	Marg
D- α -метиласпартат	Dmasp	L- α -метиласпарагин	Masn
D- α -метилглутамин	Dmgln	L- α -метилглутамат	Mglu
D- α -метилгистидин	Dmhis	L- α -метиллизин	Mlys
D- α -метиллизин	Dmlys	L- α -метилорнитин	Morn
D- α -метилорнитин	Dmorn	L- α -метилтреонин	Mthr
L- α -метилсерин	Mser		
L- α -метиласпартат	Masp		
L- α -метилглутамин	Mgln		
L- α -метилгистидин	Mhis		
L- α -метилтирозин	Mtyr		
N-(N-(2,2-дифенилэтил) карбамилметил)глицин	Nnbhm		

N-(N-(3,3-дифенилпропил) карбамилметил)глицин	Nnbhe
1-карбокси-1-(2,2-дифенил- этиламино)циклопропан	Nmbc
L-O-метилсерин	Omser
L-O-метилгомосерин	Omhse

Хотя последовательное расположение гидрофобных и полярных аминокислот в гептадном мотиве ответственно за структуру суперспиральных белков, общие правила, относящиеся к расположению остатков, не являются неизменными. Таким образом, равно как не каждый остаток, соответствующий позиции a или d в гептадном мотиве или его вариантах сердцевинной последовательности, должен быть гидрофобным, аналогично, не каждый остаток, соответствующий положениям b, c, e, f или g в гептадном мотиве или его вариантах сердцевинной последовательности, должен быть полярным. В некоторых воплощениях по меньшей мере 5% аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g, могут представлять собой алифатические остатки. В некоторых воплощениях по меньшей мере 10% или по меньшей мере 15% аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g, могут представлять собой алифатические остатки.

Используемый здесь термин “алифатические остатки” включает аминокислоты: глицин, аланин, изолейцин, лейцин, пролин, валин и метионин, и химические производные этих аминокислот, в частности, их фторпроизводные, включая фторлейцин и фторизолейцин. Кроме того, алифатические остатки, представленные в сердцевинной последовательности, также могут включать нетипичные алифатические аминокислоты, т.е. алифатические аминокислоты, обладающие боковой цепью, которые не кодируются стандартным генетическим кодом, такие как варианты D-аминокислот, и другие нетипичные алифатические аминокислоты.

Сердцевинная последовательность может содержать определенную процентную долю полярных остатков, определенных выше, и определенную процентную долю алифатических остатков, определенных выше. Например, в некоторых воплощениях по меньшей мере 50% (или больше, как определено выше) аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g, могут представлять собой полярные остатки, и по меньшей мере 5% (или больше, как определено выше) аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g, могут представлять собой алифатические

полярные остатки. Тем не менее, это не является существенным, и как указано выше, может варьировать.

В некоторых воплощениях определенная здесь сердцевинная последовательность может быть ограничена с одной или обеих сторон фланкирующей аминокислотной последовательностью. Если сердцевинная последовательность ограничена по обеим сторонам, тогда фланкирующая последовательность на одной стороне сердцевинной последовательности может быть такой же как фланкирующая последовательность на другой стороне сердцевинной последовательности или может отличаться от нее. Фланкирующая последовательность может образовывать или может не образовывать часть суперспиральной структуры олигомерного белка. Таким образом, фланкирующая последовательность может вносить вклад или быть частью α -спиральной структуры мономерного пептида и/или может иным образом вносить вклад или образовывать часть суперспиральной структуры, или она может быть отдельной частью последовательности мономерного пептида. Фланкирующая последовательность может быть использована для осуществления различных функций или придания свойства олигомерному белку. Например, она может быть использована для удлинения повторяющейся гептадной последовательности мономерного пептида, для способствования олигомеризации мономерных пептидов, для связывания мономерных пептидов (например, в одноцепочечной конструкции), или для введения отдельной функциональной группировки в олигомерный белок.

Длина фланкирующей последовательности не является критичной, и она может варьировать в зависимости от необходимости и желания либо от природы фланкирующей последовательности и/или его задачи. Она, например, может составлять от 1 до 300 аминокислот, например, от любой одной из 2, 3, 4, 5, 6 или 7 до любой одной из 270, 250, 240, 230, 220, 210 или 200 аминокислот. Эти диапазоны приведены исключительно для примера, и отсутствует ограничение по длине фланкирующей последовательности. В некоторых воплощениях на практике фланкирующая последовательность может составлять до 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 аминокислот. В некоторых воплощениях предпочтительна короткая фланкирующая последовательность, например, до 20, 15, 12, 10, 8, 7 или 6.

Соответственно в некоторых воплощениях фланкирующая последовательность может содержать один или более чем один гептадный мотив, и/или один или более чем один его части. В этом контексте, фрагмент гептадного мотива может включать 1, 2, 3, 4

или 5 остатков, которые формируют фрагмент последовательности гептадного мотива. В некоторых воплощениях гептадный мотив в фланкирующей последовательности соответствует гептадному мотиву, находящемуся в SEQ ID NO: 1 или в последовательности, имеющей по меньшей мере 60% (например, по меньшей мере 70%, 80%, 90%) идентичность указанной последовательности, при условии, что по меньшей мере один аминокислотный остаток, соответствующий положениям а и d гептадного мотива, представляет собой гидрофобный остаток. В некоторых воплощениях фланкирующая последовательность может содержать SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60% (например, по меньшей мере 70%, 80%, 90%) идентичность указанной последовательности. Кроме того, в таком воплощении, по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 75%) аминокислотных остатков, соответствующих положениям а и d гептадных мотивов в SEQ ID NO: 1, или их варианты представляют собой гидрофобные остатки.

Когда фланкирующая последовательность содержит один или более чем один гептадный мотив либо одну или более чем одну его части, тогда она может рассматриваться как продолжение гептадных мотивов сердцевинной последовательности. В результате, альфа-спираль мономерного белка, которая образует часть суперспиральной структуры олигомерного белка, может продолжаться за границы сердцевинной последовательности.

В некоторых воплощениях гептадный мотив сердцевинной последовательности и гептадный мотив фланкирующей последовательности являются непрерывными. То есть, первый остаток фланкирующей последовательности (т.е. остаток, находящийся в непосредственном соседстве с концом сердцевинной последовательности) соответствует позиции гептадного мотива, за которой следует позиция, соответствующая соседней с концевым остатком сердцевинной последовательности. Таким образом, повторяющийся гептадный мотив a-b-c-d-e-f-g сохраняется без пропуска между гептадным мотивом сердцевинной последовательности и гептадным мотивом фланкирующей последовательности.

В других воплощениях фланкирующая последовательность может содержать один или более чем один гептадный мотив, который не является полностью непрерывным с гептадным мотивом сердцевинной последовательности, т.е. может быть один или более чем один остаток между гептадными повторами в сердцевинной

последовательности и гептадными повторами в фланкирующей последовательности, которые не образуют часть непрерывного повторяющегося гептадного мотива.

В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность и фланкирующая последовательность могут быть расположены таким образом, что каждый мономерный пептид не содержит больше чем 8 повторов гептадного мотива. В некоторых воплощениях мономерный пептид не содержит больше чем 7 повторов, больше чем 6 повторов или больше чем 5 повторов гептадного мотива. Другими словами, мономерный пептид олигомерного белка может содержать до 8, 7, 6 или 5 гептадных повторов.

В некоторых воплощениях фланкирующая последовательность мономерного пептида может не полностью образовывать непрерывную альфа-спираль с сердцевинной последовательностью, и, таким образом, может не полностью представлять собой фрагмент суперспиральной структуры олигомерного пептида.

В некоторых воплощениях определенный здесь олигомерный белок может находиться в виде конъюгата или слитого белка с одним или более чем одним дополнительным компонентом или группировкой. Как более подробно будет изложено ниже, олигомерный белок может находиться в виде конъюгата с детектируемой группировкой, олигомеризующей группировкой или иммобилизирующей группировкой, или, несомненно, с любым требуемым компонентом или группировкой, например с функциональным или структурным компонентом или группировкой. Конъюгированная группировка может быть любой по химической или физической природе, например представлять собой небольшую молекулу или макромолекулу. Олигомерный белок может находиться в виде слитого белка с партнером слияния. Таким образом, детектируемая или иммобилизирующая, или другая дополнительная группировка может быть белковой по природе, т.е. она может представлять собой или может не представлять собой полипептидный компонент (термин “полипептид” используется здесь таким образом, что включает любой пептид, полипептид или белок, независимо от длины). Олигомеризующая группировка может представлять собой полипептид. Кроме того, олигомерный белок может быть иммобилизован на твердом субстрате. Соответственно, в некоторых воплощениях один или более чем один дополнительный компонент может представлять собой детектируемую группировку, олигомеризующую группировку, иммобилизирующую группировку или партнер слияния.

В некоторых воплощениях один или более чем один дополнительный компонент, с которым олигомерный белок конъюгирован или слит, может образовывать всю

фланкирующую последовательность или часть фланкирующей последовательности в одном или более чем одном мономерном пептиде, который образует олигомерный белок. В других воплощениях конъюгированная группировка может представлять собой отдельный компонент (т.е. отдельный относительно олигомерного белка или его мономерного пептида).

Понятно то, что присутствие дополнительного компонента в фланкирующей последовательности может быть дополнительным к или альтернативным присутствию одного или более чем одного гептадного мотива в той же самой фланкирующей последовательности. То есть, данная фланкирующая последовательность может содержать один или более чем один гептадный мотив либо его части и один или более чем один дополнительный компонент. Когда фланкирующая последовательность содержит один или более чем один гептадный мотив либо его части и один или более чем один дополнительный компонент, тогда фланкирующая последовательность может быть расположена таким образом, что один или более чем один гептадный мотив либо его части находятся ближе к сердцевинной последовательности, чем один или более чем один дополнительный компонент.

В некоторых воплощениях олигомерный белок находится в виде слитого белка или конъюгата с единственным дополнительным компонентом. Дополнительный компонент может образовывать всю фланкирующую последовательность или ее часть в одном из мономерных пептидов. В качестве альтернативы, олигомерный белок может находиться в виде слитого белка или конъюгата с 2 или более чем двумя дополнительными компонентами. В некоторых воплощениях дополнительные компоненты могут образовывать всю или часть одной и той же фланкирующей последовательности в пределах одного и того же мономерного пептида. В некоторых воплощениях один мономерный пептид может содержать сердцевинную последовательность, фланкированную по обеим сторонам фланкирующими последовательностями, где каждая фланкирующая последовательность содержит один или более чем один дополнительный компонент. Кроме того, определенный здесь олигомерный белок может содержать несколько мономерных пептидов, каждый из которых содержит один или более чем один дополнительный компонент, в любой из последовательностей, представленных выше.

В случае олигомерного белка в виде конъюгата с олигомеризующей группировкой указанная олигомеризующая группировка может быть образована

несколькими олигомеризующими последовательностями, где каждый мономерный пептид содержит олигомеризующую последовательность. Соответственно, олигомерный белок может состоять из по меньшей мере 2 мономерных пептидов, где каждый мономерный пептид содержит олигомеризующую последовательность в фланкирующей последовательности.

Суперспиральная структура раскрытого здесь олигомерного белка может образовываться спонтанно, когда мономерные пептиды приводятся в контакт друг с другом. В качестве альтернативы, для образования олигомерной структуры может потребоваться «триггер» для преодоления кинетических затруднений и для сведения мономерных пептидов вместе. Кроме того, в некоторых воплощениях может быть необходимо стабилизировать олигомерную суперспиральную структуру белка. Это инициирование и стабилизация олигомерной суперспиральной структуры может быть достигнуто при помощи олигомеризующей последовательности. Олигомеризующая последовательность представляет собой белковую последовательность, которая способна к олигомеризации, т.е. к взаимодействию с другими копиями самой себя для образования олигомеров. Понятно то, что олигомеризация является кооперативной, то есть говорят, что, когда конкретная часть более крупного белка способна легко и стабильно олигомеризовываться, тогда это может способствовать тому, чтобы вызвать олигомеризацию в оставшейся части белковой структуры, хотя в ином случае она может не происходить. Например, головные домены адгезирующих белков, такие как головной домен YadA, как известно в области техники, способны вызвать образование суперспиральных структур, которые в ином случае могли бы не образовываться стабильно. Белки GCN4 также используют аналогичным образом для стабилизации тримерных аутотранспортных адгезинов (Hartmann et al, 2012). Таким образом, этот домен или другие эквивалентные домены, известные в области техники, могут быть использованы в качестве олигомерной последовательности. Как указано выше, может случиться так, что, когда олигомерный белок конъюгирован с олигомеризующей группировкой, каждый мономерный пептид в олигомерном белке содержит олигомеризующую последовательность.

Дополнительно или в качестве альтернативы, в некоторых воплощениях инициация и стабилизация суперспиральной структуры может быть осуществлена путем связывания вместе мономерных пептидов.

Хотя определенные здесь мономерные пептиды могут быть в некоторой степени рассматриваться изолированно, в некоторых воплощениях 2 или более чем два из мономерных пептидов в раскрытом здесь олигомерном белке могут быть связаны вместе. Соответственно, фланкирующая последовательность может содержать одну или более чем одну линкерную последовательность. Она может быть дополнительной или альтернативной относительно одного или более чем одного гептадного мотива или его частей, и одного или более чем одного дополнительного компонента, который может содержаться в фланкирующей последовательности. Понятно то, что фланкирующая последовательность может содержать любую комбинацию гептадных мотивов и/или их частей, один или более чем один дополнительный компонент и/или одну или более чем одну линкерную последовательность.

Линкерные последовательности способны связывать один мономерный пептид с другим мономерным пептидом таким образом, чтобы образовывать одну пептидную цепь внутри по меньшей мере части олигомерного белка. Когда два мономерных пептида связаны вместе при помощи линкерной последовательности, тогда их можно рассматривать таким образом, что один из мономерных пептидов (т.е. первый мономерный пептид) содержит фланкирующую последовательность, содержащую полноразмерную линкерную последовательность, которая связана непосредственно с сердцевинной последовательностью другого мономерного пептида (т.е. без второго мономерного пептида, имеющего фланкирующую последовательность по этому концу сердцевинной последовательности). В качестве альтернативы, связь между двумя мономерными пептидами можно рассматривать как состоящую частично из фланкирующей последовательности первого мономерного пептида и частично из фланкирующей последовательности второго мономерного пептида (т.е. когда оба мономерных пептида содержат фланкирующую последовательность, содержащую линкерную последовательность).

Когда линкерная последовательность включена в мономерный пептид для связывания вместе мономерных пептидов, тогда может быть удобно, чтобы фланкирующая последовательность между двумя мономерными пептидами не содержала какую-либо другую линкерную последовательность и, возможно, гептадные повторяющиеся мотивы или их части. Тем не менее, фланкирующая последовательность по любому из концов цепи связанных мономерных пептидов может содержать дополнительную последовательность (например, как обсуждалось выше). Иначе говоря,

в такой связанной, например, одноцепочечной конструкции олигомерный белок может находиться в виде конъюгата с дополнительной группировкой. Другими словами, дополнительная группировка может не представлять собой часть мономерного пептида, но может быть конъюгирована с ним.

Линкерные последовательности могут иметь различную длину и/или последовательность. Понятно, что линкерные последовательности должны обладать достаточной длиной для того, чтобы обеспечить сведение спиралей, образованных мономерными пептидами, вместе в суперспираль. Тем не менее, может отсутствовать функциональное ограничение максимальной длины связывающих последовательностей. Соответственно, линкерные последовательности могут иметь длину по меньшей мере из 2 остатков, такую как по меньшей мере длину из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25 или 30 остатков.

В других воплощениях, например, линкерные последовательности могут содержать 2-60 остатков, более конкретно 5-55, 10-50, 15-45 или 20-40 остатков. В одном из воплощений линкерные последовательности могут содержать 2-50, 3-40, 4-30, 5-20 или 6-15 остатков. Природа остатков, представленных в связывающих последовательностях, не является критичной. Они могут представлять собой любую аминокислоту, например нейтральную аминокислоту либо алифатическую аминокислоту, или, в качестве альтернативы, они могут быть полярными либо заряженными или образующими структуру, например, пролин. В одном из воплощений, линкерные последовательности представляют собой гибкие линкерные последовательности. Различные гибкие линкеры, которые могут быть использованы, являются известными и широко описаны в области техники. В качестве типичного примера по меньшей мере 70% из аминокислот в линкерной последовательности могут быть выбраны из глицина, серина, треонина, аланина, пролина, гистидина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина или их производного. В некоторых воплощениях линкер представляет собой глицин-богатую или глицин-серин-богатую последовательность.

Каждый мономерный пептид содержит по меньшей мере одну сердцевинную последовательность, определенную выше. В некоторых воплощениях один или более чем один из мономерных пептидов может содержать 2 или более чем две сердцевинные последовательности, которые могут быть одинаковыми или разными друг от друга. В соответствии с изложенным выше, каждая сердцевинная последовательность может

быть фланкирована с одной или обеих сторон фланкирующей последовательностью. Когда сердцевинная последовательность фланкирована по обеим сторонам, тогда две фланкирующие последовательности могут быть одинаковыми или разными. Таким образом, каждый мономерный пептид может содержать 2 или более чем две сердцевинные последовательности, где каждая сердцевинная последовательность фланкирована с одной или обеих сторон фланкирующей последовательностью. Соответственно, когда мономерный пептид содержит 2 или более чем две сердцевинные последовательности, тогда понятно, что он может дополнительно содержать до 2 фланкирующих последовательностей для каждой сердцевинной последовательности. Таким образом, мономерный пептид, содержащий 2 сердцевинные последовательности, может содержать до 4 фланкирующих последовательностей. Например, мономерный пептид может иметь такую конфигурацию: F-C-F-F-C-F, где F представляет фланкирующую последовательность и C представляет сердцевинную последовательность.

В некоторых воплощениях мономерный пептид может содержать 2 сердцевинные последовательности и 3 фланкирующие последовательности в конфигурации: F-C-F-C-F. В других воплощениях мономерный пептид может содержать 2 сердцевинные последовательности и 2 фланкирующие последовательности в конфигурации: F-C-C-F. В других воплощениях мономерный пептид может содержать 2 сердцевинные последовательности и одну фланкирующую последовательность в конфигурации: C-C-F. В некоторых воплощениях мономерный пептид может содержать одну сердцевинную последовательность, ограниченную по обеим сторонам фланкирующей последовательностью в конфигурации: F-C-F; или одну сердцевинную последовательность и одну фланкирующую последовательность. В некоторых воплощениях олигомерный белок может содержать только один мономерный пептид, содержащий фланкирующую последовательность. В некоторых воплощениях каждый из мономерных пептидов в олигомерном белке состоит только из одной сердцевинной последовательности.

Каждая определенная здесь сердцевинная последовательность обладает по меньшей мере 60% идентичностью с SEQ ID NO: 1, которая содержит 30 остатков, и, таким образом, понятно то, что каждая сердцевинная последовательность может обладать длиной от 18 до 42 остатков. В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность в мономерном пептиде может обладать длиной 19-41 остаток, такой

как 20-40, 21-39, 22-38, 23-37, 24-36, 25-35, 26-34, 27-33, 28-32 или 29-31 остаток. В некоторых воплощениях сердцевинная последовательность может содержать 30 остатков. Может быть больше чем одна сердцевинная последовательность. Каждая сердцевинная последовательность может быть ограничена с одной или обеих сторон фланкирующей последовательностью. Как указано выше, указанная фланкирующая последовательность может содержать один или более чем один гептадный мотив или его части, один или более чем один дополнительный компонент и/или одну или более чем одну линкерную последовательность. Соответственно, в некоторых воплощениях мономерный пептид в целом может быть значительно длиннее, чем сердцевинная последовательность. В некоторых воплощениях мономерный пептид может содержать 24-1000 остатков, например 24-900, 24-800, 24-700, 24-600, 24-500, 24-400, 24-300, 24-250, 24-200, 24-150, 24-100, 24-75, 24-50 или 24-40 остатков.

