

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991918** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.05.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.22

(54) **САМОСБОРНЫЕ БЕЛКОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ СО ВСТРОЕННЫМИ БЕЛКАМИ С ШЕСТИСПИРАЛЬНЫМ ПУЧКОМ**

(31) 17162540.3

(72) Изобретатель:

(32) 2017.03.23

Кулангара Кэролайн, Паулильо Сара

(33) EP

Мария (CH), Пьяцца Маттео (GB),

(86) PCT/EP2018/057264

Раман Сентил Кумар (CH), Буркхард

(87) WO 2018/172447 2018.09.27

Питер (DE)

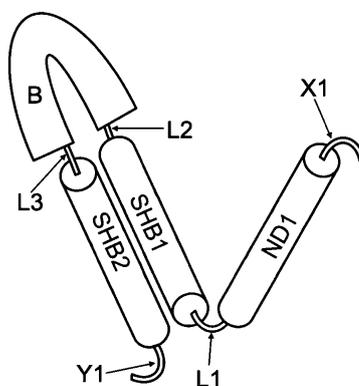
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

АЛЬФА-О ПЕПТИДС АГ (CH)

Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены самосборные белковые наночастицы со встроенными белками с шестиспиральным пучком. Белки или пептиды, содержащие петлевую область, стабилизированы путем их присоединения к белкам с шестиспиральным пучком (six-helix bundle, SHB) и их интеграции в самосборные белковые наночастицы (self-assembling protein nanoparticles, SAPN).



A1

201991918

201991918

A1

САМОСБОРНЫЕ БЕЛКОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ СО ВСТРОЕННЫМИ БЕЛКАМИ С ШЕСТИСПИРАЛЬНЫМ ПУЧКОМ

Область техники

В настоящем изобретении предложены самосборные белковые наночастицы со
5 встроенными белками с шестиспиральным пучком. Белки или пептиды, содержащие петлевую область, стабилизированы путем их присоединения к белкам с шестиспиральным пучком (six-helix bundle, SHB) и их интеграции в самосборные белковые наночастицы (self-assembling protein nanoparticles, SAPN).

Уровень техники

- 10 Белки поверхности оболочечных вирусов являются критически важными на ранней фазе вирусной инфекции. Например, в вирусах иммунодефицита (ВИЧ, вирус иммунодефицита человека, у людей, ВИО, вирус иммунодефицита обезьян, у обезьян) данные белки опосредуют непосредственное слияние оболочки вируса с клеточной мембраной после соединения вируса с поверхностью клетки. Подобные структурные
- 15 изменения возникают в белке гемагглютинине (ГА) вируса гриппа, и было высказано предположение, что крупномасштабные структурные перестройки ГА гриппа или гликопротеина 160 (gp160) ВИЧ являются причиной перехода от метастабильного нативного (предфузогенного) состояния к стабильному, готовому к слиянию (фузогенному) состоянию множества белков оболочечных вирусов. Внеклеточные
- 20 домены данных белков демонстрируют варианты организации доменов с несколькими свойствами, которые являются характерными и которые, вероятно, определяют функцию данных доменов во время активации слияния мембран у ретровирусов. Данные белки обычно состоят из N-концевого участка, за которым следуют два гептадных повтора, разделенные петлевыми структурами, содержащими дисульфид.
- 25 Данные петлевые структуры могут быть очень большими и содержат полностью уложенный (фолдированный) домен, такой как головной домен ГА. Вблизи от N-терминального конца расположен гидрофобный участок (пептид слияния), который, как считают, встраивается в клеточную мембрану на ранней стадии в процессе слияния.

Данные белки содержат две области с гидрофобным повтором из семи аминокислот (гептадным повтором), ключевым признаком суперспиральных структур.

В случае ВИЧ в течение ранних стадий процесса слияния мембран тримерный гликопротеин оболочки содержит gp41 (как часть gp160) в предфузогенной конформации. После связывания с рецептором CD4 и перед связыванием с корецептором CXCR5/CCR4, образуется временная форма gp41, так называемая предшпилечная промежуточная форма, экспонирующая область пептида слияния, и одновременно образуется N-концевой суперспиральный тример. Затем образуется готовая к слиянию шпилечная структура в результате объединения C-концевой области гептадного повтора с тримерной N-концевой суперспиралью, что приводит к сближению вирусной и клеточной мембран (Pancera, M., et al., Nature 2014, 514(7523): 455-461).

Известно, что специфичное к конформации экспонирование В-клеточных эпитопов является решающим для индукции защитных иммунных ответов. Такой иммунный ответ характеризуется образованием конформационно-специфичных антител, которые быстро распознают антиген, представляющий интерес, с высокой специфичностью.

Надлежащая конформация В-клеточного эпитопа зависит от надлежащего фолдинга или рефолдинга белка. Для экспонирования гликопротеинов поверхности в их нативной конформации применяли множество способов. Главным образом, предпринимали попытки стабилизировать тример гликопротеина путем присоединения домена тримерного белка, такого как суперспираль или домен сборки фибритина (Guthe, S., et al. J Mol Biol 2004, 337(4): 905-915), к молекуле, представляющей интерес. Данный подход был продемонстрирован для молекулы ГА гриппа, в которой надлежащий фолдинг и, вследствие этого, специфичное к конформации экспонирование стеблевого домена ГА были осуществлены путем присоединения ГА к домену сборки (Lu, Y., et al. Proc Natl Acad Sci USA 2014, 111(1): 125-130.)

Используя собственную тримерную симметрию наночастиц ферритина, Kanekiyo с соавт. продемонстрировали, что ГА надлежащим образом укладывается при конструировании его в данную систему из наночастиц (Kanekiyo, M., et al. Nature 2013, 499(7456): 102-106.) В сложном экспериментальном подходе SHB ВИЧ применяли для разработки промежуточных форм ГА, чтобы определить наилучшую конструкцию стебля ГА. В данном подходе архитектура промежуточных форм ГА может быть описана как В1 – L1 – SHB1 – L2 – SHB2 – L3 – В2, т.е. В-клеточный эпитоп не образует петлевую

структуру, но вместо этого SHB встроен в В-клеточный эпитоп, который вследствие этого разделен на два отдельных фрагмента – В1 и В2. Также SHB не является частью итоговой конструкции стебля иммуногена ГА, применяемого для вакцинации (Yassine, H. M., et al. Nat Med 2015, 21(9): 1065-1070).

- 5 Затем была продемонстрирована стабилизация F-белка РСВ (респираторно-синцитиального вируса) с помощью SHB (WO 2014/079842 A1). В данном подходе две спирали SHB расположены на отдельных полипептидных цепях.

Надлежащий рефолдинг вирусных тримерных гликопротеинов обычно может осуществляться только в эукариотической системе экспрессии белка. Образование
10 петли в процессе рефолдинга является ключевым для получения правильной конформации метастабильных гликопротеинов оболочечных вирусов, что было продемонстрировано для ГА (Daniels, R., et al. Mol Cell 2003, 11(1): 79-90). В природных условиях образование петли осуществляется на мембране ЭР (эндоплазматического ретикулума) во время экспрессии белка у эукариот, причем ГА удерживается в
15 конформации петли в течение синтеза белка и фолдинга белка (Daniels, R., et al. Mol Cell 2003, 11(1): 79-90).