Определенный здесь олигомерный белок имеет суперспиральную структуру, содержащую по меньшей мере 2 мономерных пептида. Как указано выше, олигомерный белок основан на С-концевом участке транскрипционного фактора GCN4. С-концевая последовательность GCN4 дикого типа образует димерную суперспиральную структуру, т.е. структуру, содержащую 2 мономерных пептида. Тем не менее, обнаружено то, что путем изменения остатков в положениях а и d в гептадном мотиве в отдельных мономерных пептидах олигомерное состояние всего белка может быть изменено таким образом, чтобы образовывать тримерные или тетрамерные структуры. В некоторых воплощениях олигомерный белок представляет собой димер, тример или тетрамер, т.е. олигомерный белок содержит 2, 3 или 4 мономерных пептида. В предпочтительном воплощении олигомерный белок представляет собой тример.

Каждый мономерный пептид в олигомерном белке может быть одинаковым или отличающимся. Он включает не только последовательность сердцевинной последовательности, но также в нем присутствует или отсутствует (и последовательность) одна или более чем одна фланкирующая последовательность. В некоторых воплощениях олигомерный белок может содержать 2 или более чем два мономерных пептида, имеющих идентичные сердцевинные последовательности. В некоторых воплощениях олигомерный белок может содержать 2 или более чем два полностью идентичных мономерных пептида. В некоторых воплощениях все мономерные пептиды в олигомерном белке могут быть идентичны. Хотя и не требуется, чтобы мономерные пептиды в олигомерном белке были идентичны друг другу,

предпочтительно, чтобы между мономерными пептидами присутствовали лишь минимальные вариации.

В некоторых воплощениях каждый мономерный пептид в олигомерном белке может находиться в виде отдельной пептидной цепи. В этом случае каждый мономерный пептид может рассматриваться как физически отдельная субъединица олигомерного белкового комплекса. В качестве альтернативы, в некоторых воплощениях 2 или более чем два из мономерных пептидов могут быть связаны вместе. В соответствии с изложенным выше, индивидуальные мономерные пептиды могут быть связаны вместе при помощи одной или более чем одной линкерной последовательности в одной пептидной цепи, т.е. когда один конец первого мономерного пептида связан с одним концом второго мономерного пептида. В некоторых воплощениях все мономерные пептиды могут быть связаны в одну пептидную цепь. В этом случае мономерные пептиды можно рассматривать как отдельные домены одноцепочечной мультидоменной белковой конструкции.

Мономерные пептиды дополнительно или в качестве альтернативы могут быть связаны вместе при помощи химического перекрестного связывания в виде одной или более чем одной химической связи между мономерными пептидами. Множество способов, известных в области техники для образования ковалентных связей между индивидуальными пептидами для их связывания вместе, и любой такой подходящий способ химического перекрестного связывания может быть использован для связывания вместе 2 или более чем двух мономерных пептидов в олигомерном белке. Например, 2 или более чем два мономерных пептида могут быть связаны при помощи одной или более чем одной дисульфидной связи между специфическими цистеиновыми остатками в мономерных пептидах. В качестве альтернативы, они могут быть стохастически связаны с использованием перекрестного линкера, такого как формальдегид, который способен облегчать образование ковалентных связей с лизиновыми остатками, представленными в мономерных пептидах. В некоторых воплощениях олигомерный белок может содержать комбинацию мономерных пептидов, которые связаны вместе в виде одной полипептидной цепи и/или при помощи химического перекрестного связывания, и нескольких мономеров, которые представлены на отдельной пептидной цепи и не связаны.

Раскрытый здесь олигомерный белок может быть получен синтетически, например, путем лигирования аминокислот или более мелких синтетически полученных

пептидов либо путем рекомбинантной экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный белок либо один или более чем один его мономерный пептид. Такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены синтетически при помощи любых подходящих средств, известных в области техники. Таким образом, олигомерный белок может представлять собой рекомбинантный, или синтезированный, или искусственный олигомерный белок.

Определенный здесь олигомерный белок предложен в качестве связывающего агента для связывания с LPS. Как указано выше, липополисахариды представляют собой интегральный компонент во внешних мембранах всех грамотрицательных бактерий. Тем не менее, не все грамотрицательные бактерии имеют в точности одинаковые липополисахариды в своих внешних мембранах. Используемый здесь термин “LPS” или термин “эндотоксин” (который, как указано выше, используется взаимозаменяемо с “LPS”) относится к любому липополисахариду, который представлен во внешней мембране грамотрицательных бактерий.

Преимущественно, чтобы определенный здесь олигомерный белок был способен связываться с LPS с чрезвычайно высокой аффинностью. Эта высокая аффинность обеспечивает эффективное связывание олигомерного белка с LPS, даже тогда, когда он присутствует в очень низких концентрациях, так, что он может быть обнаружен и/или удален. В некоторых воплощениях олигомерный белок связывается с LPS с K_D в наномолярном или пикомолярном диапазоне, или в меньшем диапазоне. Например, в некоторых воплощениях олигомерный белок связывается с LPS с K_D 10 нМ или меньше, таком как 5 нМ или меньше, 1000 пМ или меньше, 750 пМ или меньше, 500 пМ или меньше, 250 пМ или меньше, 100 пМ или меньше, 50 пМ или меньше, 10 пМ или меньше, 5 пМ или меньше, 1 пМ или меньше, или 500 фМ или меньше. Соответственно, определенный здесь олигомерный пептид может быть способен обнаруживать LPS в образце, в котором он представлен в концентрации по меньшей мере 100 пМ. В некоторых воплощениях олигомерный белок способен обнаруживать LPS в образце, в котором он представлен в концентрации по меньшей мере 75 пМ, более конкретно, в концентрации по меньшей мере 50 пМ, по меньшей мере 25 пМ, по меньшей мере 10 пМ, по меньшей мере 5 пМ, по меньшей мере 3 пМ, по меньшей мере 1 пМ, по меньшей мере 750 фМ, по меньшей мере 500 фМ, по меньшей мере 250 фМ или по меньшей мере 100 фМ.

Не желая быть связанными теорией, авторы настоящего изобретения полагают то, что связывание определенного здесь олигомерного белка с LPS обусловлено как суперспиральной структурой белка в целом, так и взаимодействиями между LPS и индивидуальными остатками в белке. В этой связи, полагают то, что присутствие положительно заряженных остатков в олигомерном белке может способствовать увеличению аффинности связывания. Кроме того, не желая быть связанными теорией, выдвинута гипотеза о том, что положительно заряженные остатки может быть вовлечены в электростатические взаимодействия с отрицательно заряженными фосфатными группами области липида А в LPS. Соответственно, в некоторых воплощениях олигомерный белок содержит в общем по меньшей мере 6 катионных остатков в сердцевинных последовательностях мономерных пептидов. В некоторых воплощениях олигомерный белок может содержать в общем по меньшей мере 7 катионных остатков, такое как по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12 или по меньшей мере 15 катионных остатков в сердцевинных последовательностях мономерных пептидов.

Используемый здесь термин “катионный остаток” включает лизин, аргинин, гистидин и любой не кодируемый генетически или модифицированный аминокислотный остаток, который несет положительный заряд при рН 7,0. Подходящие не кодируемые генетически или модифицированные катионные остатки включают аналоги лизина, аргинина и гистидина, такие как гомолизин, орнитин, диаминомасляная кислота, диаминопимелиновая кислота, диаминопропионовая кислота, гомоаргинин, триметиллизин, триметилорнитин, 4-аминопиперидин-4-карбоновая кислота, 4-амино-1-карбамимидоилпиперидин-4-карбоновая кислота и 4-гуанидинофенилаланин.

Вышеупомянутые катионные остатки могут быть представлены в пределах по меньшей мере одной сердцевинной последовательности одного мономерного пептида, или они могут быть распределены в сердцевинных последовательностях нескольких мономерных пептидов в олигомерном белке. В некоторых воплощениях каждый мономерный пептид содержит по меньшей мере 2 катионных остатка в сердцевинной последовательности. В некоторых воплощениях каждый мономерный пептид содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 катионных остатков в сердцевинной последовательности.

Как обсуждалось выше, олигомерный белок взаимодействует с LPS через компонент липида А, и, таким образом, здесь также предложено применение

определенного здесь олигомерного белка в качестве связывающего агента для связывания с липидом А. Используемый здесь термин “липид А” относится к компоненту липида А в LPS, который содержит две фосфоглюкозаминовые сахарные молекулы, соединенные бета-1,6 связью, вместе имеющие четыре О-связанные и две N-связанные ацильные цепи, которые способны взаимодействовать с внешней мембраной грамотрицательных бактерий.

В некоторых воплощениях, как указано выше, определенный здесь олигомерный белок может находиться в виде конъюгата или слитого белка с одним или более чем одним дополнительным компонентом или группировкой. В частности, олигомерный белок может быть конъюгирован с детектируемой группировкой или иммобилизирующей группировкой. Дополнительная группировка может находиться в виде полипептида, и поэтому олигомерный белок может находиться в виде слитого белка с партнером слияния. Партнер слияния представляет собой отдельный полипептидный компонент слитого белка с олигомерным белком. В некоторых воплощениях олигомерный белок может быть иммобилизован на твердом субстрате.

Олигомерный белок может быть конъюгирован с любой подходящей детектируемой группировкой, т.е. любой группировкой, которая способна обеспечивать сигнал, который может быть обнаружен. Детектируемая группировка может рассматриваться как метка, и может обнаруживаться непосредственно или опосредованным образом. В некоторых воплощениях олигомерный белок может быть конъюгирован с детектируемой группировкой, которая обнаруживается непосредственно. Группировка, которая обнаруживается непосредственно, представляет собой одну группировку, которая может быть обнаружена непосредственным образом без применения дополнительных реагентов. Например, подходящие детектируемые группировки, которые обнаруживаются непосредственным образом, могут включать флуоресцентные молекулы (например, флуоресцентные белки или органические флуорофору), колориметрические группировки (например, окрашенные молекулы или наночастицы), частицы, например, золотые или серебряные частицы, квантовые точки, радиоизотопные метки, хемилюминисцентные молекулы и т.п. В частности, любая спектрофотометрически или спектроскопически детектируемая метка может быть использована в непосредственно обнаруживаемой группировке. Детектируемая метка может отличаться по цвету, но может быть использован любой другой параметр, например, размер, заряд и т.д.

Опосредованно детектируемая группировка представляет собой группировку, которая обнаруживается путем использования одного или более чем одного дополнительного реагента, например, когда группировка представляет собой член системы, продуцирующей сигнал, состоящей из двух или более чем двух компонентов. Например, детектируемая группировка может содержать фермент, такой как пероксидаза хрена (HRP), способный катализировать реакцию, которая продуцирует обнаруживаемый сигнал, такой как изменение цвета. Соответственно, после приведения в контакт детектируемой группировки с субстратом для фермента может протекать реакция и может генерироваться обнаруживаемый сигнал.

Олигомерный белок может находиться в виде слитого белка с партнером слияния. В некоторых воплощениях партнер слияния может представлять собой детектируемую группировку, т.е. олигомерный белок в виде конъюгата с детектируемой группировкой, которая может рассматриваться как эквивалент олигомерного белка в виде слитого белка с детектируемым партнером слияния. Тем не менее, олигомерный белок может находиться в виде слитого белка с партнером слияния, отличным от детектируемой группировки. В принципе, партнер слияния может представлять собой любой полипептид, при условии того, что олигомерный белок по-прежнему способен функционировать в качестве связывающего агента для связывания с LPS.

В некоторых воплощениях олигомерный белок может быть иммобилизован на твердом субстрате (т.е. на твердой фазе или на твердом носителе). Эта иммобилизация может быть достигнута при помощи любого удобного пути. Таким образом, способ или средства иммобилизации и твердый субстрат могут быть выбраны в соответствии с выбором из любого количества средств иммобилизации и твердых субстратов, широко известных в области техники и описанных в литературе. В некоторых воплощениях олигомерный белок может быть конъюгирован с иммобилизирующей группировкой для облегчения иммобилизации. Иммобилизирующая группировка может быть непосредственно связана с твердым субстратом (например, химически перекрестно связана). Например, в некоторых воплощениях иммобилизирующая группировка может содержать цистеиновый остаток, способный связываться с цистеиновым остатком на субстрате в виде дисульфидного мостика. В некоторых воплощениях иммобилизирующая группировка может быть связана с субстратом более опосредованным образом при помощи линкерной группы или при помощи одной или более чем одной промежуточной связывающей группы. В некоторых воплощениях

иммобилизирующая группировка может представлять собой, например, партнер аффинного связывания, например, биотин или гаптен, способный связываться со своим партнером связывания, т.е. когнатным партнером связывания, например, со стрептавидином или антителом, которое представлено на твердом субстрате. Таким образом, олигомерный белок при помощи иммобилизирующей группировки может быть ковалентно или нековалентно связан с твердым субстратом. Связь может быть обратимой (например, расщепляемой) или необратимой связью. В некоторых воплощениях связь может расщепляться ферментативно, химически или при помощи света, например, связь может представлять собой светочувствительную связь.

В некоторых воплощениях взаимодействие между олигомерным белком и твердым субстратом должно быть достаточно надежным для того, чтобы обеспечить стадии промывания, т.е. взаимодействие между олигомерным белком и твердым субстратом не нарушается (значительно нарушается) стадиями промывания. Например, в одном из воплощений меньше чем 5% олигомерного белка удаляется или элюируется с твердого субстрата при каждой стадии промывания. В одном из воплощений меньше чем 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% олигомерного белка удаляется или элюируется с твердого субстрата при каждой стадии промывания.

Твердый субстрат может представлять собой субстрат из хорошо известных субстратов или матриц, которые в настоящее время широко используются или предложены для иммобилизации, разделения и т.д. Они могут принимать форму частиц (например, частиц, которые могут быть магнитными, парамагнитными или немагнитными), складок, гелей, фильтров, мембран, волокон, капилляров, слайдов, матриц, чипов или микротитровальных стрипов, пробирок, планшет или лунок и т.д.

В некоторых воплощениях олигомерный белок иммобилизован на грануле или смоле, или в или на лунке, или сосуде, или колонке, или фильтровальном материале, или на поверхности детектирующего устройства.

Субстрат может быть изготовлен из стекла, диоксида кремния, латекса, апатита или полимерного материала. В некоторых случаях могут быть особенно желательны материалы, имеющие высокую площадь поверхности. Такие субстраты могут обладать шероховатой поверхностью и могут быть, например, пористыми или в виде частиц, например частиц, волокон, решеток, агломератов или сит. Материалы в виде частиц, например гранул, полезны вследствие их большей связывающей способности, в частности, полимерные гранулы. Понятно, что эти гранулы могут быть представлены в

любом подходящем окружении, как известно в области техники. Например, гранулы могут быть упакованы в колонку, такую как колонка для фильтрации.

Для удобства, твердый субстрат в виде частиц, используемый в соответствии с настоящим изобретением, может содержать сферические гранулы. Размер гранул не является критическим, но они, например, могут иметь порядок диаметра по меньшей мере 1 мкм. В одном из воплощений гранулы могут обладать диаметром по меньшей мере 2 мкм. В одном из воплощений, гранулы могут обладать максимальным диаметром не больше чем 10, и, например, не больше чем 6 мкм. Монодисперсные частицы, которые представляют собой частицы, которые по существу однородны по размеру (например, размеру, имеющему стандартное отклонение диаметра меньше чем 5%), обладают преимуществом, заключающемся в том, что они обеспечивают весьма однородную воспроизводимость реакции. Типичные монодисперсные полимерные частицы могут быть получены при помощи способа, описанного в US-A-4336173.

В некоторых воплощениях твердый субстрат может представлять собой смолу, такую как амилозная смола. Смола может быть представлена в любой подходящей форме, такой как фильтр для центрифужной колонки или проточной колонки. В некоторых воплощениях олигомерный белок может быть иммобилизован в или на лунке или сосуде, таком как мультилуночный планшет.

В некоторых воплощениях олигомерный белок может быть иммобилизован на поверхности детектирующего устройства, такого как чип или микроматрица. В этой связи олигомерный белок может образовывать связывающую матрицу или биосенсор, способный связываться с LPS и обнаруживать его. В некоторых воплощениях олигомерный белок может быть иммобилизован на чипе для поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Биосенсоры, которые способны измерять сигнал, соответствующий связыванию мишени с иммобилизованным связывающим белком, хорошо известны в области техники, и определенный здесь олигомерный белок может быть представлен в любой такой подходящем окружении.

Таким образом, можно видеть то, что применение олигомерного белка, определенного здесь, в качестве связывающего агента для связывания с LPS, может включать применение олигомерного белка для обнаружения и/или для удаления LPS в образце или из образца.

Соответственно, применения определенного и описанного здесь олигомерного белка включают, в частности, применения *in vitro*, то есть LPS связывается, обнаруживается или удаляется *in vitro*.

В этой связи здесь предложен способ связывания LPS, где способ включает приведение LPS или образца, содержащего LPS, в контакт с определенным здесь олигомерным белком для обеспечения связывания белка с LPS с образованием белково-липополисахаридного комплекса. Понятно, что вышеприведенные раскрытия, относящиеся к олигомерному белку для применения в связывании LPS в равной степени относятся к способам связывания LPS, включающим тот же самый олигомерный белок.

В одном из воплощений способ представляет собой способ *in vitro*.

Используемый здесь термин “образец” включает любой образец, который может содержать или может быть загрязнен LPS, или который может быть желателен для тестирования. Он включает клинические образцы, полученные от пациентов или субъектов в более общем объеме, образцов окружающей среды и образцов продуктов, которые должны быть протестированы в отношении загрязнения эндотоксинами. Клинический образец, полученный от пациента, может представлять собой любой образец жидкости организма или ткани, например, образец крови, образец лимфы, образец слюны, образец мочи, образец фекалий, образец спинномозговой жидкости или любой другой подходящий биологический образец, отобранный от пациента. В предпочтительном воплощении клинический образец представляет собой образец крови.

Образец продукта, который должен быть протестирован в отношении загрязнения эндотоксинами, может представлять собой образец, полученный из любого продукта, который, как предполагают, загрязнен эндотоксинами, и, в частности, любой такой продукт, который предназначен для потребления человеком или для взаимодействия с людьми. Это включает, например, продукты фармацевтической и медицинской индустрии, такие как реактивы, медицинские устройства, оборудование, расходные материалы, медицинские изделия, вакцины и т.п. Аналогично, образцы также могут быть получены из продуктов пищевой промышленности и производства напитков или из образцов окружающей среды, таких как питьевая вода, грунтовые воды и т.д.

В одном из воплощений образец может представлять собой жидкий образец, содержащий долю тестируемого продукта, хотя он также может представлять собой образец, полученный с поверхности продукта, когда требуется тестировать твердый продукт, такой как медицинское устройство, или поверхность, такая как поверхность в

операционной или другой стерильной среде, в отношении загрязнения эндотоксинами. Это может представлять собой, например, мазки или смывы, взятые с поверхности продукта.

В некоторых воплощениях способ связывания LPS представляет собой способ обнаружения присутствия LPS в образце, включающий:

(а) приведение образца в контакт с определенным здесь олигомерным белком, для обеспечения связывания белка с LPS с образованием белково-липополисахаридного комплекса; и

(б) обнаружение присутствия белково-липополисахаридного комплекса.

В некоторых воплощениях способ связывания LPS может представлять собой способ обнаружения присутствия грамотрицательных бактерий в образце, в котором, как предполагается, могут присутствовать грамотрицательные бактерии, где способ включает:

(а) приведение образца в контакт с определенным здесь олигомерным белком, для обеспечения связывания белка с LPS во внешней мембране грамотрицательных бактерий с образованием белково-липополисахаридного комплекса; и

(б) обнаружение присутствия белково-липополисахаридного комплекса.

Понятно, что стадия обнаружения белково-липополисахаридного комплекса может быть осуществлена при помощи любых подходящих средств, известных в области техники. Белково-липополисахаридный комплекс может быть обнаружен непосредственно или опосредованно. Подходящий способ для обнаружения белково-липополисахаридного комплекса может быть выбран в зависимости от способа, при котором образец приводят в контакт с олигомерным белком.

Стадия приведения образца в контакт с олигомерным белком может включать нанесение образца на субстрат, на котором иммобилизован олигомерный белок, как изложено выше, где субстрат расположен таким образом, что может быть измерено связывание образца с олигомерным белком. Например, в некоторых воплощениях олигомерный белок может быть иммобилизован на поверхности детектирующего устройства, изложенного выше, такого как чип SPR или другой подходящий биосенсор, который способен обнаруживать взаимодействия между образцом и олигомерным белком. Соответственно, стадия приведения образца в контакт с олигомерным белком может включать нанесение образца на твердый субстрат, на котором иммобилизован олигомерный белок.

Например, в других воплощениях олигомерный белок может быть иммобилизован в лунке мультилучного планшета, чтобы осуществлять анализ LPS. Такие анализы хорошо известны в области техники; когда образец наносят на планшет, содержащий иммобилизованный олигомерный белок, тогда любой LPS, который представлен в образце, будет связываться олигомерным белком, а другие компоненты в образце могут быть смыты. Соответственно, стадия приведения образца в контакт с олигомерным белком может включать внесение образца в мультилучный планшет, на котором иммобилизован олигомерный белок. Кроме того, способ обнаружения присутствия LPS в образце может также включать стадию промывания белково-липополисахаридного комплекса перед стадией обнаружения таким образом, чтобы удалить несвязавшиеся компоненты образца, и таким образом улучшить точность способа. Подходящие реактивы и протоколы для таких стадий промывания хорошо известны в области техники. Белково-липополисахаридный комплекс, который остается в планшете, затем может быть обнаружен с использованием любой подходящей детектируемой группировки, которая обладает способностью связываться с LPS. Детектируемая группировка может обнаруживаться непосредственно или опосредованно. В соответствии с изложенным более подробно ниже, авторы настоящего изобретения адаптировали ИФА-подобный анализ с использованием белков хвостового шипа фаговой оболочки (ELITA) фагов *Salmonella*, о котором исходно сообщали Schmidt et al, 2016, для обнаружения LPS. В этом анализе используется белок хвостового шипа фаговой оболочки, который способен связываться с LPS и который содержит N-концевой StrepTag, и конъюгированная со стрептавидином пероксидаза хрена для обнаружения белково-липополисахаридного комплекса. Когда в планшет добавляют субстрат для фермента 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту (ABTS), тогда вызывают обнаруживаемое изменение окрашивания. Соответственно, можно видеть то, что стадия обнаружения присутствия белково-липополисахаридного комплекса может включать приведение белково-липополисахаридного комплекса в контакт с детектируемой группировкой, которая способна связываться с LPS и которая содержит фермент, способный катализировать реакцию, продуцирующую детектируемый сигнал, и с подходящим субстратом, чтобы индуцировать такой детектируемый сигнал.

В некоторых воплощениях олигомерный белок может находиться в виде конъюгата, содержащего саму детектирующую группировку, как изложено выше.

Соответственно, белково-липополисахаридный комплекс может быть обнаружен путем детектирования сигнала с детектируемой группировки, конъюгированной с олигомерным белком. Это может быть осуществлено при помощи любого способа, который подходит для обнаружения сигнала с интересующей детектируемой группировки, например с помощью флуоресцентной микроскопии для обнаружения флуоресцентной метки, которая конъюгирована с олигомерным белком.

В некоторых воплощениях способ связывания LPS представляет собой способ удаления LPS из образца, включающий:

- (а) приведение образца в контакт с определенным выше олигомерным белком, для обеспечения связывания белка с LPS с образованием белково-липополисахаридного комплекса; и
- (б) отделение белково-липополисахаридного комплекса от образца.

Кроме того, понятно, что стадия отделения белково-липополисахаридного комплекса от образца может быть осуществлена при помощи любых подходящих средств, известных в области техники, и будет зависеть от пути, при помощи которого образец приводят в контакт с олигомерным белком.

В некоторых воплощениях олигомерный белок может быть иммобилизован на твердом субстрате, и такая стадия приведения образца в контакт с олигомерным белком может включать нанесение образца на твердый субстрат, на котором иммобилизован олигомерный белок. Как упомянуто выше, олигомерный белок может быть иммобилизован на любом подходящем субстрате, известном в области техники. В частности, твердый субстрат может находиться в виде частиц (например, гранул), фильтров или колонок. Кроме того, подходящие реактивы и протоколы применения таких субстратов для выделения связавшейся молекулы-мишени из образца хорошо известны в области техники.

Как упомянуто выше, олигомерный белок может быть иммобилизован на гранулах, которые могут быть магнитными. Используемый здесь термин "магнитный" означает то, что субстрат способен обладать магнитным моментом, возникающим после его помещения в магнитное поле, и, таким образом, может переноситься под действием такого поля. Другими словами, субстрат, содержащий магнитные частицы, легко может быть удален путем магнитной агрегации, которая обеспечивает быстрый, простой и эффективный путь для отделения белково-липополисахаридного комплекса от образца после образования такого комплекса.

Например, в еще одном воплощении олигомерный белок может быть иммобилизован на смоле, которая упакована в колонку. В этом примере, когда образец приводят в контакт с олигомерным белком, т.е. когда образец наносят на колонку, тогда LPS будет связываться с олигомерным белком и оставаться в колонке, а оставшаяся часть образца будет проходить через колонку. В некоторых воплощениях способ может включать несколько стадий приведения образца в контакт с олигомерным белком для обеспечения того, чтобы весь LPS связан, т.е. образец может быть нанесен на колонку несколько раз. Кроме того, способ может включать стадию промывания белково-липополисахаридного комплекса перед стадией отделения, чтобы избежать случайного удаления других компонентов из образца в дополнении к LPS, т.е. колонка может быть промыта подходящим реагентом.

При связывании LPS, обнаружении присутствия LPS в образце или удаления LPS из образца является преимуществом, если реактивы, вовлеченные в указанное связывание, обнаружение или удаление, в частности, олигомерный белок, могут быть использованы повторно. Соответственно, раскрытые здесь способы могут дополнительно включать стадию приведения в контакт белково-липополисахаридного комплекса с по меньшей мере одним неденатурирующим детергентом для удаления LPS из олигомерного белка, т.е. для разрушения белково-липополисахаридного комплекса, таким образом, что, олигомерный белок мог быть использован повторно.

В этой связи здесь предложен набор для применения в качестве связывающего агента для LPS, как определено здесь, или для применения в определенных здесь способах, где указанный набор включает:

- (1) определенный здесь олигомерный белок; и
- (2) по меньшей мере один неденатурирующий детергент.

Неденатурирующие детергенты хорошо известны в области техники, и специалист в данной области техники может использовать любой подходящий неденатурирующий детергент. Например, по меньшей мере один неденатурирующий детергент может быть выбран из неионного, анионного, катионного или цвиттерионного детергентов или любой их комбинации. В этой связи по меньшей мере один неденатурирующий детергент может обладать головной группой, выбранной из линейной группы полиэтиленгликоля (PEG), полисорбатной группы, группы бета-гликозидного сахара, N-метилглюкаминовой группы, N-оксида, диметиламмоний-1-пропансульфонатной группы, группы карбоновой кислоты, сульфатной группы или

группы четвертичного амина. По меньшей мере один неденатурирующий детергент может быть выбран из CHAPS (3-(3-холамидопропил)-диметиламмоний-1-пропансульфоната), цвиттергента 3-12, полисорбата 80, полисорбата 20, тритон X-100 или любой их комбинации. В некоторых воплощениях по меньшей мере один неденатурирующий детергент может представлять собой смесь неденатурирующих детергентов. В некоторых воплощениях смесь неденатурирующих детергентов содержит или состоит из CHAPS, цвиттергента 3-12, полисорбата 80, полисорбата 20 и тритон X-100.

Понятно то, что детергент должен быть представлен в достаточной концентрации для того, чтобы разрушать белково-липополисахаридный комплекс, без того, чтобы при такой высокой концентрации безвозвратно нарушалась функция олигомерного белка. В некоторых воплощениях детергент может быть представлен в общей концентрации, т.е. концентрации всех представленных детергентов, составляющих по меньшей мере 0,1% (масс./масс.) или 0,1% (об./об.). В некоторых воплощениях концентрация детергента может составлять по меньшей мере 0,15% (масс./масс.) или по меньшей мере 0,15% (об./об.), например по меньшей мере 0,2% (масс./масс.) или по меньшей мере 0,2% (об./об.), по меньшей мере 0,25% (масс./масс.) или по меньшей мере 0,25% (об./об.), либо по меньшей мере 0,5% (масс./масс.) или по меньшей мере 0,5% (об./об.). В одном из воплощений по меньшей мере один неденатурирующий детергент содержит комбинацию 0,05% (масс./масс.) CHAPS, 0,05% (масс./масс.) цвиттергент 3-12, 0,05% (об./об.) твин 80, 0,05% (об./об.) твин 20 и 0,05% (об./об.) тритон X-100.

В еще одном воплощении здесь предложен продукт, содержащий олигомерный белок, иммобилизованный на твердом субстрате, где олигомерный белок является таким, как определено здесь. Твердый субстрат может представлять собой любой раскрытый здесь твердый субстрат. То есть приведенное выше раскрытие, относящееся к применению олигомерного белка, где олигомерный белок иммобилизован на твердом субстрате, в равной степени относится в контексте продукта, содержащего олигомерный белок, иммобилизованный на твердом субстрате. В этой связи твердый субстрат может представлять собой лист, гель, фильтр, мембрану, волокно, капилляр, слайд, матрицу, чип, микротитровальный стрип, пробирку, планшет или лунку. В частности, олигомерный белок может быть иммобилизован на поверхности детектирующего устройства, такого как чип SPR или биосенсор.

Из вышеприведенного описания изобретения очевидно то, что описанный здесь олигомерный белок обеспечивает альтернативный связывающий агент для связывания LPS, который может решать множество задач при помощи известных способов для связывания и обнаружения LPS. В частности, описанный здесь олигомерный белок способен растворять агрегаты LPS. Соответственно, олигомерный белок может уменьшать влияние маскировки LPS, вызванное путем агрегации, и, таким образом, эффективно увеличивать измеряемую концентрацию LPS в образце. Таким образом, этот олигомерный белок обеспечивает способ обнаружения LPS, который способен обнаруживать низкие концентрации LPS.

Кроме того, данный способ обнаружения позволяет избежать проблем, которые ассоциируются с анализом LAL, такие как дорогостоящий и неустойчивый сбор амебоцитарного лизата. Кроме того, этот способ также позволяет избежать любые потенциальные проблемы, связанные с применением фактора С, которые также могут существовать для рекомбинантных вариантов анализа LAL.

Графические материалы

Далее изобретение будет описано более подробно в следующих не ограничивающих объем настоящего изобретения примерах со ссылкой на следующие графические материалы:

На фиг. 1 показана структура тримера GCN4-pII, адаптированная из PDB-ID 2Y00 (Hartmann et al., 2012). (А) Боковой вид. (В) Фронтальный вид с сердцевинными изолейциновыми остатками в положениях а и d, окрашенных зеленым цветом.

На фиг. 2 показан схематический вариант общей структуры LPS, основанной на LPS из *S. typhimurium*. Группировка липида А (вставка) состоит из двух фосфоглюкозаминов с четырьмя О-связанными и двумя N-связанными ацильными цепями, погруженными в наружную мембрану. Олигосахарид сердцевинной структуры (COS) связан с липидом А посредством гликозидной связи, и О-антиген связан с предпоследним сахаром COS. О-антиген состоит из повтора, состоящего из четырех сахаров, варьирующего из от 4 до 40 повторяющихся единиц, в среднем из 30 повторов (Peterson и McGroarty, 1985). Липид А и два проксимальных сахара 3-дезоксид-Д-манно-окт-2-улозоновой кислоты (KDO) являются высококонсервативными среди граммотрицательных видов, тогда как оставшаяся часть COS и О-антиген являются консервативными среди бактериальных видов и серотипов, соответственно.

На фиг. 3 показаны кривые связывания после инъекции различных компонентов LPS на иммобилизированный K9-GCN4-PII. Вертикальные линии указывают на старт и окончание инъекции. На (A) показана инъекция полноразмерного LPS. На (B) показана инъекция шероховатого LPS, лишенного О-антигена. На (C) показана инъекция глубоко шероховатого LPS, лишенного всех сахаров за исключением двух проксимальных KDO. На (D) показана инъекция полисахарида LPS, лишенного липида А.

На фиг. 4 показан график величин разницы SPR в конце инъекции, нормализованные на молярные концентрации лигандов для каждого из компонентов LPS, протестированных на фиг. 3.

На фиг. 5 показаны кривые связывания ELITA LPS с двумя содержащими GCN4 конструкциями K9-His (слева) и K14-His (справа).

На фиг. 6 показаны картины TEM самого LPS (верх) и LPS с GCN4-pII (низ) при увеличении 4000 (слева) и 8000 (справа).

На фиг. 7 показан схематический обзор получаемых конструкций. Конструкции, полученные из SadA, исходно были описаны в Alvarez et al. (Alvarez et al., 2008) и Hartman et al. (Hartmann et al., 2012). Конструкция andreinlvpas была исходно описана в Deiss et al. (Deiss et al., 2014). Конструкция GCN4 была синтезирована GenScript (GenScript Biotech Corp).

На фиг. 8 показаны SPR Fc1, Fc2, и кривые Fc1-F2 для иммобилизованных K9 с отличающимися компонентами LPS *S. typhimurium*. (A) с гладкими LPS. (B) с шероховатыми LPS. (C) с глубоко шероховатыми LPS. (D) с полисахаридом, полученным из LPS.

На фиг. 9 показаны SPR Fc1, Fc2, и кривые Fc1-F2 для иммобилизованных K14 с отличающимися компонентами LPS *S. typhimurium*. (A) с гладкими LPS. (B) с шероховатыми LPS. (C) с глубоко шероховатыми LPS. (D) с полисахаридом, полученным из LPS.

На фиг. 10 показаны SPR Fc1, Fc2, и сравнение кривых Fc1-F2 для иммобилизованных K3 (канал Fc1) и K3-His (канал Fc2) с отличающимися компонентами LPS *S. typhimurium*. (A) с гладкими LPS. (B) с шероховатыми LPS. (C) с глубоко шероховатыми LPS. (D) с полисахаридом, полученным из LPS.

На фиг. 11 показаны абсолютные величины (сверху) и полный состав и отрицательные контроли (внизу) экспериментов ELITA с K9 и K14. SadA = компонент

Salmonella K9 или K14. BSA = Бычий сывороточный альбумин. TSP = фаговый белок хвостового шипа. ST-HRP = пероксидаза хрена, конъюгированная со стрептавидином.

На фиг. 12 показаны спектры CD (кругового дихроизма) GCN4-pII самого по себе и в присутствии LPS. Можно видеть то, что существует минимальная вариация композиции вторичной структуры GCN4-pII до и после связывания с LPS.

На фиг. 13 показан график результатов анализа LAL, демонстрирующего маскирующий эффект GCN4-pII при концентрациях, находящихся в диапазоне от 10 до 0,1 мкМ, с введением 0,5 ЕЭ (единиц эндотоксина)/мл LPS. Оптимальное маскирование обнаружено при 1 мкМ GCN4-pII, когда маскирующее действие составляло 89% от общего сигнала.

На фиг. 14 показана область фингерпринта для спектра 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR (ядерного магнитного резонанса с полной корреляционной спектроскопией) GCN4-pII. Все 29 ожидаемых спиновых систем были хорошо разрешены и распознавались без признаков расщепления пиков, что указывало на гомогенность образца в растворе.

На фиг. 15 показан график результатов ИФА, основанного на GCN4-pII, с использованием биотинилированных LPS для детектирования.

На фиг. 16 показан график результатов анализа LAL с использованием тех же самых образцов, как в анализе на фиг. 15.

На фиг. 17 показан график, сравнивающий результаты ИФА, основанного на GCN4-pII, и анализа LAL.

На фиг. 18 показаны кривые связывания SPR для различных типов LPS и для PBS-E, подвижный буфер в качестве контроля.

На фиг. 19 демонстрирует филогенетическое распределение вариантов LPS, используемых в примере 5. Данное изображение адаптировано из Bern and Goldberg, 2005.

Примеры

Способы

Экспрессия и очистка белков

Конструкции адгезина A *Salmonella* (SadA) (представленные на фиг. 7), ограниченные адаптерами GCN4, получали как описано ранее (Alvarez et al., 2008; Hartmann et al., 2012). Трансформированные BL21-Gold(DE3) выращивали в 2 л аутоиндукционной среды ZYP-5052 (Studier, 2005) и индуцировали сверхэкспрессию путем добавления 200 нг/мл ангидротетрациклина (АНТС) при OD600, равном 0,6, с

последующей экспрессией в течение ночи при 30°C. Клетки осаждали при 6000 × g (ротатор Beckman JLA 8.1000) в течение 30 минут и ресуспендировали в 20 мл Tris/HCl pH 7,4, 40 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, содержащей 200 мкл коктейля из ингибиторов протеаз без EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) (Merck) и ДНКазу I. После ресуспендирования клетки лизировали при помощи френч-пресса и получающийся в результате лизат разбавляли в 50 мл буфера для уравнивания (20 mM Tris/HCl pH 7,9, 5M гуанидина хлоргидрат, 0,5 M NaCl, 10% глицерин) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при перемешивании, а затем центрифугировали при 75000 × g (ротатор Beckman Ti 70) в течение 1 часа для удаления любых нерастворившихся агрегатов частиц. Получающийся в результате раствор наносили на 20 мл колонки для выделения с Ni сефарозой (GE Life Sciences), предварительно уравновешенные буфером для уравнивания. После нанесения образца колонку промывали буфером для уравнивания в объеме 4 объемов колонки и элюировали с использованием 0-100% градиентом элюирующего буфера (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5M гуанидина хлоргидрат, 0,5 M NaCl, 10% глицерин, 500 mM имидазол). Элюированные фракции анализировали при помощи SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецисульфатом натрия), и фракции, содержащие интересующий белок, объединяли и подвергали рефолдингу путем двойного диализа против 2 л буфера для рефолдинга (20 mM MOPS pH 7,4, 350 mM NaCl, 10% глицерин) в течение ночи.

Продукция и очистка LPS

LPS получали путем инокулирования 20 мл прекультуры лизогенного бульона (LB) из единичной бактериальной колонии (смотри таблицу 3 ниже в отношении используемых штаммов) и выращивали в течение ночи при 37°C.

Таблица 3

Штамм	Название	Тип	Указания
LPS			
<i>E. coli</i> BL21	BL21 LPS	Шероховатый	Обычный лабораторный штамм, лишенный O-антигена
<i>S. anatum</i>	<i>S. anatum</i> LPS	Гладкий	Точная структура не известна
<i>S. Typhimurium</i>	Гладкий LPS	Гладкий	

<i>S. Typhimurium</i> $\Delta waaC$ (ΔLPS)	WaaC LPS	Шероховатый	Делеция гептозилтрансферазы WaaC, ответственной за перенос гептозы на группировку Kdo предшественника LPS
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta waaJ$	WaaJ LPS	Шероховатый	Делеция глюкозилтрансферазы WaaJ, ответственной за перенос предпоследней глюкозы к олиго LPS в сердцевинной структуре
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta waaL$	WaaL LPS	Шероховатый	Делеция лигазы WaaL, ответственной за лигирование О-антигена с олигосахаридом в сердцевинной структуре

6 × 1 л культур в колбах с перегородками объемом 2 л инокулировали из прекультуры и выращивали в течение ночи при 37°C в шейкере. Бактерии собирали путем центрифугирования при 6000 × g (ротатор Beckman JLA 8.1000) в течение 30 минут. Дополнительную очистку осуществляли в соответствии с двумя различными способами в зависимости от типа LPS.