В настоящий момент было неожиданно обнаружено, что, если олигомерный белок, такой как, например, тримерный белок, образует петлевую структуру, т.е. N-конец и C-конец белка находятся в непосредственной близости, тогда для улучшения стабилизации
20 образующего петлю белка можно использовать SHB вместо использования простого олигомерного домена. Таким образом, вместо использования простого тримерного суперспирального домена или домена сборки фибритина только на одном конце, образующий петлю белок может быть стабилизирован путем присоединения обоих его концов (т.е. N-конца и C-конца) к концам двух спиралей SHB. В качестве примера, ГА
25 гриппа можно присоединить с помощью его N- и C-конца к SHB gp41 ВИЧ, таким образом, удерживая ГА в метастабильной конформации, предшествующей слиянию. Затем такой SHB со встроенным тримерным В-клеточным эпитопом можно встроить в архитектуру SAPN, таким образом, получая новый тип остова SAPN.

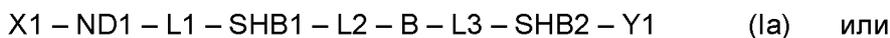
Данный новый тип остова наночастицы идеально подходит в качестве каркаса для
30 презентирования белков, свернутых в петлевую структуру (т.е. N- и C-конец белка находятся в непосредственной близости друг к другу) на поверхности наночастицы. Такой каркас наночастицы позволяет стабилизировать белок, структурированный в

форме петли, в его нативной конформации. Особенный интерес представляют структурированные в форме петли белки, которые образуют тримеры. Большой интерес представляет то, что множество белков поверхности оболочечных вирусов имеют именно такую тримерную петлевую структуру. Примерами являются ГА гриппа, gB-белок ЦМВ (цитомегаловируса), F-белок РСВ, gp160 ВИЧ и многие другие. Данные тримерные белки поверхности оболочечных вирусов находятся в метастабильном предфузогенном состоянии, которое можно стабилизировать путем встраивания данных белков в мотив спираль-петля-спираль SHB внутри наночастиц согласно настоящему изобретению. В качестве альтернативы, субструктуры тримерных белков могут удерживаться вместе в тримерной конформации при применении SHB-SAPN в качестве каркаса. Также простые петлевые структуры могут быть экспонированы в виде петель на SHB-SAPN без необходимости и обязательного условия образовывать конкретную тримерную конформацию, но просто будучи удерживаемыми в петлевой структуре.

SHB-SAPN согласно настоящему изобретению обеспечивают весьма изящный способ экспонирования образующих петлю пептидов и белков в их нативной конформации. В-клеточные эпитопы в качестве образующих петлю пептидов и белков могут быть очень простыми, такими как пептиды β -изгиба, но они могут также представлять собой очень сложные структуры, такие как тримерные гликопротеины поверхности оболочечных вирусов.

20 Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложена самосборная белковая наночастица (SAPN), состоящая из множества структурных элементов формулы (Ia) или (Ib)



25 состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND1, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X1 и Y1, где

ND1 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры $(ND1)_m$ из m субъединиц ND1,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

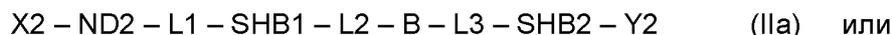
m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга
5 представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

Y1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка,
10 содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, причем множество структурных элементов формулы (Ia) или формулы (Ib) необязательно совместно собраны с множеством структурных элементов формулы (IIa) или формулы (IIb)



15 $Y2 - SHB2 - L3 - B1 - L2 - SHB1 - L1 - ND2 - X2 \quad (IIb),$

состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND2, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X2 и Y2, где

ND2 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры $(ND2)_m$ из m
20 субъединиц ND2,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 и 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга
25 представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

Y2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, и причем по меньшей мере один из X2 и Y2 формулы (IIa) и/или формулы (IIb) отличается от X1 и Y1 формулы (Ia) и/или формулы (Ib).

5 Краткое описание фигур

Фигура 1: Схематическая диаграмма мономера, образующего наночастицу SHB.

Ниже представлены структурные элементы мономера:

- SHB1 представляет собой один из двух пептидов или белков, образующих SHB
- В представляет собой белок, содержащий петлевую область, предпочтительно, мономер тримера
- SHB2 представляет собой второй из двух пептидов или белков, образующих белок SHB
- ND1 представляет собой белок, который образует олигомеры $(ND1)_m$ из m субъединиц ND1
- L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, соединяющие ND1, SHB1, В и SHB2
- X1 и Y1 представляют собой последовательности пептида или белка на любом конце мономера

Фигура 2: Молекулярная модель HC_AD1g.

Молекулярная модель мономерной (A), тримерной (B) и икосаэдрической частицы (C), образованной белковой нитью с архитектурой X1 – ND1 – L1 – SHB1 – L2 – В – L3 – SHB2, в которой Y1 отсутствует. SHB1 и SHB2, образующие шестиспиральный пучок, отмечены текстом. Образующий петлю белок является частью gB-белка ЦМВ, который образует тримерную экспонированную на поверхности вершину gB, тогда как SHB является частью белка gp41 из ВИЧ.

25 Фигура 3: Снимок HC_AD1g, полученный с помощью трансмиссионного электронного микроскопа.

После рефолдинга и совместной сборки экспрессированного рекомбинантным способом белка образец адсорбировали на покрытых углеродом решетках и негативно окрашивали 2% уранилацетатом. Наночастицы имеют последовательность SEQ ID NO:1, описанную в примере 1. Масштабная шкала представляет собой 200 нм.

Фигура 4: Карта вектора pPEP-T.

«prom»: промотор; «term»: терминатор; «ori»: точка начала репликации; «п.о.»: пары оснований; «amp»: ген устойчивости к ампициллину.

5 *Фигура 5: Анализ конструкции HC_AD1g методом ДСН-ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия).*

Теоретическая молекулярная масса данной конструкции составляет 36,0 кДа.

А) Уровни экспрессии в различных линиях клеток

НИ – Неиндуцированные

И – Индуцированные

10 В) Чистота после Ni-аффинной очистки.

Фигура 6: Компьютерная модель F34-HAPR-HIVlong.

Молекулярная модель мономерной (А), тримерной (В) и икосаэдрической частицы (С), образованной белковой нитью с архитектурой Y1 – SHB2 – L3 – В – L2 – SHB1 – L1 – ND1 – X1. SHB1 и SHB2, образующие шестиспиральный пучок, отмечены текстом.

15 Образующий петлю белок представляет собой ГА из гриппа, который образует тримерный экспонированный на поверхности гликопротеин, в то время как SHB является частью белка gp41 из ВИЧ. На фигуре С представлен вид вдоль оси симметрии пятого порядка икосаэдра.

Фигура 7: Анализ конструкции F34-HAPR-HIVlong методом ДСН-ПААГ.

20 Теоретическая молекулярная масса данной конструкции составляет 77,9 кДа

А) Уровни экспрессии до и после индукции

ни – неиндуцированные

и – индуцированные

В) Чистота после Ni-аффинной очистки.

25 *Фигура 8: Снимок F34-HAPR-HIVlong, полученный с помощью трансмиссионного электронного микроскопа.*

После рефолдинга и совместной сборки экспрессированного рекомбинантным способом белка образец адсорбировали на покрытых углеродом решетках и негативно

окрашивали 2% уранилацетатом. Наночастицы имеют последовательность SEQ ID NO:15, описанную в примере 5. Масштабная шкала представляет собой 100 нм.

Фигура 9: Анализ конформации молекул ГА на частицах F34-HAPR-HIVlong методом ELISA.

- 5 А) Распознавание *F34-HAPR-HIVlong* и инактивированного вируса PR8/34 MAT (моноклональным антителом) IC5-4F8
- В) Распознавание *F34-HAPR-HIVlong* и инактивированного вируса PR8/34 поликлональной гипериммунной сывороткой
- С) Утрата распознавания PR8/34 в результате предварительной инкубации IC5-4F8 с 80 нг *F34-HAPR-HIVlong*
- 10 Д) Утрата распознавания PR8/34 в результате предварительной инкубации поликлональной гипериммунной сыворотки с 80 нг *F34-HAPR-HIVlong*
- Ось Y: относительные значения ОП (оптической плотности) из различных измерений методом ELISA.