Шероховатые LPS очищали в соответствии с протоколом, описанным Galanos et al. (Galanos, Lüderitz and Westphal, 1969), с использованием экстракции фенол-хлороформ-петролейным эфиром. После сбора бактериальный осадок 3 раза промывали 40 мл этанола и один раз ацетоном, затем оставляли на ночь под потоком воздуха. Высушенный осадок гомогенизировали с использованием ступки и пестика и растворяли в 40 мл смеси 90% (масс./об.) жидкого фенола, хлороформа и петролейного эфира в отношении 2:5:8. После инкубации в течение одного часа в шейкере нерастворенный материал осаждали при 4200 × g в течение 15 минут и собирали супернатант. Хлороформ и петролейный эфир удаляли в потоке воздуха в течение 4 часов или до начала кристаллизации фенола. Раствор ресуспендировали путем нагревания до 40°C и воду добавляли по каплям (3 × 5 капель) при перемешивании до осаждения LPS. LPS осаждали при 4200 × g в течение 15 минут, и к супернатанту добавляли дополнительное количество воды для того, чтобы собрать любые оставшиеся LPS. Осадок два раза промывали 10 мл 80% (масс./об.) фенола, и суспендировали в 20 мл воды milliQ перед центрифугированием при 100 000 × g (ротатор Beckman, MLA-50) в течение одного часа.

Окончательный осадок суспендировали в 50 мл воды MilliQ и лиофилизировали с получением чистого LPS.

Гладкие LPS очищали в соответствии с протоколом, описанным Darveau et al. (Darveau and Hancock, 1983). Бактери дважды промывали и ресуспендировали в 40 мл 10 mM Tris-HCl с pH 8,0, 2 mM MgCl₂ и лизировали при помощи френч-пресса, а затем при помощи дополнительного разрушения путем ультразвуковой обработки. Получающуюся в результате суспензию инкубировали с 200 мкг/мл ДНКазы I, 50 мкг/мл РНКазы А в течение ночи при перемешивании при 37°C. К 15 мл суспензии добавляли 5 мл 0,5 М EDTA в 10 mM Tris-HCl с pH 8,0, 2,5 мл 20% SDS в 10 mM Tris-HCl при pH 8,0, и 2,5 мл 10 mM Tris-HCl с pH 8,0, и мицеллы LPS дополнительно разрушали путем ультразвуковой обработки. Раствор центрифугировали при 39000 × g (ротор Sorval, SS-34) в течение 30 минут при 20°C для осаждения нерастворимых клеточных компонентов, супернатант замораживали и лиофилизировали. Лيوфилизированный неочищенный экстракт растворяли в минимальном количестве воды, и LPS осаждали с использованием 2 объемов охлажденного на льду этанола и 0,375 М MgCl₂ при -40°C в течение ночи. Осажденные LPS центрифугировали при 11000 × g (ротор Sorvall, SLA-3000) в течение 15 минут при 4°C, и получающийся в результате осадок ресуспендировали в том же самом объеме 90% (масс./об.) фенола при 65°C в течение 30 мин при перемешивании. Смесь центрифугировали при 4000 × g в течение 10 минут для ускорения разделения фаз. Водную фазу собирали, и фенольную фазу еще раз экстрагировали водой. Объединенные водные фазы объединяли, и фенольную фазу экстрагировали с использованием ¼ объема хлороформа. Водную фазу помещали в поток воздуха на ночь для выпаривания какого-либо остаточного органического растворителя и диализировали против воды MQ в течение 3 суток с использованием мембраны для диализа с 500 MWCO (минимальная отсекаемая молекулярная масса). Подвергнутые диализу LPS замораживали и лиофилизировали с получением чистых LPS.

Чистоту продуктов LPS, которые выделяли, контролировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с трицин-SDS (Marolda et al., 2006).

Получение полисахаридов О-антигена

Полисахариды выделяли из LPS *S. typhimurium* дикого типа (гладкие) путем гидролиза слабой кислотой гликозидной связи, связывающей липид А с проксимальным сахаром KDO (Raetz and Whitfield, 2002a). 4-5 мг/мл LPS *S. typhimurium* растворяли в 10% уксусной кислоте и инкубировали при 100°C в течение 1 часа. Получающийся в

результате липид А удаляли из раствора путем центрифугирования при $10000 \times g$ в течение 30 минут при 4°C , супернатант, содержащий полисахарид, замораживали и лиофилизировали в течение ночи.

Анализ адсорбции хвостового шипа типа ELISA (ELITA)

Анализ ELITA был впервые описан Schmidt et al (Schmidt et al., 2016) с использованием целых бактерий. Авторы изобретения модифицировали анализ для использования с очищенными белками в 96-луночном плоскодонном планшете Nunc MaxiSorp (как представлено на фиг. 11). Лунки насыщали путем инкубации с 100 мкл 10 мкг/мл K9-His или K14-His в буфере PBS (физиологический раствор, забуференный фосфатом) в течение ночи. После стадии блокирования в течение 2 часов с использованием 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS 100 мкл разведений *Salmonella typhimurium* LPS в диапазоне от 200 мкг/мл до 0,0023 мкг/мл добавляли в качестве партнера связывания и инкубировали в течение 1 часа. 100 мкл белка хвостового шипа P22 (P22TSP) с N-концевым Strep-tag® II (IBA) добавляли в течение одного часа, а затем лунки окончательно инкубировали с 100 мкл 1:10000 конъюгированной с StrepTactin пероксидазой хрена (IBA, Göttingen) в течение одного часа, и окрашивали при помощи 2,2'-азино-бис 3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой (ABTS, Sigma-Aldrich) в течение 30-60 мин и визуализировали при 407 нм с использованием планшетного ридера. Лунки 3 раза промывали 150 мкл буфера PBS, содержащего 0,1% BSA, между каждыми из вышеприведенных стадий (Tween-20 исключали из этих экспериментов, поскольку он влиял на анализ). Средний фоновый сигнал (0 мкг/мл LPS) вычитали из каждого усредненного сигнала, распределение ошибок рассчитывали путем добавления индивидуальных стандартных отклонений для трех параллелей к базовой линии в квадрате ($\delta Q = \sqrt{(\delta a)^2 + (\delta b)^2 + \dots + (\delta z)^2}$), где δQ представляет собой погрешность комбинации сумм Q). Кривые зависимости ответа от дозы и константу диссоциации K_D рассчитывали путем подгонки кривой к данным уравнения Хилла следующим образом: $Y = \frac{Y_{\max}[L]^n}{(K_D)^n + [L]^n}$, где Y обозначает фракцию занятых сайтов связывания рецептора, $Y_{\max}$ представляет собой максимальное связывание, [L] представляет собой концентрацию свободного лиганда, и n представляет собой количество сайтов связывания. Хотя каждая конструкция несла два мотива GCN4-PII, n считали равным 1, поскольку они располагались на противоположных концах белка, и, таким образом, не предполагалась их кооперация. Среднюю молекулярную массу гладкого LPS *S. typhimurium* рассчитывали равной 22 кДа, предполагая, что в

среднем полисахаридная структура состоит из 30 повторов О-антигена, как сообщалось (Peterson and McGroarty, 1985; Raetz and Whitfield, 2002b; Schmidt et al., 2016).

Эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом (примеры 1-3)

Все эксперименты с SPR проводили на системе Reichert 2SPR при температуре окружающей среды с использованием подвижного буфера PBS-E (PBS pH 7,4 + 5 mM EDTA). Белки разбавляли до 50 мкг/мл в 20 mM буфере ацетата натрия при pH 4,5 и иммобилизовывали на сенсорном чипе CMD200 (Xantec Bioanalytics, Duesseldorf, Germany) с использованием аминного связывания NHS-EDC (Fischer, 2010) до получения ответа 2000 – 9000 мКОЕИ (относительных единиц интенсивности). После сравнения различных референсных соединений (этанолламин, BSA, казеин и обезжиренное молоко) (Péterfi et al., 2000), этаноламин был выбран в качестве стандартного покрытия для референсного канала для всех экспериментов.

Все лиганды солибилизировали до 1 мг/мл в подвижном буфере путем экструзии (21 пропускание через фильтр 100 мкм при 70°C). Эксперименты проводили при скорости потока 50 мкл/мин в трех параллелях. Каждый образец инжесктировали в канал для измерения и референсный канал в течение 90 секунд с последующей диссоциацией в течение 300 секунд. Чип регенерировали путем 2 × инъекций по 30 с буфера для регенерации (0,05% (масс./масс.) CHAPS, 0,05% (масс./масс.) цвиттергент 3-12, 0,05% (об./об.) твин 80, 0,05% (об./об.) твин 20 и 0,05% (об./об.) тритон X-100) (Andersson, Areskoug and Hardenborg, 1999). Измеренные данные экспортировали в TraceDrawer (RidgeView instruments lab) для обработки, и окончательные кривые генерировали с использованием Origin (OriginLab corporation). Сигнал для каждой конструкции нормализовывали к K9 с использованием следующей формулы $S = S_0 \left(\frac{\frac{R}{MW}}{\frac{R_{K9}}{MW_{K9}}} \right)$, где S представляет собой нормализованный сигнал, S0

Эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом (примеры 4 и 5)

Эксперименты SPR проводили на системе Niscoya OpenSPR при температуре окружающей среды с использованием подвижного буфера PBS-E (PBS pH 7,4 + 5 mM EDTA). SadA K9 разбавляли до 50 мкг/мл в 10 mM буфера ацетата натрия при pH 4,5 и иммобилизовывали на карбоксильном сенсоре (OpenSPR) с использованием аминного связывания NHS-EDC (Fischer, 2010) до ответа 700 OE.

Все лиганды солибилизировали до 1 мг/мл в подвижном буфере путем экструзии (21 пропускание через фильтр 100 мкм при 70°C). Эксперименты проводили при

скорости потока 35 мкл/мин в трех параллелях. Каждый образец инжесктировали в канал для измерения и референсный канал в течение 125 секунд с последующей диссоциацией в течение 300 секунд. Чип регенерировали путем инъекции в течение 125 с буфера для регенерации (0,05% (масс./масс.) CHAPS, 0,05% (масс./масс.) цвиттергент 3-12, 0,05% (об./об.) твин 80, 0,05% (об./об.) твин 20 и 0,05% (об./об.) тритон X-100) (Andersson et al., 1999). Измеренные данные экспортировали в TraceDrawer (RidgeView instruments lab) для обработки, и окончательные кривые генерировали с использованием Origin (OriginLab corporation).

Электронная микроскопия

Образцы адгезировали к измерительной сетке, окрашивали в течение одной минуты при помощи 1% уранилацетата и погружали в 1,8% метилцеллюлозу/0,4% уранилацетат. Изображения регистрировали при помощи просвечивающего электронного микроскопа Philips CM100 при 80 кВ с использованием камеры Olympus Quemesa.

Анализ с лизатом амебоцитов *Limulus* (LAL)

Маскирующее действие GCN4-PII в отношении LPS тестировали с использованием анализа LAL (Pierce, Thermofisher). В GCN4-PII в диапазоне концентраций 200 мкг/мл – 20 пг/мл вводили 0,5 единиц эндотоксина на мл LPS (ЕЭ/мл), и окрашивали в соответствии с приведенным протоколом.

Круговой дихроизм

Спектры регистрировали с использованием спектрополариметра Jasco J-810 (Jasco International Co). Измерения осуществляли с использованием кварцевой кюветы с длиной пути 1,0 см. Каждый образец пять раз сканировали в диапазоне от 190 до 250 нм со скоростью сканирования 50 нм/мин и шириной щели 0,5 нм. Спектры регистрировали с отношениями GCN4-pII к LPS, составляющими 0, 0,5, 1, 3 и 9 в 10 mM Tris pH 7,4 при 37°C. Приблизительное содержание α -цепи пептида рассчитывали с использованием K2D2.

Спектроскопия при помощи ядерного магнитного резонанса (NMR)

Эксперименты с NMR (ядерным магнитным резонансом) для оценки осуществляли в пробирках для NMR Bel-Art™ SP Scienceware™ 5 мм в.д. Thin Walled Precision, содержащих 450 мкл 1,5 mM синтетического FMet-GCN4-PII (Genscript, China) в 50 mM NaCl, 7% D₂O и 0,2 mM 4,4-диметил-4-силарентан-сульфоновой кислотой (DSS). Спектры регистрировали при 308 K на спектрометре NMR Bruker Avance II 600 МГц,

оборудованном 5 мм криозондом $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. DSS использовали в качестве внутреннего стандарта химического сдвига, и ^{13}C и ^{15}N сравнивали с использованием описанных отношений частот (Wishart et al., 1995). Следующие спектры регистрировали для оценки: ^{13}C - ^1H -HSQC, ^{15}N - ^1H -HSQC, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY с использованием времени смешивания 60 и 80 мс, и ^1H - ^1H NOESY с использованием времени смешивания 80 и 100 мс. Все спектры обрабатывали с использованием Topspin 4.0 и пики регистрировали с использованием CARA 1.9.1 (Keller, 2004).

ИФА, основанный на биотин-LPS (B-LPS)

Черные 96-луночные микропланшеты Greiner покрывали путем инкубирования 100 мкл 10 мкг/мл SadA K9 в буфере PBS (Cold spring harbor) в течение ночи при 4°C . Лунки блокировали на следующие сутки путем инкубирования с 150 мкл 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS. 100 мкл разведения биотинилированных-LPS в диапазоне от 4 нг/мл до 0,06 нг/мл добавляли в качестве партнера связывания и инкубировали в течение 1 часа. Планшеты 3 раза промывали 150 мкл PBS + 0,1% BSA. 100 мкл 1:10000 конъюгированной с StrepTactin пероксидазы хрена (IBA) в течение одного часа, и окрашивали с использованием флуоресцентного субстрата QuantaRed (Thermo) в течение 15 мин и флуоресценцию считывали при длине волны возбуждения: 550 нм, длине волны испускания: 610 нм.

Протокол:

1. Покройте 96-луночный черный планшет Greiner/Nunc Maxisorp путем добавления 100 мкл 10 мкг/мл раствора фрагментов SadA, оставьте на ночь при 4°C .
2. Опустошите лунки, блокируйте с помощью 150 мкл 5% BSA в PBS в течение 2 часов.
3. 3 раза промойте 150 мкл 0,1% BSA в PBS
4. Опустошите лунки, добавьте 100 мкл разведенных биотинилированных LPS.
5. 3 раза промойте 150 мкл 0,1% BSA в PBS
6. Добавьте 100 мкл конъюгированной со Strep-Tactin HRP (IBA) (разведение 1:20000 в PBS + 0,35 M NaCl, 50 mM MgSO_4 , 0,1% BSA) в течение 60 мин
7. 4 раза промойте 150 мкл PBS + 0,35 M NaCl, 50 mM MgSO_4 , 0,1% BSA и затем однократно PBS + 0,1% BSA.
8. Инкубируйте с субстратом Quantared HRP, погасите после 15 мин.

9. Считайте флуоресценцию при длине волны возбуждения: 550 нм, длине волны испускания: 610 нм.

Все субстраты готовили в соответствии с указаниями производителя. Когда фон вычитали из сигнала, распределение ошибок рассчитывали путем добавления индивидуальных стандартных отклонений для повторов к базовой линии в квадрате ($\delta Q = \sqrt{(\delta a^2 + \delta b^2 + \dots + \delta z^2)}$), где δQ представляет собой погрешность комбинации сумм Q). Планка погрешностей представляет одно стандартное отклонение.

Пример 1 – GCN4-PII связывает липид А

Ожидалось исследовать предполагаемое взаимодействие между LPS и двумя доменами, относящимися к тримерному ауто транспортеру адгезину, SadA. Использовали две ранее описанные конструкции SadA (Alvarez et al., 2008; Hartmann et al., 2012) K9 и K14, обе из них были стабилизированы фланкирующими сегментами GCN4-PII. K9 или K14 ковалентно связывали с чипом SPR, и инжестировали различные компоненты LPS. Схематический вариант структуры LPS показан на фиг. 2.

Инжекция гладкого LPS сразу дала ответ, который достигал стабильного состояния к концу инъекции (фиг. 3а). В течение следующей стадии диссоциации сигнал оставался на плато, что свидетельствует об отсутствии диссоциации. Инжекция шероховатых и глубоко шероховатых вариантов LPS (фиг. 3b и 3с) демонстрировала похожие кривые связывания за исключением легкого увеличения сигнала в течение фазы диссоциации, тогда как очищенный полисахарид не демонстрировал характеристик связывания (фиг. 3d).

Эти результаты показали, что все варианты, содержащие группировку липида А, связывались сильно с GCN4-PII, однако чистый полисахарид не связывался, таким образом, локализуя взаимодействие с группировкой липида А. Тем не менее, отсутствие диссоциации и предрасположенность LPS к образованию агрегатов в растворе (Sasaki and White, 2008; Richter et al., 2011) означает усложненную потенциальную биофизическую характеристику взаимодействия и означает то, что результаты могут быть интерпретированы только качественно. Полагали то, что увеличение сигнала после инъекции шероховатого и глубоко шероховатого вариантов LPS было обратно пропорционально количеству сахарных остатков, представленных в каждом варианте. В частности, глубоко шероховатый LPS обладал значительно большим отношением гидрофобных к гидрофильным остаткам, принимая в большей степени менее жидкую морфологию по сравнению с LPS с более длинными сахарными группировками (Richter

et al., 2011). Таким образом, увеличение сигнала после инъекции интерпретировали как следствие более медленной реорганизации и разрушения глубоко шероховатых агрегатов по сравнению с гладким вариантом.

Конструкции очищали с использованием $6 \times \text{His}$ -концевой последовательности, которая, как предполагалось, оказывает эффект истощения эндотоксина, во время очистки вследствие неспецифического связывания (Mack et al., 2014). Для оценки действия His концевой последовательности в отношении связывания сравнивали две ограниченные GCN4-pII конструкции SadA, которые были идентичны за исключением His-концевой последовательности (K3 и K3-His). Это позволило получить почти идентичные конструкции и с предшествующими конструкциями, демонстрируя то, что His-концевая последовательность не оказывала влияние на связывание (фиг. 10).

Рассматривали, была ли природа взаимодействия между GCN4-PII гидрофобной, электростатической или их комбинацией. Выбор раствора для регенерации помог определить это. В процессе тестирования подходящих буферов для регенерации перед экспериментами обнаружено то, что 1M NaCl не оказывал эффекта, тогда как смесь неденатурирующих детергентов, пересчитанная к 0,3%, регенерировала образцы в течение менее чем 60 секунд. Это указывало на сильно гидрофобный фактор, вовлеченный в взаимодействие.

Пример 2 – GNC4-PII связывается с высокой аффинностью

Результаты SPR не подходили для определения кинетики связывания взаимодействия GCN4-pII/LPS. Для количественного определения аффинности описанный ранее подобный ИФА анализ адсорбции хвостового шипа (ELITA) (Schmidt et al., 2016) модифицировали с использованием очищенных белков вместо цельных бактерий. Анализ напоминал традиционный ИФА за исключением того, что антитело заменяли на фаговый белок хвостового шипа, который распознавал О-антиген LPS (фиг. 11). Результаты показали, что обе конструкции проявляли чрезмерно высокую аффинность связывания в меньшем диапазоне пМ (фиг. 5), что соответствовало нулевым скоростям диссоциации, которые были обнаружены в экспериментах SPR. Это оказалось благоприятным, поскольку обеспечивало применение концентраций LPS ниже критической концентрации мицеллообразования (CMC) гладких LPS, которые в противном случае затрудняли взаимодействие (Yu et al., 2006; Sasaki и White, 2008). Тем не менее, вследствие предрасположенности LPS покрывать лунки микротитровального

планшета перед блокированием установка опосредованного взаимодействия лиганд-рецептор была невозможной.

Пример 3 - GCN4-pII растворяет агрегаты LPS

Обнаружили то, что добавление GCN4-PII к LPS вызывало видимое разрушение агрегатов LPS. Это исследовали путем сравнения структур шероховатых LPS при различных отношениях GCN4-pII при использовании просвечивающей электронной микроскопии (фиг. 6). Перед экспериментами подтвердили то, что синтетический GCN4-pII связывался с LPS и сохранял свою α -спиральную структуру после связывания с помощью анализа, маскирующего LAL (Schwarz et al., 2017), кругового дихроизма и NMR. Спектр NMR подтвердил то, что пептид существовал в гомологическом α -спиральном состоянии (фиг. 14), которое сохранялось при связывании LPS (фиг. 12), и демонстрировало по меньшей мере 89% нейтрализующее действие (связывание) в отношении LPS при концентрации GCN4-pII 1 мкМ (фиг. 13).