- 15 *Фигура 10: Анализ конформации молекул ГА на тримерах F3-HAPR методом ELISA.*

Распознавание ГА поликлональной гипериммунной сывороткой на *F3-HAPR* и на инактивированном вирусе PR8/34 при различных концентрациях белка: 5 мкг/мл (черный столбец), 1,7 мкг/мл (столбец в крапинку), 0,56 мкг/мл (заштрихованный столбец) и 0,19 мкг/мл (белый столбец), соответственно. *F3-HAPR* хранили при различных температурных условиях. К.т.: комнатная температура.

20

Фигура 11: Уровень выживаемости иммунизированных мышей после стимуляции антигеном - летальной дозой 100 БОЕ (бляшкообразующих единиц, 10 LD90) A/PR/8/34 (H1N1).

- △ *F34-HAPR-HIVlong*
- 25 X Инактивированный вирус PR8/34
- Буфер ФБР (фосфатно-буферный солевой раствор)

Фигура 12: Анализ иммунного ответа после стимуляции антигеном PR8/34.

- А) Масса тела после иммунизации *F34-HAPR-HIVlong*.
- △ Мышь 1

■ Мышь 2

● Мышь 3

X Мышь 4

◇ Мышь 5

5 B) Титр антител против инактивированного вируса PR8/34 после иммунизации F34-HAPR-HIVlong.

△ Мышь 1

■ Мышь 2

● Мышь 3

10 X Мышь 4

◇ Мышь 5

Фигура 13: Анализ иммунного ответа после стимуляции антигеном PR8/34.

A) Масса тела после иммунизации инактивированным вирусом PR8/34.

△ Мышь 6

15 ■ Мышь 7

● Мышь 8

X Мышь 9

◇ Мышь 10

20 B) Титр антител против инактивированного вируса PR8/34 после иммунизации инактивированным вирусом PR8/34.

△ Мышь 6

■ Мышь 7

● Мышь 8

X Мышь 9

25 ◇ Мышь 10

Фигура 14: Молекулярная модель 4TVP-1ENV.

Молекулярная модель мономерной (A), тримерной (B) и икосаэдрической частицы (C), образованной белковой нитью с архитектурой X1 – ND1 – L1 – SHB1 – L2 – B – L3 – SHB2, в которой L2 и L3 представляют собой пептидные связи, и Y1 отсутствует. SHB1 и SHB2, образующие шестиспиральный пучок, отмечены текстом. Образующий петлю белок представляет собой петлю V1/V2 белка gp120 ВИЧ, который образует тримерную экспонированную на поверхности вершину gp120, тогда как SHB является частью белка gp41 из ВИЧ.

Подробное описание изобретения

- 10 В настоящем изобретении описаны SHB (шестиспиральные пучки), которые являются встроенными, т.е. включенными в архитектуру известных SAPN (самосборных белковых наночастиц), таких как SAPN, описанных, например, в публикациях Raman S.K. et al. Nanomed 2006, 2(2): 95-102; Pimentel T. A., et al. Chem Biol Drug Des. 2009. 73(1): 53-61; Indelicato, G., et al. Biophys J. 2016, 110(3): 646-660; Karch, C. P., et al. Nanomedicine 2016, 13(1): 241-251). В настоящем документе с целью стабилизации образующих петлю пептидов или белков, применяют предпочтительно, белки в состоянии олигомеризации, которое соответствует трем. SAPN, которые можно использовать в качестве основы для конструирования SAPN согласно настоящему изобретению, также описаны в публикациях WO2004071493, WO2009109428 и WO2015104352.
- 15
- 20 Настоящее изобретение относится к самосборной белковой наночастице (SAPN), состоящей из множества структурных элементов формулы (Ia) или (Ib)



- состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND1, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X1 и Y1, где
- 25

ND1 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры (ND1)_m из m субъединиц ND1,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

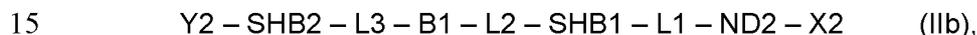
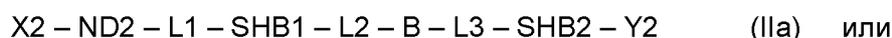
L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга
5 представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

Y1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка,
10 содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

причем множество структурных элементов формулы (Ia) или формулы (Ib) необязательно совместно собраны с множеством структурных элементов формулы (IIa) или формулы (IIb)



состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND2, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X2 и Y2, где

ND2 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры $(ND2)_m$ из m
20 субъединиц ND2,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга
25 представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

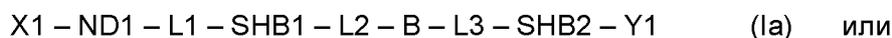
B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

Y2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, и причем по меньшей мере один из X2 и Y2 формулы (IIa) и/или формулы (IIb) отличается от X1 и Y1 формулы (Ia) и/или формулы (Ib).

5

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящее изобретение относится к самосборной белковой наночастице (SAPN), состоящей из множества структурных элементов формулы (Ia) или (Ib)



состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND1, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X и Y, где

15 ND1 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры (ND1)_m из m субъединиц ND1,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

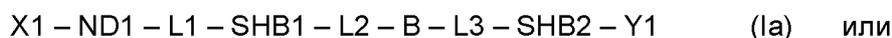
20 L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

25 Y1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены.

Согласно следующему предпочтительному варианту реализации настоящее изобретение относится к самосборной белковой наночастице (SAPN), состоящей из множества структурных элементов формулы (Ia) или (Ib)





состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND1, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X1 и Y1, где

- 5 ND1 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры $(ND1)_m$ из m субъединиц ND1,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

- 10 L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

- 15 Y1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, причем множество структурных элементов формулы (Ia) или формулы (Ib) совместно собраны с множеством структурных элементов формулы (IIa) или формулы (IIb)



- 20 $Y2 - SHB2 - L3 - B1 - L2 - SHB1 - L1 - ND2 - X2 \quad (IIb),$

состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND2, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X2 и Y2, где

- 25 ND2 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры $(ND2)_m$ из m субъединиц ND2,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

В представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка,
5 содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

Y2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка,
содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,
и причем по меньшей мере один из X2 и Y2 формулы (IIa) и/или формулы (IIb)
отличается от X1 и Y1 формулы (Ia) и/или формулы (Ib).

10 В случае когда множество структурных элементов формулы (Ia) или формулы (Ib) совместно собирается с множеством структурных элементов формулы (IIa) или формулы (IIb), обычно структурный элемент формулы (Ia) совместно собирается со структурным элементом формулы (IIa), и структурный элемент формулы (Ib) совместно собирается со структурным элементом формулы (IIb).

15 Согласно предпочтительному варианту реализации домен олигомеризации ND1, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен В, содержащий петлевую область, линкер L3 и домен SHB2 формулы (Ia) или формулы (Ib) идентичны домену олигомеризации ND2, линкеру L1, домену SHB1, линкеру L2, домену В, содержащему петлевую область, линкеру L3 и домену SHB2 формулы (IIa) или формулы (IIb).