С помощью TEM (просвечивающей электронной микроскопии) обнаружили, что шероховатые LPS образуют трубчатые мицеллы с радиусом приблизительно 10 нм и длиной, составляющей до сотен нм (фиг. 6, сверху), как сообщалось ранее для сгуо-ЕМ (Richter et al., 2011; Broeker et al., 2018). После инкубирования с эквимольными GCN4-PII мицеллярные структуры полностью исчезали, оставив случайные агрегаты, вероятно, вызванные слабой агрегацией комплексов пептид-LPS (фиг. 6, внизу).

Обсуждение результатов (примеры 1-3)

Авторы изобретения исходно поставили задачу исследовать предположительное взаимодействие между тримерными доменами SadA и LPS. Однако полученные результаты продемонстрировали то, что адаптеры GCN4-pII, которые авторы изобретения использовали для стабилизации конструкций, демонстрируют чрезвычайно высокую аффинность в отношении LPS. Интересно то, что аффинность GCN4-pII с К_D в пикомолярном диапазоне на 3-5 порядков выше, чем у человеческих иммунорецепторов LPS TLR4 (141 мкМ), CD14 (74 нМ), MD-2 (2,33 мкМ) и LPS-связывающего белка (3,5 нМ). Константы диссоциации авторы изобретения, полученные для GCN4-pII, были также на 1-6 порядков выше, чем для полимиксина В (48 мкМ) и даже для пептидных авител, специальным образом разработанных с целью получения наивысшей достигаемой аффинности. Кроме того, в противоположность нескольким вышеупомянутым партнерам связывания, авторы изобретения показали то, что GCN4-pII является специфическим в отношении липида А. Авторы изобретения с помощью

детергентов показали то, что это взаимодействие является обратимым, и что GCN4-pII легко диссоциирует агрегаты LPS в растворе, что свидетельствует о том, что взаимодействие является в значительной степени гидрофобным. Насколько авторы изобретения знают, это является первым сообщением о тримерном суперспиральном мотиве, связывающем LPS. GCN4-pII, содержащая кристаллические структуры, о которых упоминалось ранее (Hartmann *et al.*, 2012), демонстрирует то, что атомы углерода γ_2 и δ , относящиеся к изолейцинам сердцевинной структуры, торчат из нее, образуя гидрофобные поверхности вокруг суперспиральных бороздок. Можно предположить то, что одна или более чем одна из ацильных цепей липида А может располагаться вдоль этих бороздок, образуя чрезвычайно сильное взаимодействие, представляя собой модель, которая также объясняет то, каким образом GCN4-pII может разрушать агрегаты LPS. Тем не менее, GCN4-pII также имеет С-концевой участок из катионных остатков, и они также могут вносить вклад в взаимодействие.

Пример 4 – Чувствительность ИФА, основанного на GCN4-pII

Цель этого эксперимента заключалась в том, чтобы продемонстрировать то, что в принципе связывание олигомерного белка с LPS, как показано в настоящем описании с GCN4-pII, может детектировать количества LPS с интенсивностью, равной или близкой к анализу LAL. Как в предшествующих примерах, авторы изобретения использовали конструкции, основанные на SadA, в частности, описанную выше конструкцию K9.

Для обеспечения полной воспроизводимости анализа эксперимент с чувствительностью был осуществлен в 4 повторностях с окончательно оптимизированными условиями. Для нейтрализации краевого эффекта использовали только внутренние произвольным образом выбранные лунки. Единственное исключение составили лунки A3:A10, которые были зарезервированы под образец с самой высокой концентрацией. Те же самые образцы были затем измерены для сравнения в анализе LAL. В результаты было включено только одно повторение.

В ИФА, основанном на GCN4-pII с использованием биотинилированных LPS (B-LPS) для обнаружения (фиг. 15), обнаружен линейный ответ на сигнал в пределах диапазона концентраций LPS 0,06 – 1 нг/мл, что означает то, что этот анализ может неизменно обнаруживать B-LPS вплоть до самого низкого разбавления (0,06 нг/мл).

Для сравнения также проводили анализ LAL. Диапазон концентраций LPS, используемый в анализе LAL, составлял 0,01 – 0,1 МЕ/мл. Самое низкое разведение, которое обеспечивало ясный сигнал, составляло 0,13 нг/мл (фиг. 16), что означает то, что

анализ, основанный на GNC4-pII, обладал чувствительностью, сравнимой с анализом LAL. Сравнение результатов двух анализов представлено на фиг. 17.

Пример 5 – Устойчивость связывания между GCN4-pII и LPS

Для исследования устойчивости связывания между GCN4-pII и различными типами LPS использовали SPR для проверки широкого выбора вариантов LPS, собранных из различных патогенов и протеобактерий (таблица 4). Вкратце, K9 иммобилизовали на карбоксильной матрице на чипе для SPR с использованием аминного связывания, основанного на EDC-NHS. Различные типы LPS инжектировали в трех параллелях в концентрации 0,5 мг/мл для обнаружения сигнала.

Таблица 4

Тип	Кандидат	Тип	Примечание
α-протеобактерии	<i>B. henselae</i>	Шероховатый	LPS <i>B. henselae</i> представляет собой один из немногих известных непирогенных типов LPS (Chenoweth et al., 2004).
β-протеобактерии	<i>Neisseria lactamica</i>	Шероховатый	<i>Neisseria</i> spp. несет LPS-подобные молекулы, названные липоолигосахаридами (LOS). LOS структурно очень похожи на классические LPS, но редко встречаются с O-антигеном (Moran et al., 1996).
γ- протеобактерии	<i>E. coli</i> BL21, <i>S. enterica</i> , <i>S. anatum</i>	-	Связывание продемонстрировано ранее для нескольких видов.
Бактероиды	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Гладкий	Точная структура не известна, возможно гладкий вариант.
Необычные LPS	<i>V. cholerae</i>	Шероховатый	LPS <i>V. cholerae</i> обладают необычными картинами ацилирования LipidA, и отсутствие фосфатной группы

			на сахаре Kdo2 (Reidl and Klose, 2002).
--	--	--	---

В более ранней работе авторы изобретения сравнивали связывание LPS, полученных из γ -протеобактерий, а именно, *S. enterica*, *S. anatum* и *E. coli BL21*. Инъекция LPS немедленно приводила к ответу, который приближался к стабильному состоянию к концу инъекции. Во время следующей стадии диссоциации сигнал оставался на плато, что указывает на то, что отсутствовала измеримая скорость диссоциации. Хотя различные кривые обладают очень похожей формой, окончательный ответ (мкЕОИ) варьировал между ними с обратной корреляцией с количеством группировок сахара на молекулу LPS. Это означает то, что шероховатые типы LPS (лишенные О-антигена) как правило обеспечивают гораздо более сильный сигнал по сравнению с гладкими вариантами (с О-антигенными повторами). Поскольку все типы LPS инжестировали в одинаковой гравиметрической концентрации (мг/мл), различие в ответе вероятно отражает более низкую молярность вариантов с высокой молекулярной массой.

Все кривые связывания для типов LPS, которые авторы изобретения проверили в данной работе (фиг. 18), обладали похожими кривыми связывания без скорости диссоциации, что свидетельствует о сильном связывании. *S. typhimurium* WaaL LPS представляет собой шероховатый тип, который, как ожидается, демонстрирует умеренно высокий ответ при инъекции. *N. lactamica* и *B. henselae* представляют собой крупные шероховатые варианты, которые, как ожидается, демонстрируют ответ в том же самом диапазоне, как WaaL, тем не менее, *N. lactamica* демонстрирует ответ, который был вдвое большим, что может быть объяснено большим количеством модификаций сиаловой кислотой сахаров сердцевинной структуры. *V. cholerae* имеет смесь шероховатых и низкомолекулярных гладких LPS. Таким образом, ответ приблизительно 1/3 относительно сигнала WaaL был неожиданным. LPS *P. gingivalis* обладал меньшим ответом, что свидетельствует о гладком типе LPS с размером от среднего до крупного. В документации, поступившей с коммерчески полученными LPS *P. gingivalis*, не назван штамм или вариант, таким образом, масса должна быть подтверждена SDS-PAGE.

В заключение, GCN4-pII связывался со всеми типами LPS, которые были протестированы.

Обсуждение результатов (Примеры 4 и 5)

В анализе LAL используется каскад ферментов из крови мечехвоста (Lee, 2007), который высокочувствителен к низким количествам LPS. С использованием анализа LAL для прямого сравнения авторы изобретения смогли продемонстрировать то, что пептид GCN4-pII может связывать биотинилированные LPS в концентрациях, которые едва обнаруживаются с использованием анализа LAL, и то, что это связывание приводит в результате к видимому сигналу при использовании стандартных способов обнаружения для биотина, связанного с флуоресцентным ферментативным субстратом. Важно то, что этот способ обнаружения работает при различных фоновых буферах и также при инъектируемом фоновом лекарственном средстве. Авторы изобретения достигли чувствительности 0,01 МЕ/мл LPS, сравнимой с анализом LAL, и данные, полученные авторами изобретения, свидетельствуют о том, что даже более высокие чувствительности могут быть достигнуты с использованием ИФА-подобного анализа, предложенного авторами, например, путем доработки условий буфера для промывки.

Авторы изобретения использовали варианты LPS различных монофилетических групп протеобактерий, начиная от альфа- до гамма-протеобактерий, и от бактериодов (фиг. 19). Выбор авторов изобретения охватывает энтеропатогены (*Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*), внутриклеточные патогены (*Bartonella henselae*) и патогены ротовой полости (*Porphyromonas gingivalis*), а также симбиотические бактерии (*Neisseria lactamica*). Известно, что один из использованных видов имеет вариант LPS, который не вызывает сильный иммунный ответ (*Bartonella henselae*) (Zähringer et al., 2004).

Salmonella spp. расположены с *Escherichia*, и не представлена отдельно на дереве, изображенном на фиг. 19. Также отмечают то, что *Bartonella* spp. расположены ближе всего к показанным *Brucella*, и что *Porphyromonas gingivalis* представляет собой часть бактериодов для целей этой фигуры. Кроме того, большие группы *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Spirochaetes* не обладают LPS в качестве части своих мембранных компонентов.

В целом, с использованием SPR, авторы изобретения смогли продемонстрировать то, что все используемые варианты LPS сильно связывались с пептидом GCN4-pII. Хотя существовали видимые различия в “скорости ассоциации” связывания, не обнаружена “скорость диссоциации” для каких-либо из вариантов LPS, что свидетельствует о том, что пептид может детектировать все эти варианты схожим образом (несмотря на не большие различия в кинетике связывания).

Ссылки:

Alvarez, B. H. et al. (2008) 'A new expression system for protein crystallization using trimeric coiled-coil adaptors', *Protein Engineering Design & Selection*, 21(1), pp. 11–18. doi: DOI 10.1093/protein/gzm071.

Andersson, K., Areskoug, D. and Hardenborg, E. (1999) 'Exploring buffer space for molecular interactions', *Journal of Molecular Recognition*, 12(5), pp. 310–315. doi: 10.1002/(SICI)1099-1352(199909/10)12:5<310::AID-JMR470>3.0.CO;2-5.

Bern, M., Goldberg, D., 2005. Automatic selection of representative proteins for bacterial phylogeny. *BMC Evol. Biol.*

Bertani, B. and Ruiz, N. (2018) 'Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides', *EcoSal Plus*, 8(1). doi: 10.1128/ecosalplus.esp-0001-2018.

Broeker, N. K. et al. (2018) 'In vitro studies of lipopolysaccharide-mediated DNA release of podovirus HK620', *Viruses*. MDPI AG, 10(6), p. 289. doi: 10.3390/v10060289.

Chenoweth, M.R., Greene, C.E., Krause, D.C., Gherardini, F.C., 2004. Predominant outer membrane antigens of *Balgonella henselae*. *Infect. Immun.* 72, 3097–3105.

Darveau, R. P. and Hancock, R. E. W. (1983) 'Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains', *Journal of Bacteriology*, 155(2), pp. 831–838.

Deiss, S. et al. (2014) 'Your personalized protein structure: Andrei N. Lupas fused to GCN4 adaptors', *Journal of Structural Biology*. Elsevier Inc., 186(3), pp. 380–385. doi: 10.1016/j.jsb.2014.01.013.

Delano, W. L. and Brünger, A. T. (1994) 'Helix packing in proteins: Prediction and energetic analysis of dimeric, trimeric, and tetrameric GCN4 coiled coil structures', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. doi: 10.1002/prot.340200202.

Fischer, M. J. E. (2010) 'Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach', in. Humana Press, pp. 55–73. doi: 10.1007/978-1-60761-670-2_3.

Franke, D. et al. (2017) 'ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions', *Journal of Applied Crystallography*. doi: 10.1107/S1600576717007786.

Galanos, C., Lüderitz, O. and Westphal, O. (1969) 'A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharides', *European Journal of Biochemistry*, 9(2), pp. 245–249. doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.

Harbury, P. B. et al. (1993) 'A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants', *Science*, 262(5138), pp. 1401–1407. doi: 10.1126/science.8248779.

Hartmann, M. D. et al. (2012) 'Complete fiber structures of complex trimeric autotransporter adhesins conserved in enterobacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(51), pp. 20907–20912. doi: 10.1073/pnas.1211872110.

Hitchcock, P. J. et al. (1986) 'Lipopolysaccharide nomenclature - past, present, and future', *Journal of Bacteriology*. doi: 10.1128/jb.166.3.699-705.1986.

Keller, R. (2004) *The computer aided resonance assignment tutorial*, Goldau, Switzerland: Cantina Verlag.

Lee, P.S., 2007. Endotoxins : pyrogens, LAL testing and depyrogenation, in: Williams, K.L. (Ed.), . Informa Healthcare, p. 419.

Lupas, A. N. and Gruber, M. (2005) 'The structure of α -helical coiled coils', *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press Inc., 70, pp. 37–38. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70003-6.

Mack, L. et al. (2014) 'Endotoxin depletion of recombinant protein preparations through their preferential binding to histidine tags', *Analytical Biochemistry*. Academic Press, 466, pp. 83–88. doi: 10.1016/J.AB.2014.08.020.

Marolda, C. L. et al. (2006) 'Micromethods for the Characterization of Lipid A-Core and O-Antigen Lipopolysaccharide', in *Glycobiology Protocols*. New Jersey: Humana Press, pp. 237–252. doi: 10.1385/1-59745-167-3:237.

Moran, A.P., Prendergast, M.M., Appelmelk, B.J., 1996. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16, 105–115.

Péterfi, Z. et al. (2000) 'Comparison of Blocking Agents for an Elisa for Lps', *Journal of Immunoassay*, 21(4). doi: 10.1080/01971520009349541.

Peterson, A. A. and McGroarty, E. J. (1985) 'High-molecular-weight components in lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, and *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 162(2), pp. 738–745.

Raetz, C. R. H. and Whitfield, C. (2002a) 'Lipopolysaccharide Endotoxins', *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), pp. 635–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

Raetz, C. R. H. and Whitfield, C. (2002b) 'Lipopolysaccharide Endotoxins', Annual Review of Biochemistry. Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710, USA. raetz@biochem.duke.edu, 71, pp. 635–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

Reidl, J., Klose, K.E., 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol. Rev.

Richter, W. et al. (2011) 'Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin.', *Innate immunity*, 17(5), pp. 427–38. doi: 10.1177/1753425910372434.

Sasaki, H. and White, S. H. (2008) 'Aggregation behavior of an ultra-pure lipopolysaccharide that stimulates TLR-4 receptors', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 95(2), pp. 986–993. doi: 10.1529/biophysj.108.129197.

Schmidt, A. et al. (2016) 'Bacteriophage tailspike protein based assay to monitor phase variable glucosylations in *Salmonella* O-antigens'. doi: 10.1186/s12866-016-0826-0.

Schwarz, H. et al. (2017) 'Biological activity of masked endotoxin', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep44750.

Studier, F. W. (2005) 'Protein production by auto-induction in high density shaking cultures', *Protein Expr Purif.* 2005/05/26. Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY 11973, USA. studier@bnl.gov, 41(1), pp. 207–234.

Wishart, D. S. et al. (1995) '1H, 13C and 15N chemical shift referencing in biomolecular NMR', *Journal of Biomolecular NMR*. doi: 10.1007/BF00211777.

Yu, L. et al. (2006) 'Determination of critical micelle concentrations and aggregation numbers by fluorescence correlation spectroscopy: Aggregation of a lipopolysaccharide', *Analytica Chimica Acta*, 556(1), pp. 216–225. doi: 10.1016/j.aca.2005.09.008.

Zähringer, U., Lindner, B., Knirel, Y.A., Van Den Akker, W.M.R., Hiestand, R., Heine, H., Dehio, C., 2004. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J. Biol. Chem.*

Формула изобретения

1. Применение олигомерного белка в качестве связывающего агента для связывания с липополисахаридом (LPS), где указанный олигомерный белок имеет суперспиральную структуру, содержащую по меньшей мере два мономерных пептида, где каждый из мономерных пептидов, которые могут быть одинаковыми или разными, способен образовывать α -спираль и содержит по меньшей мере одну сердцевинную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичность последовательности с гептадной повторяющейся последовательностью SEQ ID NO: 1.

2. Применение по п. 1, где сердцевинная последовательность содержит по меньшей мере 3 гептадных мотива a-b-c-d-e-f-g или их варианты, где каждый вариант содержит не больше чем 1 вставку или делецию в гептадном мотиве.

3. Применение по п. 1 или п. 2, где по меньшей мере 50% аминокислотных остатков, соответствующих положениям a и d гептадных мотивов или их вариантов, представляют собой гидрофобные остатки.

4. Применение по любому из пп. 1-3, где сердцевинная последовательность ограничена с одной или обеих сторон фланкирующей аминокислотной последовательностью.

5. Применение по п. 4, где фланкирующая последовательность содержит один или более чем один гептадный мотив и/или одну или более чем одну его часть, предпочтительно, где гептадный мотив в фланкирующей последовательности соответствует гептадному мотиву, находящемуся в SEQ ID NO: 1 или в последовательности, имеющей с ней по меньшей мере 80% идентичность последовательности, при условии, что по меньшей мере один из аминокислотных остатков a и d в гептадном мотиве представляет собой гидрофобный остаток.

6. Применение по п. 4 или 5, где фланкирующая последовательность содержит SEQ ID NO: 1 либо ее часть или последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 50% идентичность последовательности, где по меньшей мере 50% аминокислотных остатков, соответствующих положениям a и d гептадных мотивов в SEQ ID NO: 1 или ее вариантах, представляют собой гидрофобные остатки.

7. Применение по любому из пп. 3-6, где фланкирующая последовательность содержит одну или более чем одну линкерную последовательность.

8. Применение по любому из пп. 1-7, где каждый из мономерных пептидов содержит две или более чем две сердцевинные последовательности, где указанные сердцевинные последовательности могут быть одинаковыми или разными.

9. Применение по любому из пп. 1-8, где олигомерный белок представляет собой димер, тример или тетрамер.

10. Применение по любому из пп. 1-9, где олигомерный белок представляет собой тример.

11. Применение по любому из пп. 1-10, где мономерные пептиды представлены в виде отдельных цепей.

12. Применение по любому из пп. 1-10, где мономерные пептиды связаны вместе.

13. Применение по п. 12, где мономерные пептиды связаны в одну цепь или где мономерные пептиды связаны одной или более чем одной химической перекрестной связью.

14. Применение по любому из пп. 1-13, где каждый гидрофобный остаток в гептадном мотиве или его вариантах независимо выбран из группы, состоящей из лейцина, изолейцина, валина, аланина, метионина и их химических производных.

15. Применение по п. 14, где каждый гидрофобный остаток независимо выбран из лейцина и изолейцина или их химических производных.

16. Применение по п. 15, где химические производные представляют собой фторлейцин или фторизолейцин.