20 В настоящем изобретении конструирование N- и C-конца белков, таких как гликопротеины, на двух спиральях SHB, которые являются частью архитектуры SAPN, удерживает В-клеточный эпитоп в конформации петли в течение рефолдинга. Данный подход является важным и позволяет белку подвергаться правильному рефолдингу из денатурирующих условий, причем, что неожиданно, даже после продукции в

25 прокариотической системе экспрессии. Следовательно, эукариотическая экспрессия не является обязательно необходимой для надлежащего рефолдинга белка. Для рефолдинга важно, чтобы образовалась петля, которая удерживает N-конец и C-конец белка в непосредственной близости, что обеспечивается SHB-SAPN согласно настоящему изобретению. Надлежащий рефолдинг экспрессированного в бактериях ГА

30 из денатурирующих условий с применением настоящего изобретения был продемонстрирован с помощью распознавания и связывания специфичных к

конформации МАТ и гипериммунной сыворотки с иммуногеном ГА на основе SHB-SAPN (фигуры 9 и 10).

Мономерные структурные элементы

Пептид (или полипептид, или белок) представляет собой цепь или последовательность
5 аминокислот, ковалентно связанных амидными связями. Пептид может быть природным, модифицированным природным, частично синтетическим или полностью синтетическим. Термины «модифицированный природный», «частично синтетический» или «полностью синтетический» понимают как обозначающие «не встречающийся в природе». Термин «аминокислота» охватывает встречающиеся в природе
10 аминокислоты, выбранные из 20 незаменимых природных α -L-аминокислот, синтетические аминокислоты, такие как α -D-аминокислоты, β -аминогексановая кислота, норлейцин, гомоцистеин или т.п., а также встречающиеся в природе аминокислоты, которые были модифицированы некоторым способом, чтобы изменить определенные свойства, такие как заряд, например, фосфосерин или фосфотирозин, или содержащие
15 другие модификации, такие как n-октаноил-серин, или т.п. Производные аминокислот представляют собой аминокислоты, в которых, например, аминогруппа, образующая амидную связь, является алкилированной, или амино-, гидроксильная или тиогруппа боковой цепи является алкилированной или ацилированной, или карбоксильная группа боковой цепи является амидированной или эстерифицированной. Предпочтительно,
20 пептид или белок согласно настоящему изобретению содержит аминокислоты, выбранные из 20 незаменимых природных α -L-аминокислот.

В грубом приближении пептиды можно отличить от белков на основании их размера, т.е. цепь из приблизительно 50 аминокислот или менее можно считать пептидом, тогда как более длинные цепи можно считать белками. Таким образом, термин «пептид» в
25 настоящем документе обозначает цепь аминокислот из 50 аминокислот или менее, предпочтительно, цепь аминокислот из от 2 до 50 аминокислот, а термин «белок» в настоящем документе обозначает цепь аминокислот из более 50 аминокислот, предпочтительно, цепь аминокислот из от 51 до 10000 аминокислот. Дипептиды представляют собой наиболее короткие пептиды и состоят из 2 аминокислот,
30 соединенных одной пептидной связью. Аналогично, трипептиды состоят из трех аминокислот, тетрапептиды состоят из четырех аминокислот и т.д. Полипептид представляет собой длинную, непрерывную и неразветвленную пептидную цепь. В

литературе границы размера, которые отделяют пептиды от белков, являются в некоторой степени размытыми. Иногда длинные «пептиды», такие как амилоид бета, считают белками, и наоборот: более маленькие белки, такие как инсулин, обозначают как пептиды.

- 5 Домены олигомеризации согласно настоящему изобретению, предпочтительно, представляют собой суперспирали. Суперспираль представляет собой последовательность белка с непрерывным паттерном, главным образом, гидрофобных остатков, расположенных на расстоянии 3 и 4 остатка друг от друга, которые собираются с образованием мультимерного пучка спиралей, что будет более подробно объяснено в
10 настоящем документе ниже.

- Все компоненты (X1, X2, ND1, ND2, L1, SHB1, L2, B, L3, SHB2, Y1 и Y2) мономерного структурного элемента или элементов могут быть необязательно дополнительно замещены нацеливающими заместителями или заместителями, усиливающими адъювантные свойства наночастицы. «Замещенный» обозначает замену одной
15 химической группы на мономерном структурном элементе другой химической группой с получением заместителя, который ковалентно присоединен к мономерному структурному элементу. Такие заместители могут представлять собой иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, предпочтительно, олигодезоксинуклеотид, содержащий дезоксиинозин, олигодезоксинуклеотид,
20 содержащий дезоксиуридин, олигодезоксинуклеотид, содержащий CG-мотив, CpG, имиквимод, резиквимод, гардиквимод, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую инозин и цитидин, или т.п. Конкретная нацеливающая молекула, рассматриваемая в качестве заместителя, представляет собой сигнал, нацеливающий на ЭР, т.е. сигнальный пептид, который вызывает транспортирование белка или пептида в
25 эндоплазматический ретикулум (ЭР).

Согласно предпочтительному варианту реализации структурные элементы формулы (Ia) или (Ib) содержат заместитель X1 или заместитель Y1, и/или структурные элементы формулы (IIa) или (IIb) содержат заместитель X2 или заместитель Y2.

- Согласно другому предпочтительному варианту реализации структурные элементы
30 формулы (Ia) или (Ib) содержат заместители X1 и Y1, и/или структурные элементы формулы (IIa) или (IIb) содержат заместитель X2 и Y2. Таким образом, согласно наиболее предпочтительному варианту реализации заместитель представляет собой

пептидный или белковый заместитель и обозначается X1, X2, Y1 или Y2, представляя собой удлинение цепи белка, например, как X1 – ND1 – L1 – SHB1 – L2 – B – L3 – SHB2 – Y1 или X2 – ND2 – L1 – SHB1 – L2 – B – L3 – SHB2 – Y2, обычно на одном конце, предпочтительно, на обоих концах для получения объединенной единой непрерывной последовательности белка. Для удобства такую единую непрерывную цепь белка можно экспрессировать в рекомбинантной системе экспрессии белка в виде одной отдельной молекулы. Заместители X1, Y1, X2 и Y2 независимо друг от друга представляют собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, предпочтительно, последовательности, соответствующие полностью свернутым белкам или доменам белка, подлежащим применению в качестве В-клеточных эпитопов, либо флагеллину или подгруппе его четырех доменов, как описано в публикации WO2015104352, для усиления иммунного ответа.

Флагеллин характеризуется молекулярной архитектурой, которая состоит из четырех доменов D0, D1, D2 и D3. Цепь белка начинается на N-конце в домене D0 и проходит в виде большой петли через другие домены D1, D2 и D3 к вершине молекулы, где она разворачивается и проходит обратно через D3, D2 и D1, чтобы привести свой C-терминальный конец в домене D0 в непосредственную близость с N-терминальным концом. Флагеллин обладает двумя способами активации врожденной иммунной системы. Первый способ заключается в связывании рецептора TLR5, главным образом, с помощью высококонсервативной части домена флагеллина D1 (Yoon S.I. et al., Science 2012, 335:859-64). Другой способ активации реализуется в результате взаимодействия с инфламмасомой, главным образом, с помощью высококонсервативной C-концевой части домена флагеллина D0 (Lightfield K.L. et al., Nat Immunol. 2008, 9:1171-8).

Таким образом, согласно предпочтительному варианту реализации по меньшей мере один из заместителей X1, Y1, X2 и Y2 представляет собой полноразмерный флагеллин, например, полноразмерный флагеллин *Salmonella typhimurium* или флагеллин, содержащий только два или три домена, предпочтительно, флагеллин, содержащий по меньшей мере TLR5-связывающий домен D1, более предпочтительно, флагеллин, содержащий домены D0 и D1, в частности, флагеллин, содержащий последовательность MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDA AGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNLQRVRELAVQSANSTNSQS DLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLD SLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEA

RSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO:37) или последовательность

MAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDAAGQAIANRFT

ANIRGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQ

5 RLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLQINSQTLGLDQLNVQQKYK
DGDKGDDKTENPLQRIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSD
YATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO:38).