17. Применение по любому из пп. 1-16, где по меньшей мере 50% гидрофобных остатков представляют собой изолейцин или фторизолейцин.

18. Применение по любому из пп. 1-17, где:

(1) по меньшей мере 50% аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g в гептадных повторах или их вариантах, представляют собой полярные остатки; и/или

(2) по меньшей мере 5% аминокислотных остатков, соответствующих положениям b, c, e, f и g в гептадных повторах или их вариантах, представляют собой алифатические остатки.

19. Применение по любому из пп. 1-18, где каждый мономерный пептид содержит от 18 до 40 аминокислот.

20. Применение по любому из пп. 1-19, где каждый мономерный пептид содержит по меньшей мере 4 катионные аминокислоты в сердцевинной последовательности.

21. Применение по любому из пп. 1-20, где олигомерный белок связывается с LPS с К_D наномолярном или меньшем диапазоне.

22. Применение по любому из пп. 1-21, где олигомерный белок:

(1) представлен в виде конъюгата или слитого белка с одним или более чем одним дополнительным компонентом;

(2) иммобилизован на твердом субстрате; или

(3) конъюгирован с непосредственно детектируемой группировкой.

23. Применение по п. 22, где:

(1) белок конъюгирован с детектируемой группировкой, олигомеризующей группировкой или иммобилизующей группировкой либо находится в виде слитого белка с партнером слияния;

(2) белок иммобилизован на грануле или смоле, или в или на лунке, или сосуде, или колонке, или фильтровальном материале, или на поверхности детектирующего устройства; или

(3) детектируемая группировка представляет собой группировку, детектируемую спектрофотометрически или спектроскопически.

24. Применение по п. 23, включающее обнаружение LPS в образце и/или удаление LPS из образца.

25. Способ связывания LPS, включающий приведение в контакт LPS или образца, содержащего LPS, с олигомерным белком, определенным в любом из пп. 1-23, для обеспечения связывания белка с LPS с образованием белково-липополисахаридного комплекса.

26. Способ по п. 25, дополнительно включающий обнаружение присутствия LPS в образце, где указанный способ включает:

(а) приведение в контакт образца с олигомерным белком, определенным в любом из пп. 1-23, для обеспечения связывания белка с LPS с образованием белково-липополисахаридного комплекса;

(б) обнаружение присутствия белково-липополисахаридного комплекса.

27. Способ по п. 25, дополнительно включающий удаление LPS из образца, где указанный способ включает:

(а) приведение в контакт образца с олигомерным белком, определенным в любом из пп. 1-23, для обеспечения связывания белка с LPS с образованием белково-липополисахаридного комплекса;

(б) отделения пептидно-липополисахаридного комплекса от образца.

28. Способ по любому из пп. 25-27, где олигомерный белок находится в виде конъюгата, содержащего детектируемую метку, и/или где олигомерный белок иммобилизован на твердом субстрате.

29. Способ по любому из пп. 25-28, где образец представляет собой клинический образец, полученный от пациента, или образец продукта для тестирования на загрязнение эндотоксинами.

30. Способ по п. 29, где образец представляет собой образец крови или образец, полученный из образца крови.

31. Набор, содержащий:

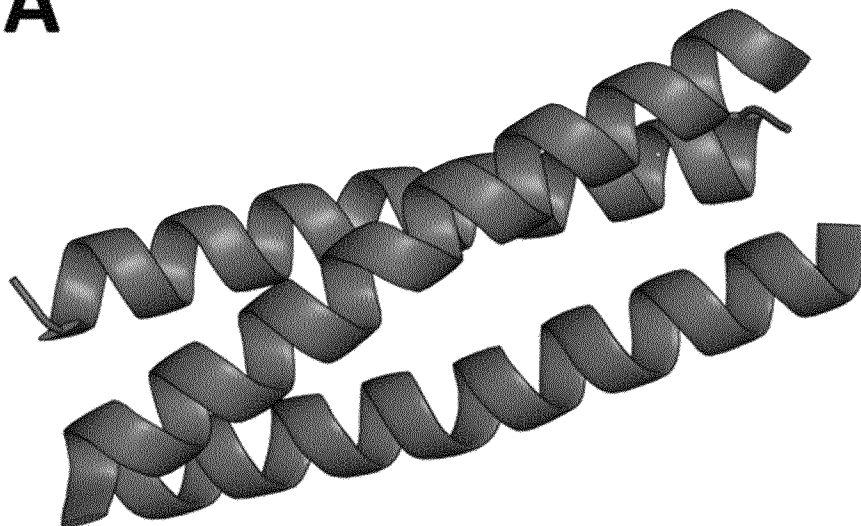
(1) олигомерный белок, определенный в любом из пп. 1-17; и

(2) по меньшей мере один неденатурирующий детергент.

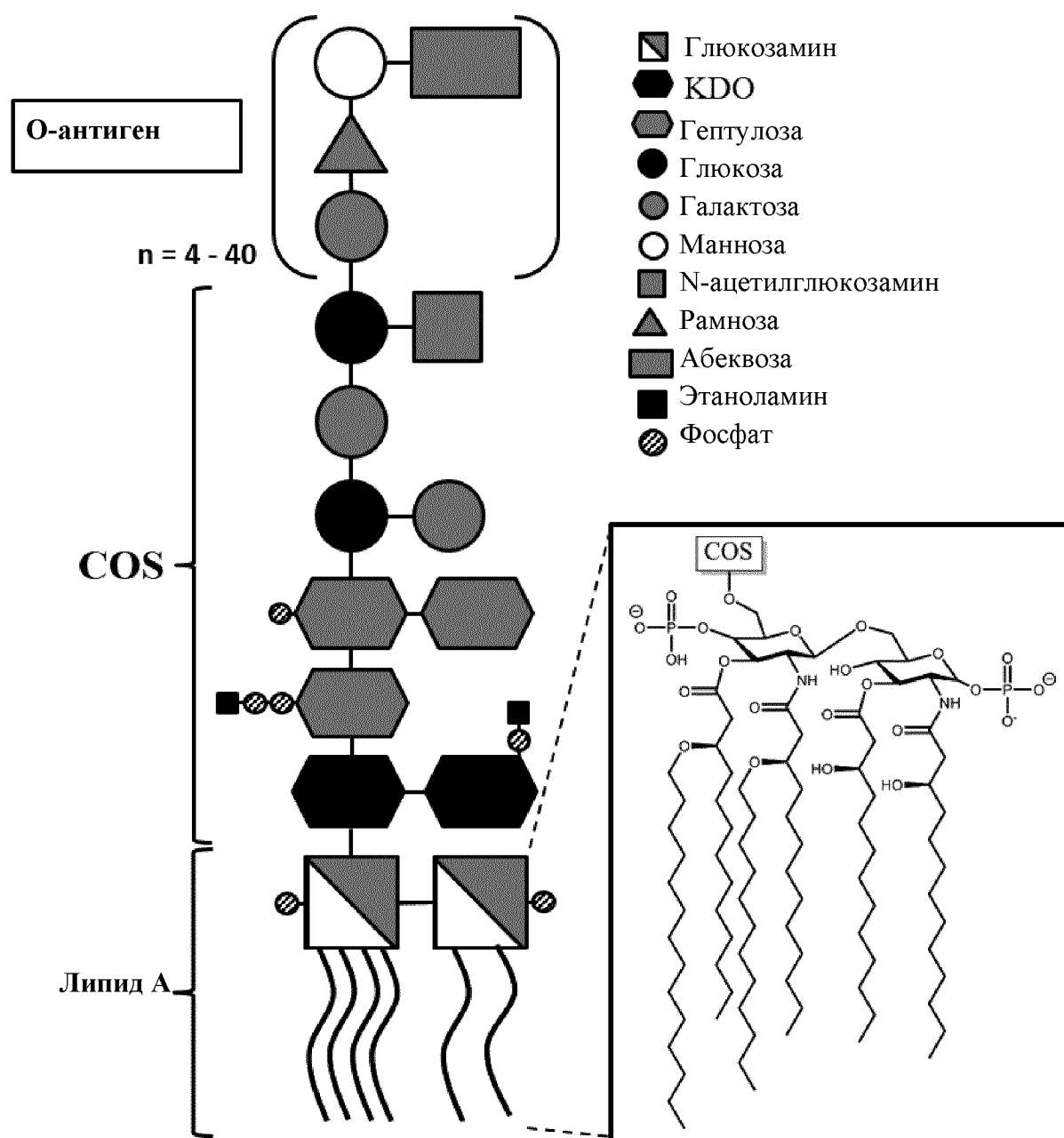
32. Набор по п. 31, предназначенный для применения по любому из пп. 1-24 или в способе по любому из пп. 25-30.

33. Продукт, содержащий олигомерный белок, иммобилизованный на твердом субстрате, где указанный олигомерный белок является таким, как определено в любом из пп. 1-21.

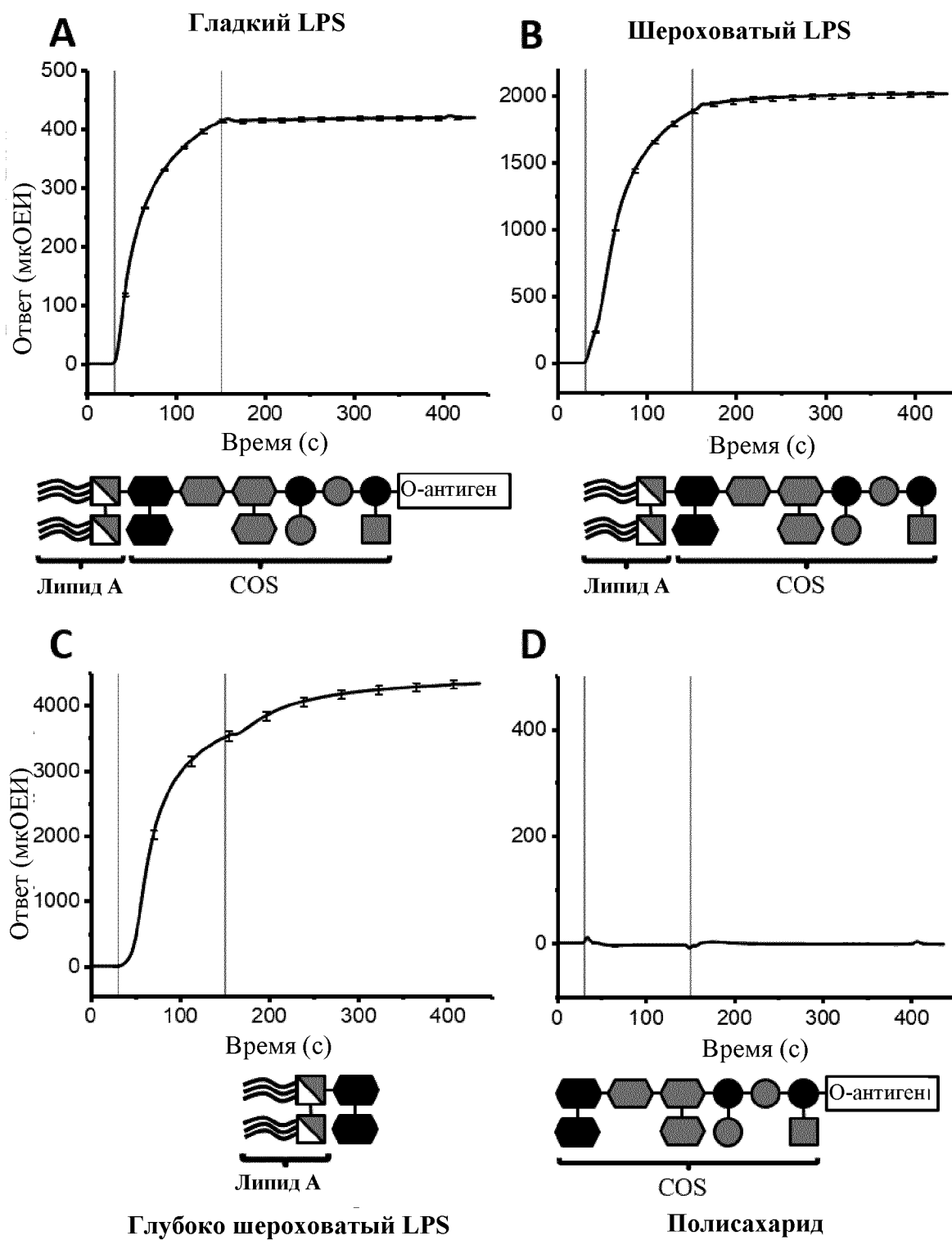
Фиг. 1

A**B**

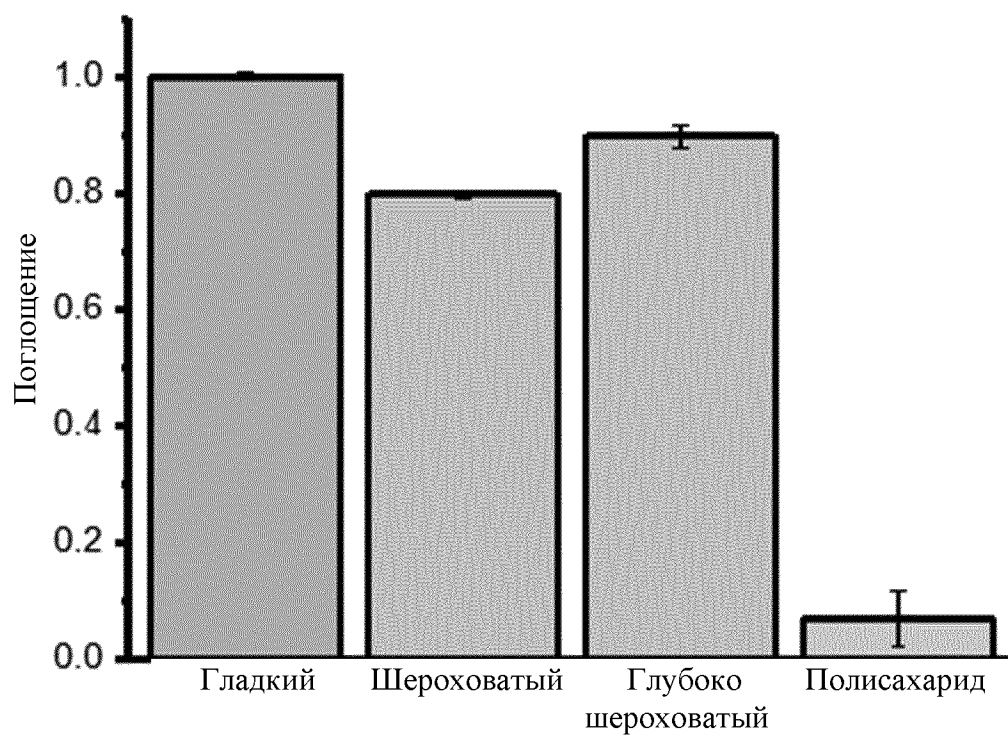
Фиг. 2



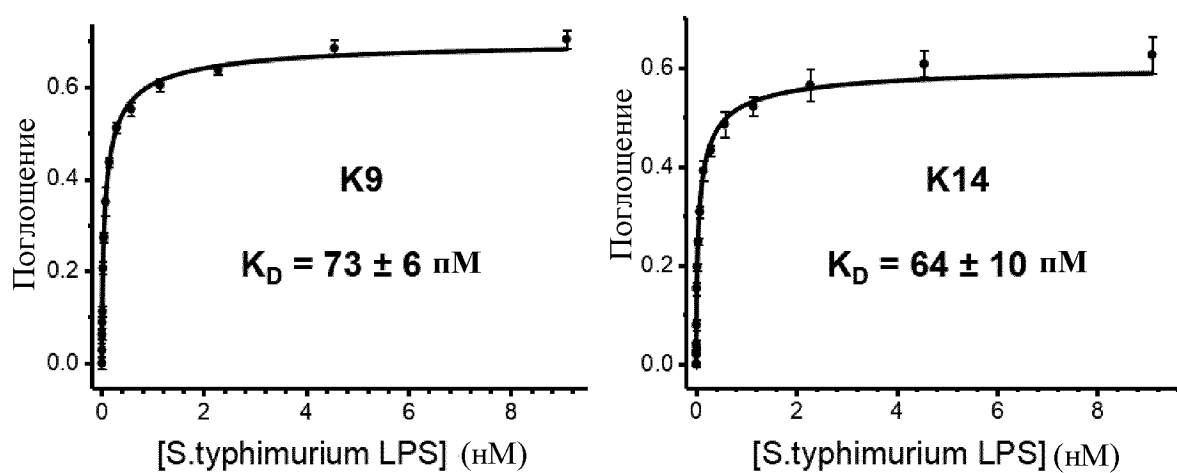
Фиг. 3



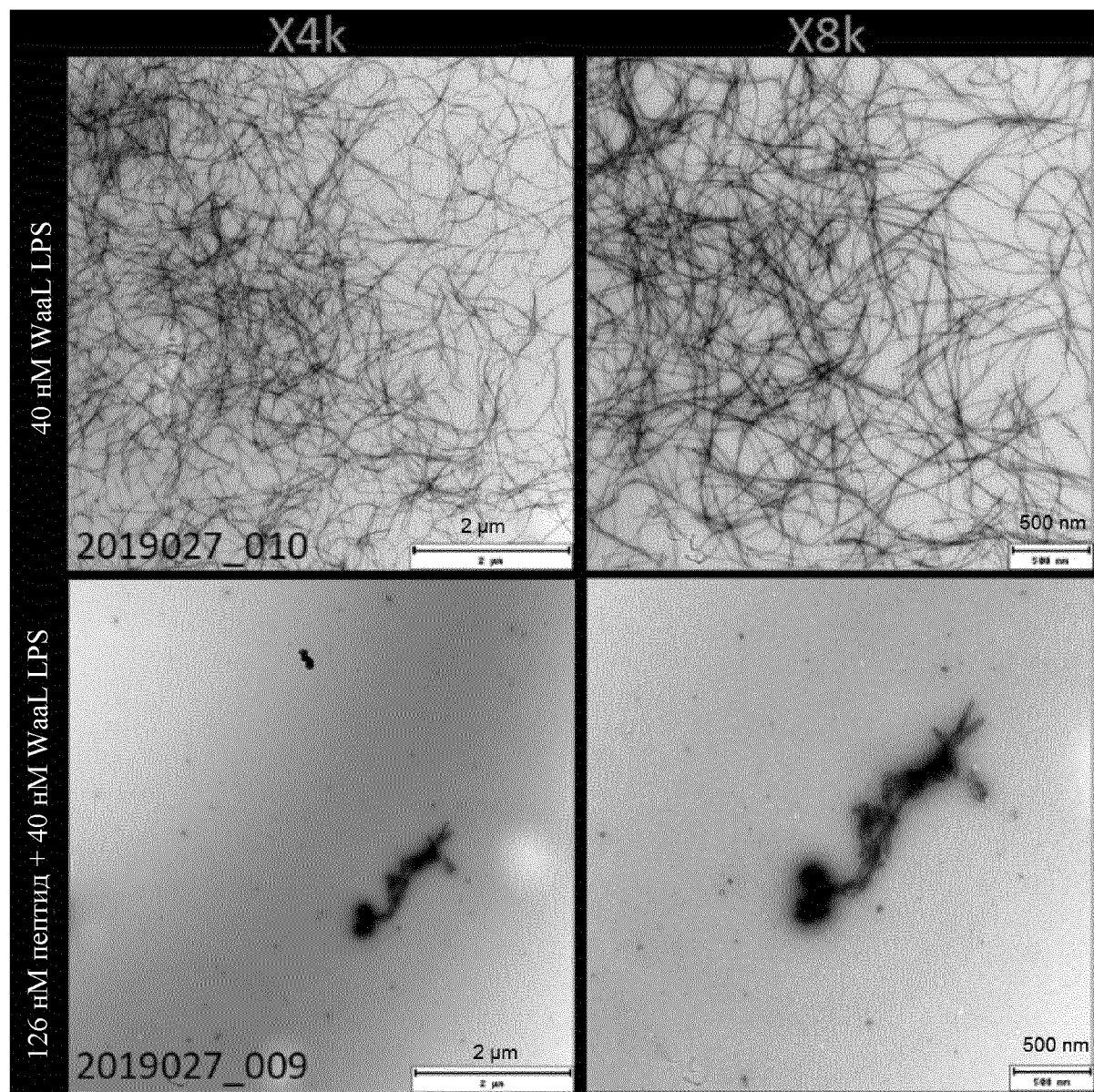
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