Отсутствующий домен или домены могут быть заменены сегментом гибкого линкера, состоящим из от 1 до 20 аминокислот, соединяющего два конца оставшейся
10 последовательности флагеллина, или они могут быть заменены полностью свернутым белковым антигеном. Согласно предпочтительному варианту реализации отсутствующий домен или домены заменены гибким линкером, содержащим аминокислотную последовательность QLNQVQQKYKDGDKGDDKTENPLQ (SEQ ID NO:39). Область гибкого линкера может содержать подходящие участки присоединения
15 для ковалентного сочетания антигенов. Таким образом, можно легко получить конструкцию производного флагеллина, в которой отсутствуют домены D2 и D3 флагеллина, просто путем присоединения цепи белка на поверхности взаимодействия доменов D1 и D2. Аналогично, домены вершины (D3 или D2 и D3 вместе) можно заменить белковым антигеном, при условии, что данный белковый антиген с его N- и C-
20 концом может быть присоединен к N- и C-концу на поверхности взаимодействия между D1 и D2. Домены вершины D2 и D3 можно также заменить последовательностью пептида с подходящими остатками для ковалентного сочетания молекул антигена.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации X1, Y1, X2 и Y2 независимо друг от друга могут также содержать нить из одного или нескольких эпитопов CD4 и/или
25 CD8. Согласно другому предпочтительному варианту реализации X1, Y1, X2 и Y2 независимо друг от друга могут содержать комбинацию из одного или нескольких из данных типов значимых с иммунологической точки зрения последовательностей пептида и белка CD4/CD8.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации множество структурных
30 элементов формулы (Ia) или формулы (Ib) совместно собраны с множеством структурных элементов формулы (IIa) или формулы (IIb), причем по меньшей мере один из X2 и Y2 формулы (IIa) и/или формулы (IIb), предпочтительно, один из X2 и Y2

формулы (IIa) и/или формулы (IIb) представляет собой полноразмерный флагеллин или флагеллин, содержащий только два или три домена, предпочтительно, флагеллин, содержащий домены D0 и D1, в частности, флагеллин, как представлено в SEQ ID NO:37 и/или SEQ ID NO:38.

- 5 Если Y1 и Y2 присоединены к SHB-домену, данный участок присоединения SHB обращен в сторону сердцевины SAPN (см. фигуры 1 и 2), и флагеллин, предпочтительно, присоединен к домену ND1 и/или ND2. Таким образом, согласно предпочтительному варианту реализации X1 и/или X2 представляет собой полноразмерный флагеллин, например, полноразмерный флагеллин *Salmonella*
- 10 *typhimurium* или флагеллин, содержащий только два или три домена, предпочтительно, флагеллин, содержащий по меньшей мере TLR5-связывающий домен D1, более предпочтительно, флагеллин, содержащий домены D0 и D1, в частности, флагеллин, содержащий последовательность
MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDD
- 15 AAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQS
DLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLD
SLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEA
RSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO:37) или
последовательность
- 20 MAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDAAGQAIANRFT
ANIRGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQ
RLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLQINSQTLGLDQLNVQQKYK
DGDKGDDKTENPLQRIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSD
YATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO:38).
- 25 Тенденция образовывать олигомеры означает, что данные белки могут образовывать олигомеры в зависимости от условий, например, в денатурирующих условиях данные белки представляют собой мономеры, тогда как в физиологических условиях они могут образовывать, например, димеры, тримеры, тетрамеры или пентамеры. В заранее определенных условиях данные белки принимают одно отдельное состояние
- 30 олигомеризации, необходимое для образования наночастицы. Однако состояние олигомеризации данных белков может измениться после изменения условий, например, от тримеров к димерам после снижения концентрации соли (Burkhard P. et al., Protein Science 2000, 9:2294-2301) или от пентамеров к мономерам после снижения pH.

Архитектура структурного элемента согласно формуле (Ia) или (Ib) и/или формуле (IIa) или (IIb) четко отличается от белков капсида вируса. Капсиды вирусов состоят или из одного отдельного белка, который образует олигомеры из 60 или кратного числа мономеров, как, например, частицы вируса гепатита В (EP 1 262 555, EP 0 201 416), или
 5 из более одного белка, которые совместно собираются для образования структуры капсида вируса и которые могут также принимать другую геометрию, помимо икосаэдра, в зависимости от типа вируса (Fender P. et al., Nature Biotechnology 1997, 15:52-56). SAPN согласно настоящему изобретению также четко отличаются от вирусоподобных частиц, поскольку SAPN (a) сконструированы из белков, отличных от белков капсида вируса, и
 10 (b) полость в середине наночастицы является слишком маленькой для размещения ДНК/РНК целого генома вируса.

Домены олигомеризации белков хорошо известны (Burkhard P. et al., Trends Cell Biol 2001, 11:82-88). В настоящем изобретении домен олигомеризации ND1 или ND2, предпочтительно, представляет собой суперспиральный домен. Суперспираль
 15 представляет собой последовательность белка с непрерывным паттерном, главным образом, гидрофобных остатков, расположенных на расстоянии 3 и 4 остатка друг от друга, обычно в последовательности из семи аминокислот (гептадный повтор) или одиннадцати аминокислот (ундекадный повтор), которая собирается (сворачивается) с образованием мультимерного пучка спиралей. Также предусмотрены суперспирали с
 20 последовательностями, содержащими некоторое нерегулярное распределение промежутков из 3 и 4 остатков. Гидрофобные остатки представляют собой, в частности, гидрофобные аминокислоты Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Phe и Trp. «Гидрофобный», главным образом, обозначает, что по меньшей мере 50% остатков должны быть выбраны из упомянутых гидрофобных аминокислот.

25 *Гептадные повторы и суперспирали*

Например, в предпочтительном мономерном структурном элементе формулы (Ia) или (Ib) и/или формулы (IIa) или (IIb) ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, содержит гептадный повтор или ундекадный повтор, более предпочтительно, гептадный повтор, в частности, белок любой из формул

30 [aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)]_x (IIIa),
 [aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)]_x (IIIb),

- [aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)]_x (IIIc),
 [aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)]_x (III d),
 [aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)]_x (III e),
 [aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)]_x (III f),
 5 [aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)]_x (III g),

где aa обозначает аминокислоту или ее производное, aa(a), aa(b), aa(c), aa(d), aa(e), aa(f) и aa(g) представляют собой одинаковые или различные аминокислоты или их производные, предпочтительно, aa(a) и aa(d) представляют собой одинаковые или различные гидрофобные аминокислоты или их производные; и x представляет собой
 10 число от 2 до 20, предпочтительно, от 3 до 10.

Гептад представляет собой гептапептид формулы aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g) (IIIa) или любую из его пермутаций формул (IIIb) – (IIIg).

Предпочтительными являются мономерные структурные элементы формулы (Ia) или (Ib) и/или формулы (IIa) или (IIb), в которых домен олигомеризации белка ND1 и/или ND2,
 15 предпочтительно, ND1 и ND2, содержит

- (1) белок любой из формул (IIIa) – (IIIg), где x представляет собой 3, и aa(a) и aa(d) выбраны из 20 природных α-L-аминокислот, так что сумма баллов из таблицы 1 для данных 6 аминокислот составляет по меньшей мере 14, и такие белки содержат до 17 последующих гептадов; или
 20 (2) белок любой из формул (IIIa) – (IIIg), где x представляет собой 3, и aa(a) и aa(d) выбраны из 20 природных α-L-аминокислот, так что сумма баллов из таблицы 1 для данных 6 аминокислот составляет по меньшей мере 12, при условии, что одна аминокислота aa(a) представляет собой заряженную аминокислоту, способную образовывать межспиральный солевой мостик с аминокислотой aa(d) или aa(g)
 25 соседнего гептада, или что одна аминокислота aa(d) представляет собой заряженную аминокислоту, способную образовывать межспиральный солевой мостик с аминокислотой aa(a) или aa(e) соседнего гептада, и такие белки, содержащие до двух последующих гептадов. Заряженная аминокислота, способная образовывать межспиральный солевой мостик с аминокислотой соседнего гептада, представляет
 30 собой, например, Asp или Glu, если другая аминокислота представляет собой Lys, Arg или His, или наоборот.

Таблица 1: Баллы аминокислот для определения предпочтения (склонности к суперспирализации)

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

- 5 Также предпочтительными являются мономерные структурные элементы формулы (Ia) или (Ib) и/или формулы (IIa) или (IIb), в которых домен олигомеризации белка ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, содержит белок, выбранный из следующих предпочтительных белков:

(11) Белок любой из формул (IIIa) – (IIIg), где

aa(a) выбрана из Val, Ile, Leu и Met и их производных, и

aa(d) выбрана из Leu, Met, Val и Ile и их производных.

(12) Белок любой из формул (IIIa) – (IIIg), где одна aa(a) представляет собой Asn, и другая aa(a) выбрана из Asn, Ile и Leu, и aa(d) представляет собой Leu. Такой белок
5 обычно представляет собой домен димеризации.

(13) Белок любой из формул (IIIa) – (IIIg), где aa(a) и aa(d) обе представляют собой Trp. Такой белок обычно представляет собой домен пентамеризации.

(14) Белок любой из формул (IIIa) – (IIIg), где aa(a) и aa(d) обе представляют собой Phe. Такой белок обычно представляет собой домен тетрамеризации.

10 (15) Белок любой из формул (IIIa) – (IIIg), где aa(a) и aa(d) обе представляют собой Trp или Phe. Такой белок обычно представляет собой домен пентамеризации.

(16) Белок любой из формул (IIIa) – (IIIg), где aa(a) представляет собой Leu или Ile, и одна aa(d) представляет собой Gln, а другая aa(d) выбрана из Gln, Leu и Met. Такой белок характеризуется потенциалом представлять собой домен пентамеризации.

15 Другие предпочтительные белки представляют собой белки (1), (2), (11), (12), (13), (14), (15) и (16), как определено в настоящем документе выше, и причем дополнительно

(17) по меньшей мере одна aa(g) выбрана из Asp и Glu, и aa(e) в следующем гептаде представляет собой Lys, Arg или His; и/или

(18) по меньшей мере одна aa(g) выбрана из Lys, Arg и His, и aa(e) в следующем гептаде
20 представляет собой Asp или Glu, и/или

(19) по меньшей мере одна aa(a – g) выбрана из Lys, Arg и His, и aa(a – g) на расстоянии 3 или 4 аминокислоты в последовательности представляет собой Asp или Glu. Такие пары аминокислот aa(a – g) представляют собой, например, aa(b) и aa(e) или aa(f).

Программы предсказания суперспирали, такие как PCOILS
25 (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>; Gruber M. *et al.*, J. Struct. Biol. 2006, 155(2): 140-5) или MULTICOIL (<http://groups.csail.mit.edu/cb/multicoil/cgi-bin/multicoil.cgi>), могут предсказывать последовательности белка, образующие суперспираль. Вследствие этого в мономерном структурном элементе формулы (Ia) или (Ib) и/или формулы (IIa) или (IIb) ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, содержит белок, содержащий по
30 меньшей мере последовательность длиной два гептадных повтора, которая согласно

предсказанию программы предсказания суперспирали PCOILS образует суперспираль с вероятностью, превышающей 0,9, для всех ее аминокислот с по меньшей мере одним из размеров окон 14, 21 или 28.

- В более предпочтительном мономерном структурном элементе формулы (Ia) или (Ib) и/или формулы (IIa) или (IIb) ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, содержит белок, содержащий по меньшей мере одну последовательность длиной три гептадных повтора, которая согласно предсказанию программы предсказания суперспирали PCOILS образует суперспираль с вероятностью, превышающей 0,9, для всех ее аминокислот с по меньшей мере одним из размеров окон 14, 21 или 28.
- 10 В другом более предпочтительном мономерном структурном элементе формулы (Ia) или (Ib) и/или формулы (IIa) или (IIb) ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, содержит белок, содержащий по меньшей мере две отдельные последовательности длиной два гептадных повтора, которые согласно предсказанию программы предсказания суперспирали PCOILS образуют суперспираль с вероятностью, превышающей 0,9, для
- 15 всех ее аминокислот с по меньшей мере одним из размеров окон 14, 21 или 28.

Структурная база данных RCSB

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

Пентамерные суперспирали

- 20 Пентамерные суперспирали можно получить из базы данных RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) с помощью поиска в отношении симметрии в биологической сборке с использованием дискриминатора «Симметрия белка является циклической - C5» (“Protein symmetry is cyclic - C5”) в сочетании с текстовым поиском «спиральный» (“coiled”) или «молния» (“zipper”) или в сочетании с поиском SCOP, таким как «Поиск
- 25 *ScopTree для суперспиральных белков*» (“*ScopTree Search for Coiled coil proteins*”).
- Перечень подходящих идентификаторов включает 4PN8, как представлено в SEQ ID NO: 40, 4PND, как представлено в SEQ ID NO: 41, 4WBA, как представлено в SEQ ID NO: 42, 3V2N, как представлено в SEQ ID NO: 43, 3V2P, как представлено в SEQ ID NO: 44, 3V2Q, как представлено в SEQ ID NO: 45, 3V2R, как представлено в SEQ ID NO: 46,
- 30 4EEB, как представлено в SEQ ID NO: 47, 4EED, как представлено в SEQ ID NO: 48, 3MIW, как представлено в SEQ ID NO: 49, 1MZ9, как представлено в SEQ ID NO: 50,

1FBM, как представлено в SEQ ID NO: 51, 1VDF, как представлено в SEQ ID NO: 52, 2GUV, как представлено в SEQ ID NO: 53, 2HYN, как представлено в SEQ ID NO: 54, 1ZLL, как представлено в SEQ ID NO: 55, 1T8Z, как представлено в SEQ ID NO: 56.

Тетрамерные суперспирали

- 5 Аналогично, тетрамерные суперспирали можно получить с использованием «Симметрия белка является 'циклической – C4'» (“Protein symmetry is ‘cyclic – C4’”) в сочетании с текстовым поиском «спиральный» (“coiled”) или в сочетании с поиском SCOP, таким как «Поиск *ScopTree* для суперспиральных белков» (“*ScopTree Search for Coiled coil proteins*”).
- 10 В случае тетрамерных суперспиралей данный поиск позволяет получить следующие подходящие идентификаторы: 5D60, 5D5Y, 5AL6, 4WB4, 4BHV, 4C5Q, 4GJW, 4H7R, 4H8F, 4BXT, 4LTO, 4LTP, 4LTQ, 4LTR, 3ZDO, 3RQA, 3R4A, 3R4H, 3TSI, 3K4T, 3F6N, 2O6N, 2OVC, 2O1J, 2O1K, 2AG3, 2CCE, 1YBK, 1U9F, 1U9G, 1U9H, 1USD, 1USE, 1UNT, 1UNU, 1UNV, 1UNW, 1UNX, 1UNY, 1UNZ, 1UO0, 1UO1, 1UO2, 1UO3, 1UO4, 1UO5, 1W5I,
- 15 1W5L, 1FE6, 1G1I, 1G1J, 1EZJ, 1RH4, 1GCL.