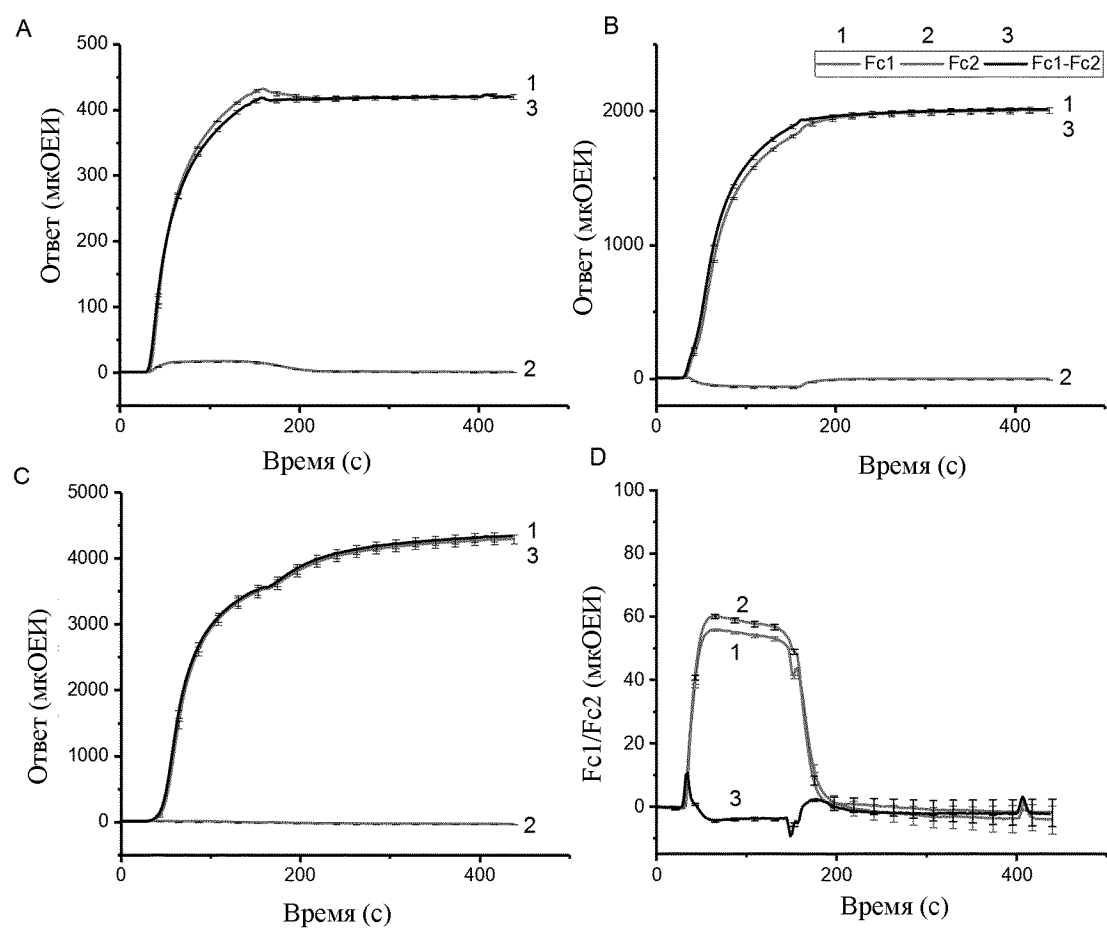


Конструкция	Схематическая структура	Ориджин слияния
K9-His	N - GCN4 K9 GCN4 His ₆ - C	SadA
K14-His	N - GCN4 K14 GCN4 His ₆ - C	SadA
K3-His	N - GCN4 K3 GCN4 His ₆ - C	SadA
K3	N - GCN4 K3 GCN4 - C	SadA
andreinlvpas	N - GCN4 ANDREINLVPAS GCN4 - C	Arbitrary
GCN4*	F _{Met} - GCN4 - C	-
2 × GCN4	N - GCN4 GCN4	-
2 × GCN4-His	N - GCN4 GCN4 His ₆ - C	-
His-SUMO-GCN4*	N - His ₆ SUMO GCN4 - C	Smt3

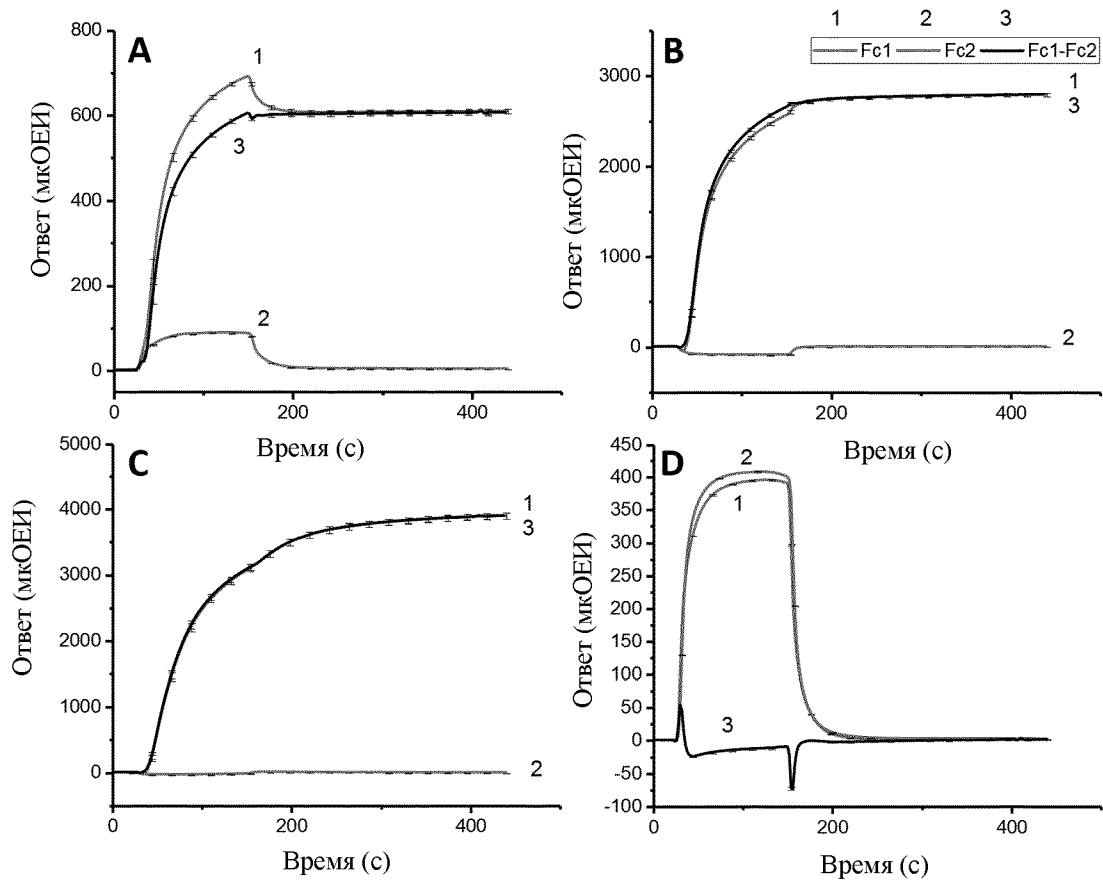
* синтетический пептид

Фиг. 7

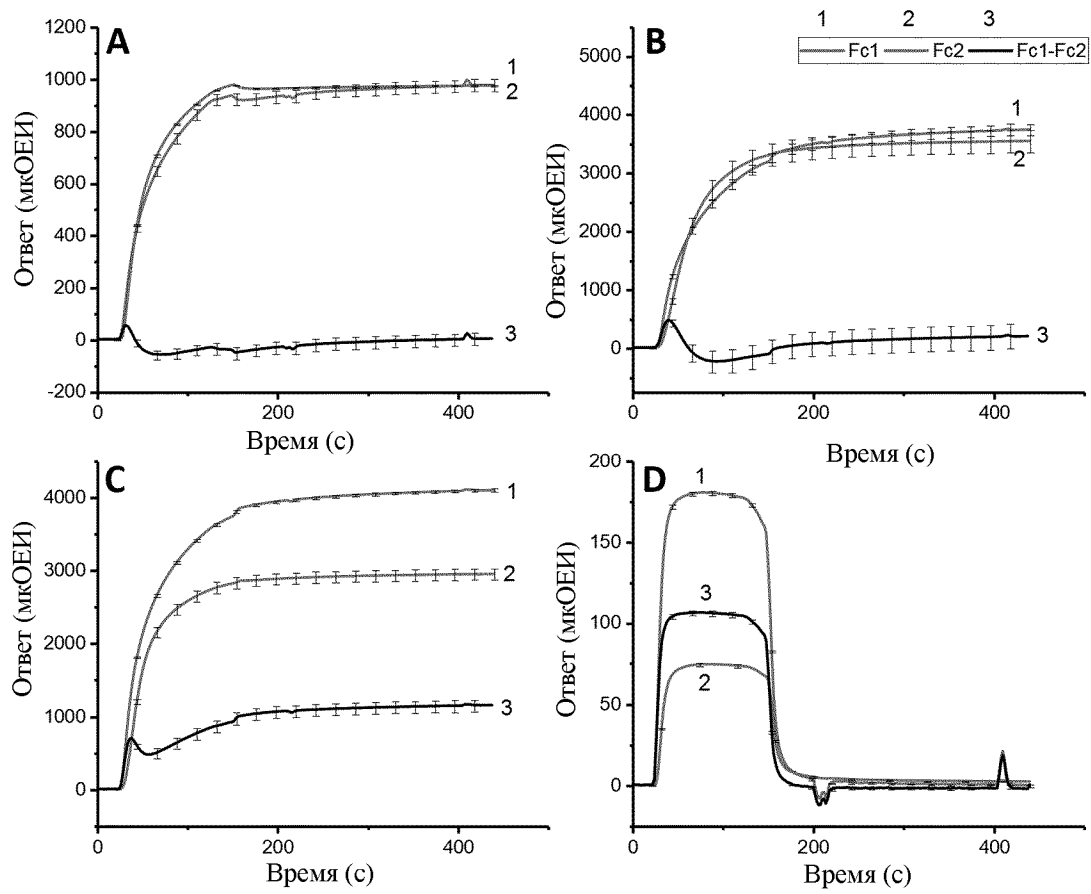
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

Абсолютные величины ELITA с контролями

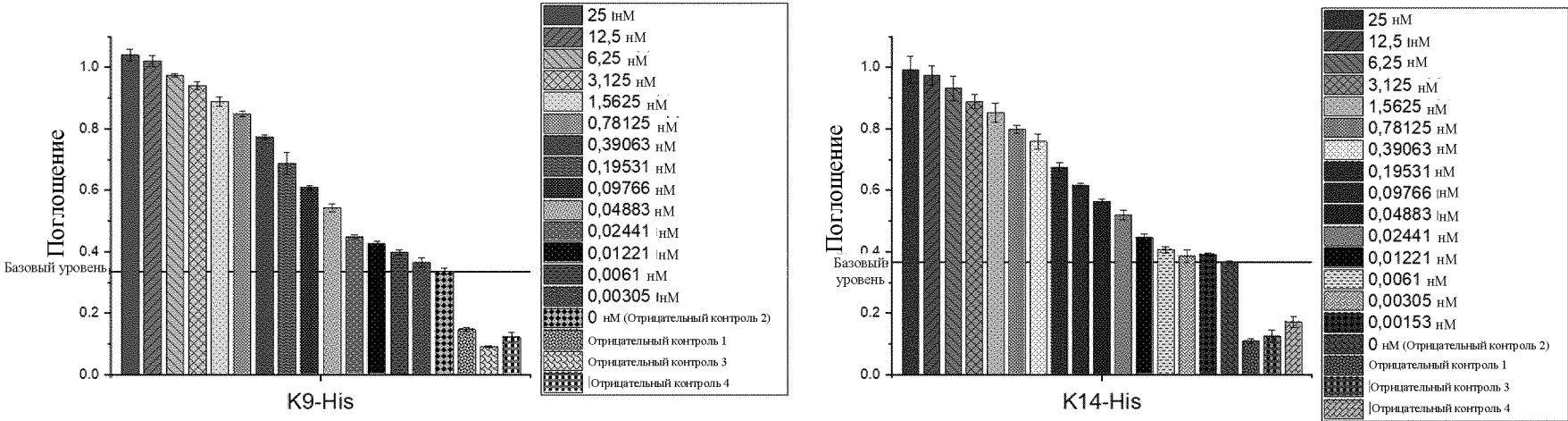
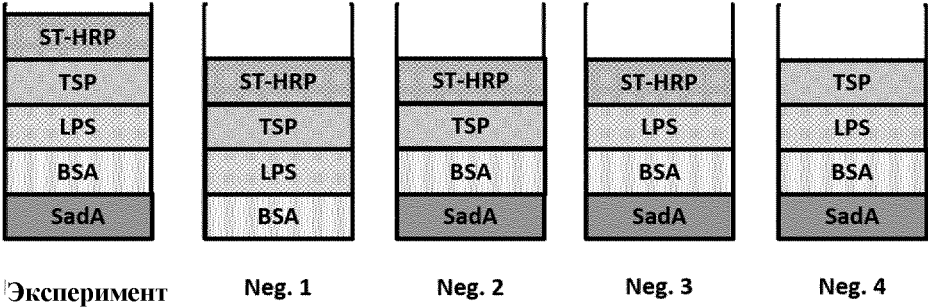
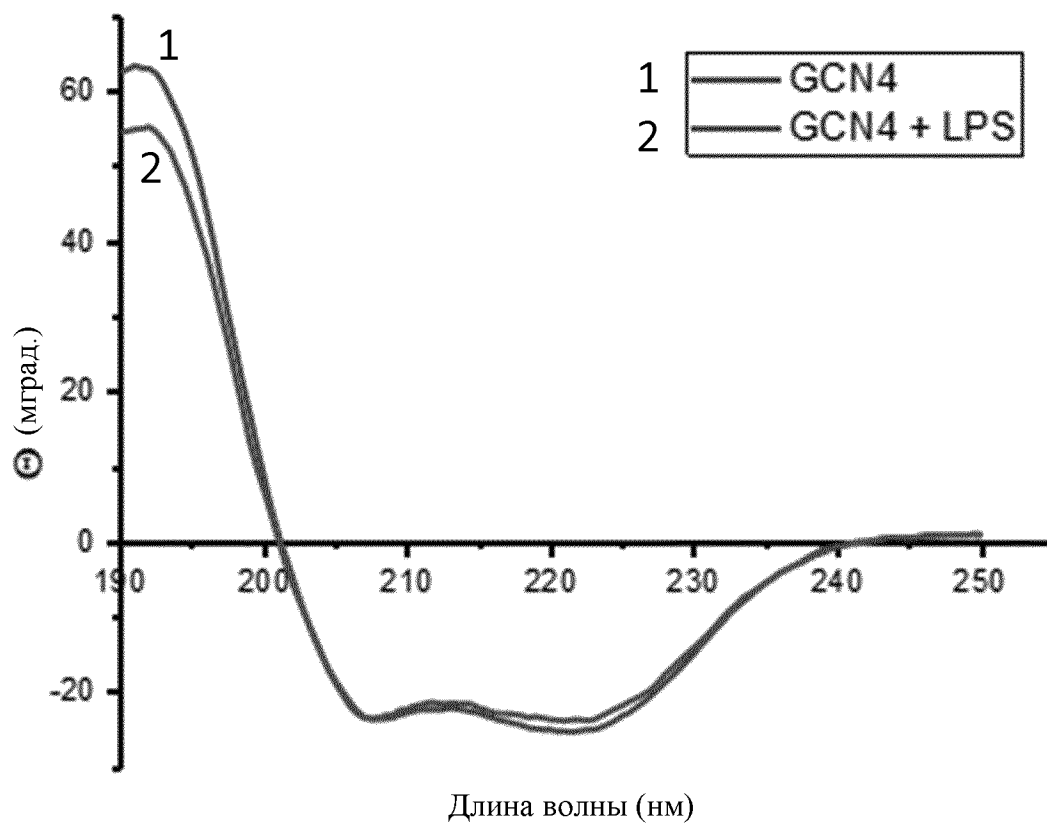