Димерные суперспирали

- Аналогично, димерные суперспирали можно получить с использованием «Симметрия белка является 'циклической – C2'» (“Protein symmetry is ‘cyclic – C2’”) в сочетании с текстовым поиском «спиральный» (“coiled”) или в сочетании с поиском SCOP, таким как
- 20 «Поиск *ScopTree* для суперспиральных белков» (“*ScopTree Search for Coiled coil proteins*”).

- В случае димерных суперспиралей данный поиск позволяет получить следующие подходящие идентификаторы: 5M97, 5M9E, 5FIY, 5F4Y, 5D3A, 5HMO, 5EYA, 5IX1, 5IX2, 5JHF, 5JVM, 5JVP, 5JVR, 5JVS, 5JVU, 5JX1, 5FCN, 5HHE, 2N9B, 4ZRY, 4Z6Y, 4YTO, 4ZI3,
- 25 5AJS, 5F3K, 5F5R, 5HUZ, 5DJN, 5DJO, 5CHX, 5CJ0, 5CJ1, 5CJ4, 5C9N, 5CFF, 4WHV, 3WUT, 3WUU, 3WUV, 4ZQA, 4XA3, 4XA4, 4PXJ, 4YVC, 4YVE, 5BML, 5AL7, 4WOT, 4CG4, 5AMO, 4WII, 4WIK, 4RSJ, 4CFG, 4R3Q, 4WID, 4CKG, 4CKH, 4NSW, 4W7P, 4QQ4, 4OJK, 4TL1, 4OH9, 4LPZ, 4Q62, 4L2W, 4M3L, 4CKM, 4CKN, 4N6J, 4LTB, 4LRZ, 2MAJ, 2MAK, 4NAD, 4HW0, 4BT8, 4BT9, 4BTA, 4HHD, 4M8M, 4J3N, 4L6Q, 4C1A, 4C1B, 4GDO, 4BWK,
- 30 4BWP, 4BWX, 4HU5, 4HU6, 4L9U, 4G0U, 4G0V, 4G0W, 4L3I, 4G79, 4GEU, 4GEX, 4GFA, 4GFC, 4BL6, 4JMR, 4JNH, 2YMY, 4HAN, 3VMY, 3VMZ, 3VN0, 4ABX, 3W03, 2LW9, 4DZM,

4ETO, 3TNU, 3THF, 4E8U, 3VMX, 4E61, 3VEM, 3VBB, 4DJG, 3TV7, 3STQ, 3V8S, 3Q8T, 3U1C, 3QH9, 3AZD, 3ONX, 3OKQ, 3QX3, 3SJA, 3SJB, 3SJC, 2L2L, 3QFL, 3QKT, 2XV5, 2Y3W, 3Q0X, 3AJW, 3NCZ, 3NIO, 2XU6, 3M91, 3NMD, 3LLL, 3LX7, 3ME9, 3MEU, 3MEV, 3ABH, 3ACO, 3IAO, 3HLS, 2WMM, 3A6M, 3A7O, 2WVR, 3ICX, 3ID5, 3ID6, 3HNW, 3I1G, 5 2K6S, 3GHG, 3G1E, 2W6A, 2V51, 3ERR, 3E1R, 2VY2, 2ZR2, 2ZR3, 3CL3, 3D9V, 2Z17, 2JEE, 3BBP, 3BAS, 3BAT, 2QM4, 2V71, 2NO2, 2PON, 2V0O, 2DQ0, 2DQ3, 2Q2F, 2NRN, 2E7S, 2H9V, 2FXM, 2HJD, 2GZD, 2GZH, 2FV4, 2F2U, 2EUL, 2ESM, 2ETK, 2ETR, 1ZXA, 1YIB, 1YIG, 1XSX, 1RFY, 1U0I, 1XJA, 1T3J, 1T6F, 1R7J, 1UII, 1PL5, 1S1C, 1P9I, 1R48, 1URU, 1OV9, 1UIX, 1NO4, 1NYH, 1MV4, 1LR1, 1L8D, 1LJ2, 1KQL, 1G XK, 1GXL, 1GK6, 10 1JR5, 1GMJ, 1JAD, 1JCH, 1JBG, 1JTH, 1JY2, 1JY3, 1IC2, 1HCI, 1HF9, 1HBW, 1FXK, 1D7M, 1QUU, 1CE9, 2A93, 1BM9, 1A93, 1TMZ, 2AAC, 1ZII, 1ZIK, 1ZIL, 2ARA, 2ARC, 1JUN, 1YSA, 2ZTA. Однако данный перечень димерных структур также содержит антипараллельные суперспирали, поскольку поиск димерных суперспиралей с циклической двукратной симметрией отбирает параллельные и антипараллельные суперспирали. С помощью 15 визуального осмотра структуры можно легко отличить параллельные димерные суперспирали от антипараллельных.

Некоторые из данных идентификаторов для пентамерных, тетрамерных и димерных суперспиралей также содержат дополнительные домены белка, однако после 20 визуального осмотра данные дополнительные домены можно легко обнаружить и удалить.

В качестве альтернативы, на вебсайте http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccplus/search/periodic_table/ представлена периодическая 25 таблица суперспиральных структур, из которой можно выбрать димерные, тримерные, тетрамерные и пентамерные (такие как 2GUV) суперспирали, а также более сложные суперспиральные ансамбли, такие как шестиспиральные пучки (такие как 2EBO).

Также предусмотрены модификации аминокислот пентамерных, тетрамерных и димерных суперспиральных доменов, используемых в настоящем документе. Такие модификации могут представлять собой, например, замену аминокислот, которые 30 представляют собой остатки, отличные от остатков сердцевины (aa(a) и aa(d)), на внешней стороне олигомера в положениях aa(e), aa(g), aa(b), aa(c) или aa(f), предпочтительно, в положениях aa(b), aa(c) или aa(f), наиболее предпочтительно, в положении aa(f). Возможные модификации представляют собой замены на заряженные

остатки, чтобы сделать данные олигомеры более растворимыми. Также предусмотрены более короткие конструкции данных доменов.

Другие модификации аминокислот могут представлять собой, например, замену аминокислот в положениях сердцевины (aa(a) и aa(d)) с целью стабилизации олигомера, т.е. путем замены менее благоприятных остатков сердцевины более благоприятными остатками, т.е., в качестве общего правила, остатки в положениях сердцевины с более низкой склонностью к суперспирализации согласно таблице 1 можно заменить остатками с более высокой склонностью к суперспирализации, если они не изменяют состояние олигомеризации суперспиралей.

- 10 Термин «модификация аминокислоты (аминокислотная модификация)», используемый в настоящем документе, включает замену, вставку и/или делецию аминокислоты в последовательности полипептида и представляет собой, предпочтительно, замену аминокислоты. Под «заменой аминокислоты» или «заменой» в настоящем документе подразумевают замену аминокислоты в конкретном положении в последовательности
- 15 родительского полипептида другой аминокислотой. Например, замена R94K обозначает вариант полипептида, в котором аргинин в положении 94 заменен лизином. Для целей настоящего документа множественные замены обычно разделены косой чертой. Обычно заменены от 1 до 15, предпочтительно, от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5 и, еще более предпочтительно, от 1 до 4, в частности, от 1 до 3, более конкретно,
- 20 от 1 до 2 аминокислот, наиболее конкретно, заменена 1 аминокислота. Например, R94K/L78V обозначает двойной вариант, содержащий замены R94K и L78V. Под «вставкой аминокислоты» или «вставкой» в настоящем документе подразумевают добавление аминокислоты в конкретном положении в последовательности родительского полипептида. Например, вставка -94 обозначает вставку в положении 94.
- 25 Под «делецией аминокислоты» или «делецией» в настоящем документе подразумевают удаление аминокислоты в конкретном положении в последовательности родительского полипептида. Например, R94- обозначает делецию аргинина в положении 94.