Схема ELITA и контроли

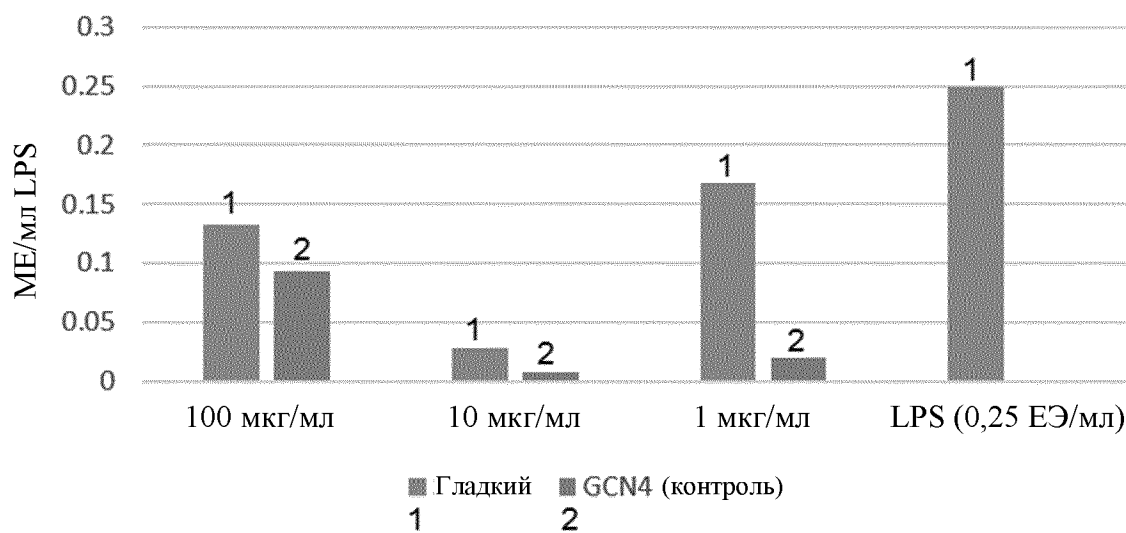


Фиг. 12

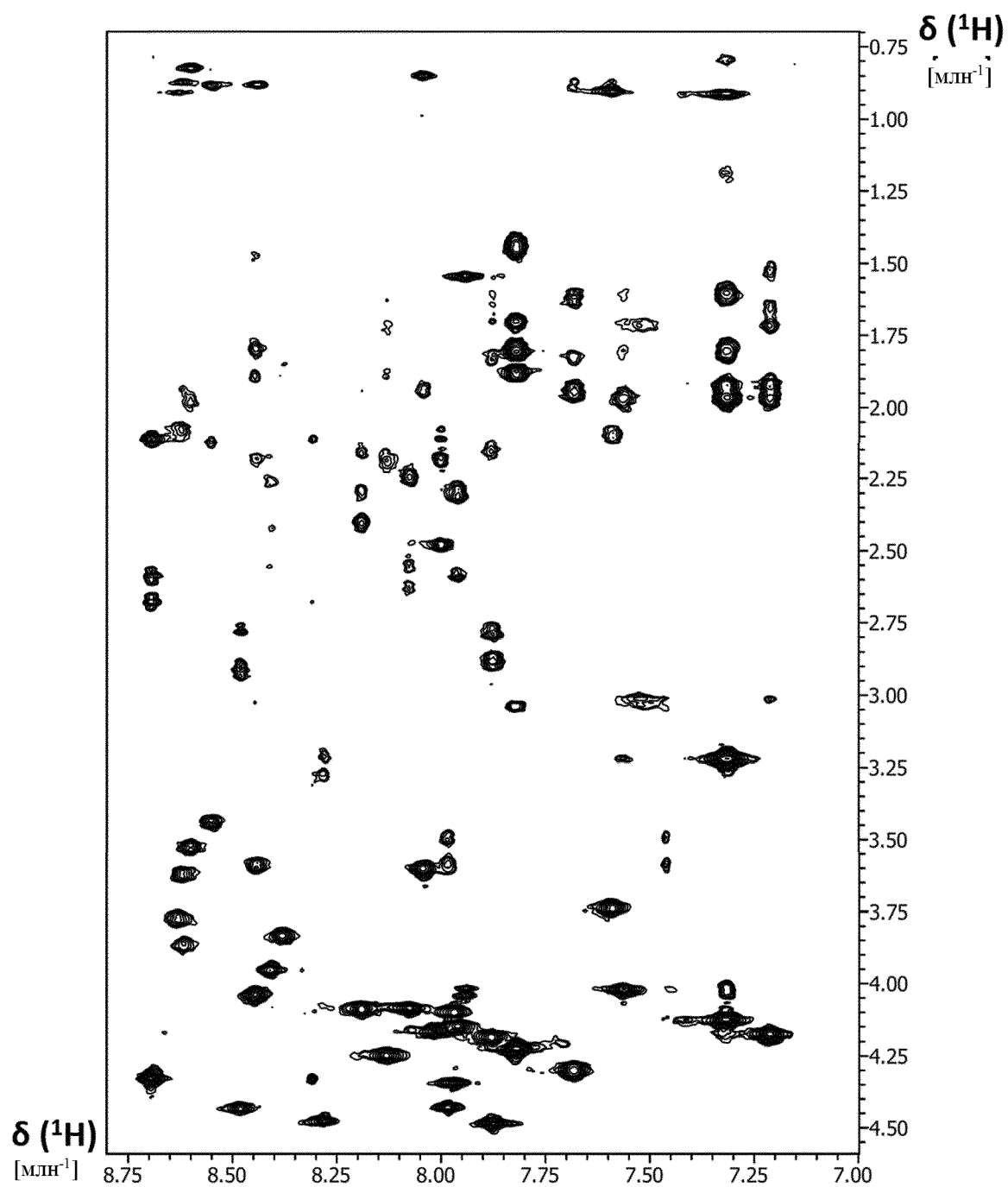


Фиг. 13

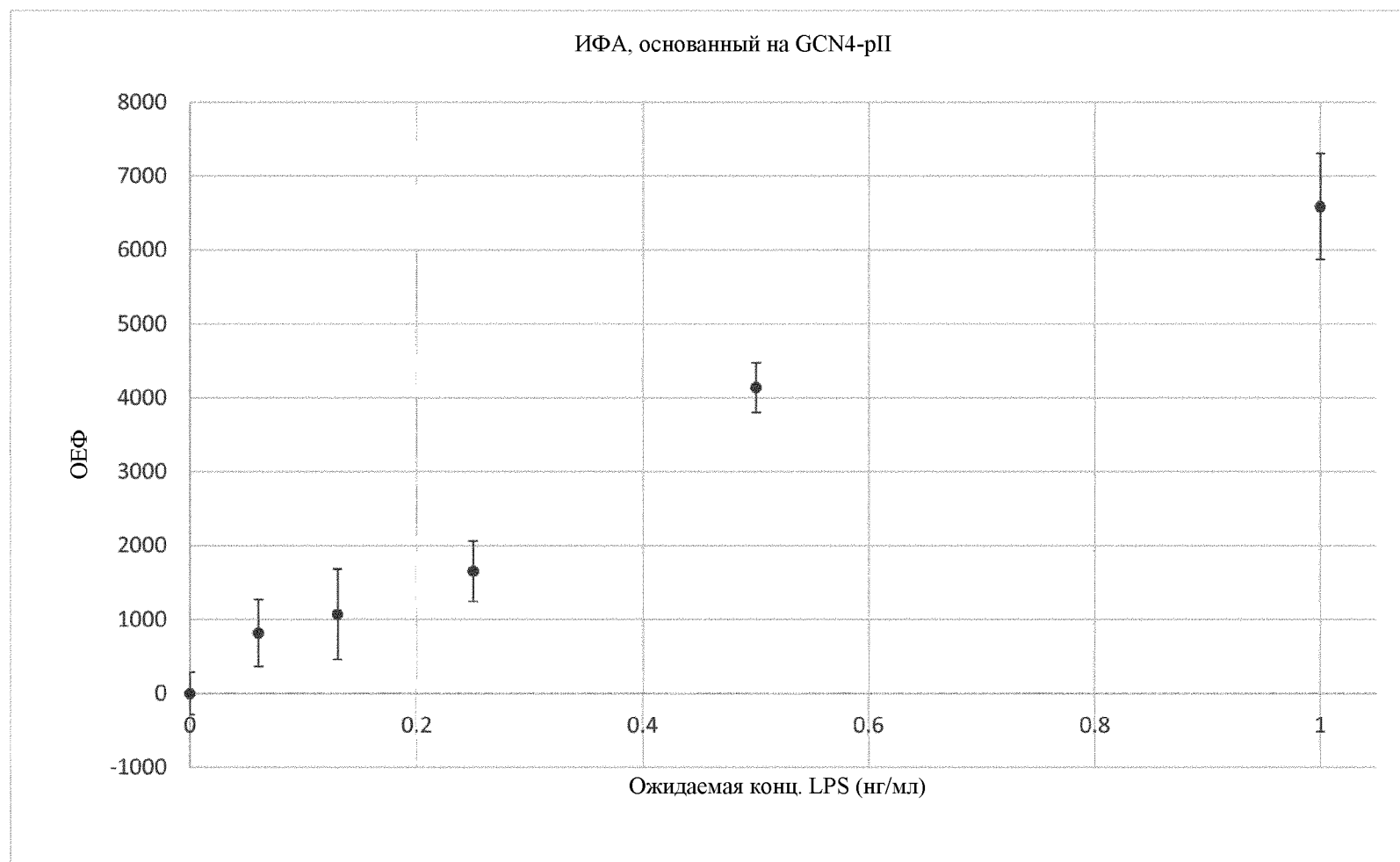
Анализ маскировки LAL (мкг/мл GCN4 с введением 0,25 ЕЭ/мл LPS)



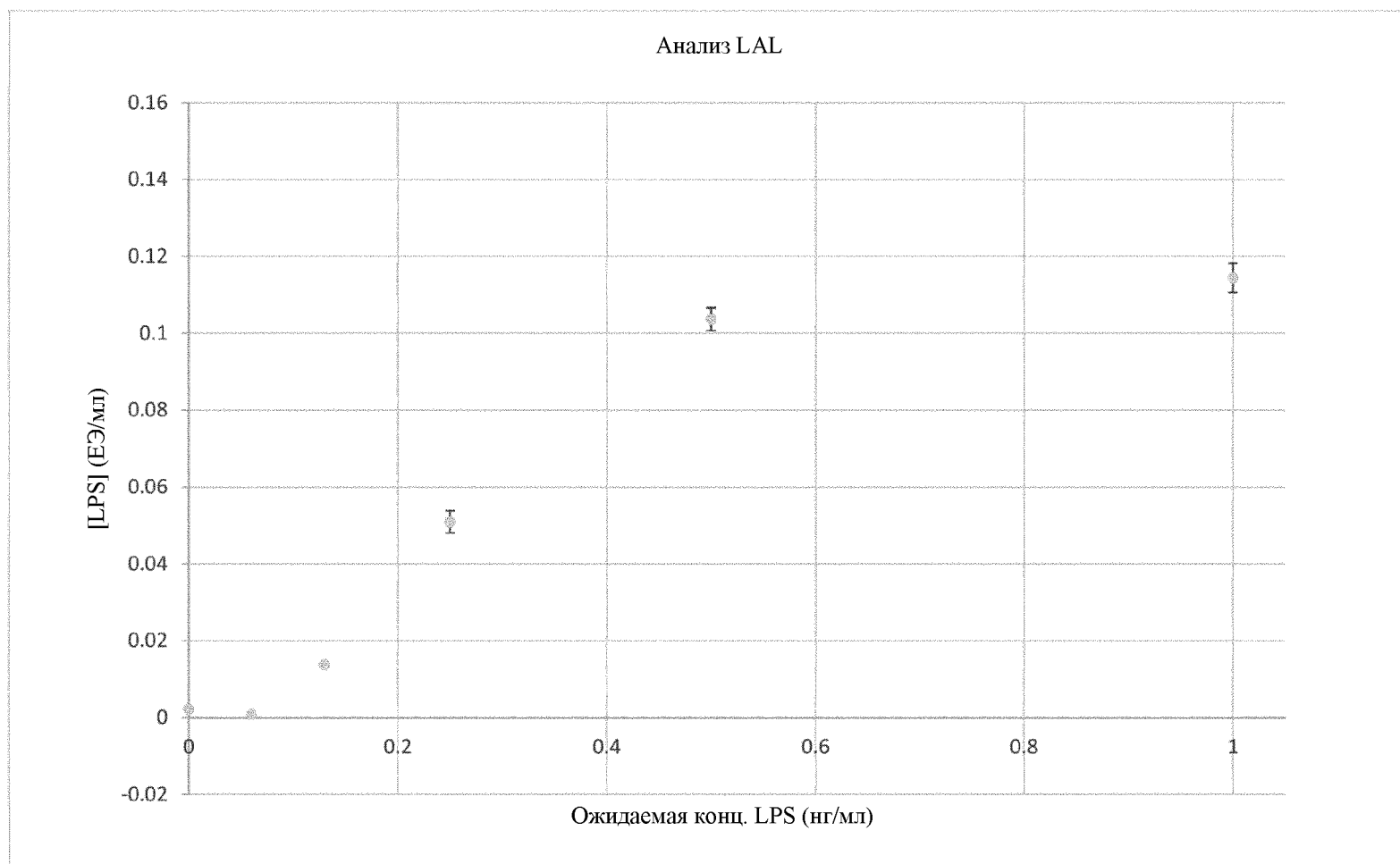
Фиг. 14



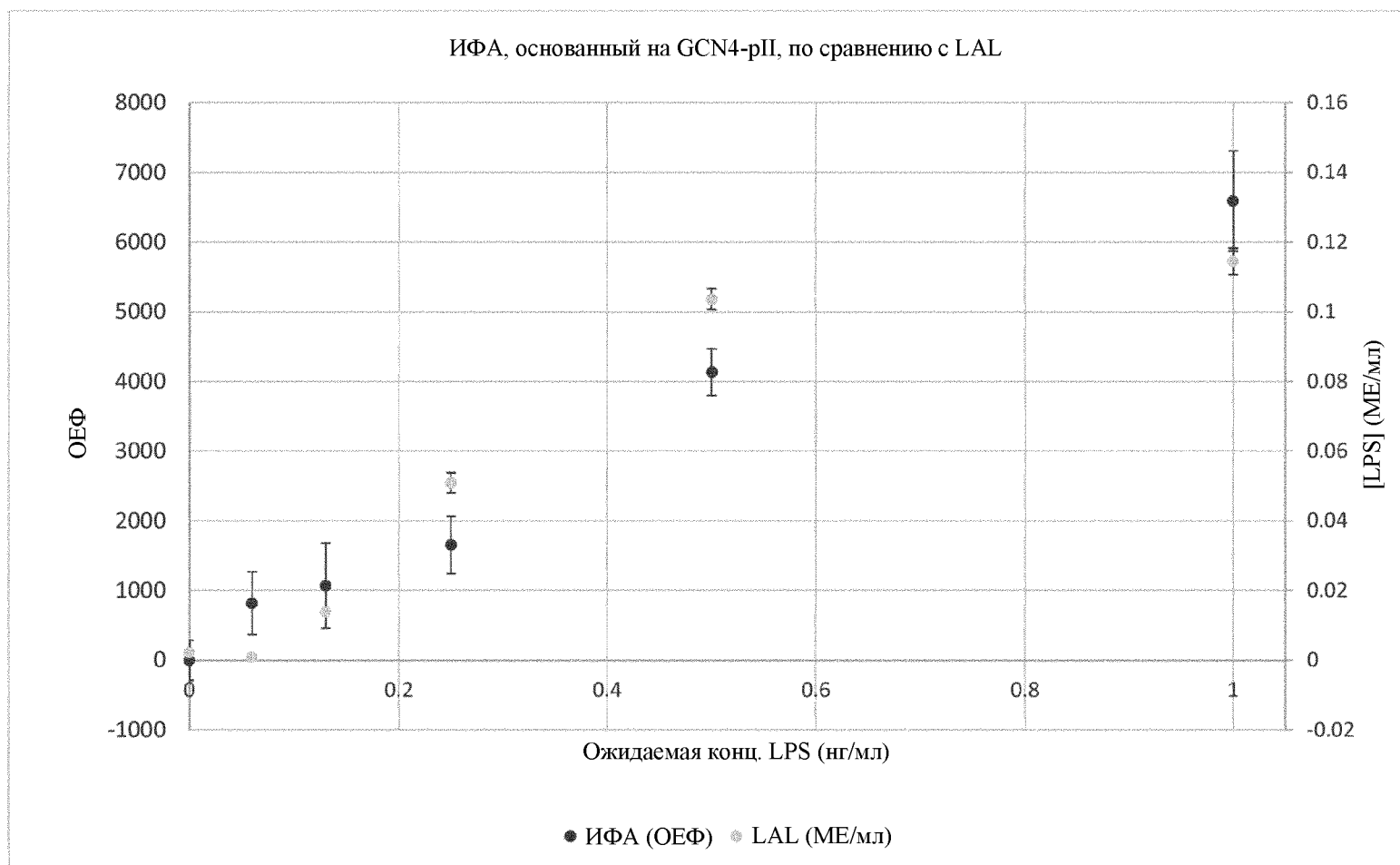
Фиг. 15



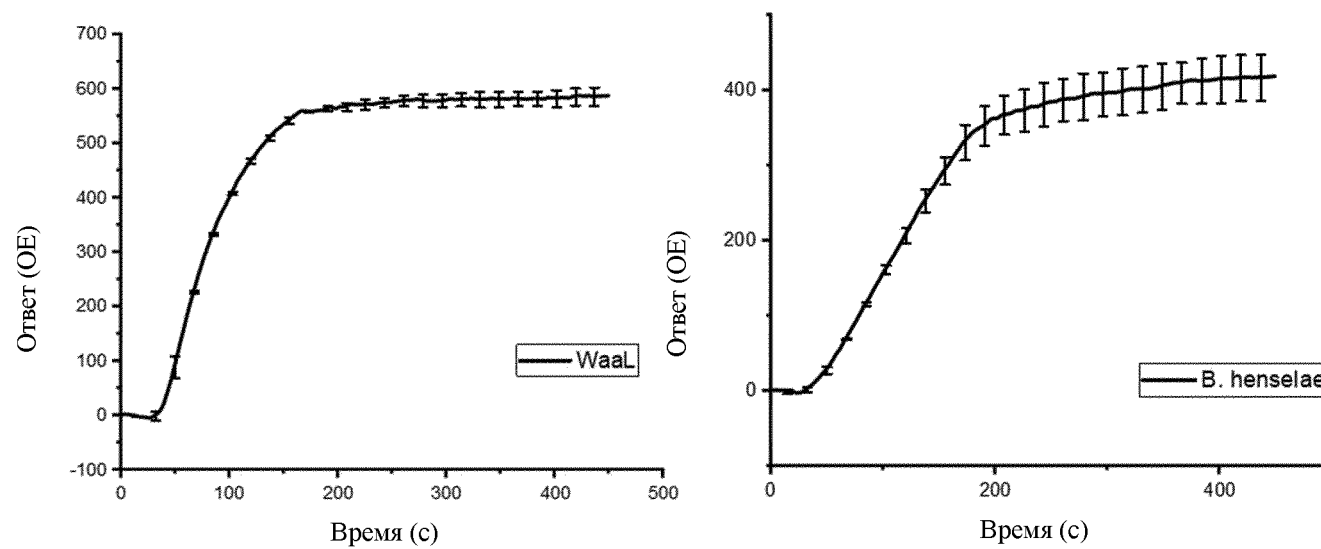
Фиг. 16



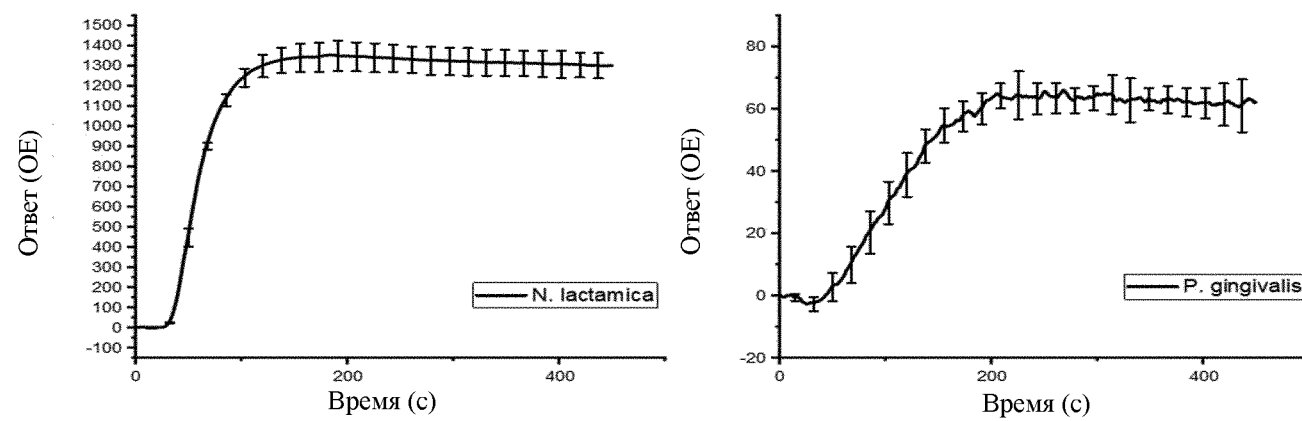
Фиг. 17



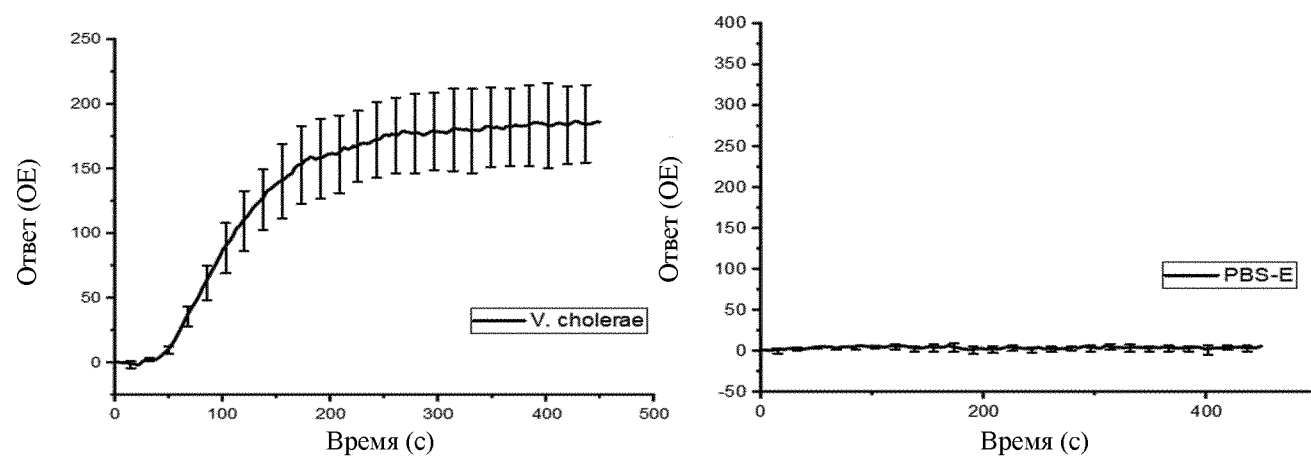
Фиг. 18



Фиг. 18 продолж.



Фиг. 18 продолж.



Фиг. 19