- Пептид или белок, содержащий модификацию аминокислоты, как описано в настоящем документе, будет, предпочтительно, характеризоваться идентичностью аминокислотной
- 30 последовательности по меньшей мере приблизительно 80%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 90%, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 95%, в частности, 99% с родительским

(немодифицированным) пептидом или белком. Предпочтительно, модификация аминокислоты представляет собой консервативную модификацию.

В настоящем документе термин «консервативная модификация» или «консервативная модификация последовательности» предназначен для обозначения модификаций аминокислоты, которые в значительной степени не изменяют биофизические свойства аминокислотной последовательности. Модификации могут быть введены в белок согласно настоящему изобретению с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез. Консервативные замены аминокислот представляют собой таковые, в которых остаток аминокислоты заменен остатком аминокислоты, содержащим подобную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, содержащих подобные боковые цепи, были определены в данной области техники. Данные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Согласно одному варианту реализации домен олигомеризации ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, представляет собой суперспиральный домен. Согласно предпочтительному варианту реализации домен олигомеризации ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, представляет собой димерный, тетрамерный или пентамерный домен, более предпочтительно, тетрамерный или пентамерный домен. Согласно более предпочтительному варианту реализации домен олигомеризации ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, представляет собой пентамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из 4PN8, 4PND, 4WBA, 3V2N, 3V2P, 3V2Q, 3V2R, 4EEB, 4EED, 3MIW, 1MZ9, 1FBM, 1VDF, 2GUV, 2HYN, 1ZLL, 1T8Z, или пентамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из идентификаторов pdb 4PN8, 4PND, 4WBA, 3V2N, 3V2P, 3V2Q, 3V2R, 4EEB, 4EED, 3MIW, 1MZ9, 1FBM, 1VDF, 2GUV, 2HYN, 1ZLL, 1T8Z, которая содержит модификацию аминокислоты и/или укорочена на одном или обоих концах, причем каждая пентамерные суперспираль

указана в соответствии с номером идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB). Согласно следующему более предпочтительному варианту реализации домен олигомеризации ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, представляет собой пентамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из 4PN8, как

5 представлено в SEQ ID NO: 40, 4PND, как представлено в SEQ ID NO: 41, 4WBA, как представлено в SEQ ID NO: 42, 3V2N, как представлено в SEQ ID NO: 43, 3V2P, как представлено в SEQ ID NO: 44, 3V2Q, как представлено в SEQ ID NO: 45, 3V2R, как представлено в SEQ ID NO: 46, 4EEB, как представлено в SEQ ID NO: 47, 4EED, как представлено в SEQ ID NO: 48, 3MIW, как представлено в SEQ ID NO: 49, 1MZ9, как

10 представлено в SEQ ID NO: 50, 1FBM, как представлено в SEQ ID NO: 51, 1VDF, как представлено в SEQ ID NO: 52, 2GUV, как представлено в SEQ ID NO: 53, 2HYN, как представлено в SEQ ID NO: 54, 1ZLL, как представлено в SEQ ID NO: 55, 1T8Z, как представлено в SEQ ID NO: 56, или пентамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из идентификаторов pdb 4PN8, как представлено в SEQ ID NO: 40, 4PND, как

15 представлено в SEQ ID NO: 41, 4WBA, как представлено в SEQ ID NO: 42, 3V2N, как представлено в SEQ ID NO: 43, 3V2P, как представлено в SEQ ID NO: 44, 3V2Q, как представлено в SEQ ID NO: 45, 3V2R, как представлено в SEQ ID NO: 46, 4EEB, как представлено в SEQ ID NO: 47, 4EED, как представлено в SEQ ID NO: 48, 3MIW, как представлено в SEQ ID NO: 49, 1MZ9, как представлено в SEQ ID NO: 50, 1FBM, как

20 представлено в SEQ ID NO: 51, 1VDF, как представлено в SEQ ID NO: 52, 2GUV, как представлено в SEQ ID NO: 53, 2HYN, как представлено в SEQ ID NO: 54, 1ZLL, как представлено в SEQ ID NO: 55, 1T8Z, как представлено в SEQ ID NO: 56, которая содержит модификацию аминокислоты и/или укорочена на одном или обоих концах, причем каждая пентамерная суперспираль указана в соответствии с номером

25 идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB). Еще более предпочтительный ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, представляет собой пентамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из домена пентамеризации триптофановая молния (идентификатор pdb: 1T8Z) или домена пентамеризации триптофановая молния (идентификатор pdb: 1T8Z), который содержит

30 модификацию аминокислоты и/или укорочен на одном или обоих концах, в частности, пентамерную суперспираль, содержащую SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:26). Еще гораздо более предпочтительный ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, представляет собой пентамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из

домена пентамеризации триптофановая молния (идентификатор pdb: 1T8Z, как представлено в SEQ ID NO: 56) или домена пентамеризации триптофановая молния (идентификатор pdb: 1T8Z, как представлено в SEQ ID NO: 56), который содержит модификацию аминокислоты и/или укорочен на одном или обоих концах, в частности, 5 пентамерную суперспираль, содержащую SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:26).

Согласно другому более предпочтительному варианту реализации домен олигомеризации ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, представляет собой тетрамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из 5D60, 5D5Y, 5AL6, 4WB4, 4BHV, 4C5Q, 4GJW, 4H7R, 4H8F, 4BXT, 4LTO, 4LTP, 4LTQ, 4LTR, 3ZDO, 3RQA, 10 3R4A, 3R4H, 3TSI, 3K4T, 3F6N, 2O6N, 2OVC, 2O1J, 2O1K, 2AG3, 2CCE, 1YBK, 1U9F, 1U9G, 1U9H, 1USD, 1USE, 1UNT, 1UNU, 1UNV, 1UNW, 1UNX, 1UNY, 1UNZ, 1UO0, 1UO1, 1UO2, 1UO3, 1UO4, 1UO5, 1W5I, 1W5L, 1FE6, 1G1I, 1G1J, 1EZJ, 1RH4, 1GCL, или тетрамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из идентификаторов pdb 5D60, 5D5Y, 5AL6, 4WB4, 4BHV, 4C5Q, 4GJW, 4H7R, 4H8F, 4BXT, 4LTO, 4LTP, 4LTQ, 15 4LTR, 3ZDO, 3RQA, 3R4A, 3R4H, 3TSI, 3K4T, 3F6N, 2O6N, 2OVC, 2O1J, 2O1K, 2AG3, 2CCE, 1YBK, 1U9F, 1U9G, 1U9H, 1USD, 1USE, 1UNT, 1UNU, 1UNV, 1UNW, 1UNX, 1UNY, 1UNZ, 1UO0, 1UO1, 1UO2, 1UO3, 1UO4, 1UO5, 1W5I, 1W5L, 1FE6, 1G1I, 1G1J, 1EZJ, 1RH4, 1GCL, которые содержат модификацию аминокислоты и/или укорочены на одном или обоих концах, причем каждая тетрамерная суперспираль указана в соответствии с 20 номером идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB).

Согласно другому более предпочтительному варианту реализации домен олигомеризации ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, выбран из группы суперспиралей, содержащих SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 23.

Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации тетрамерная суперспираль получена из тетрабрахиона (tetrabrachion), предпочтительно, 25 тетрамерная суперспираль из тетрабрахиона (1FE6) или из тетрабрахиона (1FE6), которая содержит модификацию аминокислоты и/или укорочена на одном или обоих концах, причем каждый тетрабрахион указан в соответствии с номером идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB), в частности, тетрамерная суперспираль 30 представляет собой тетрамерную суперспираль, содержащую SEQ ID NO: 19.

Согласно следующему наиболее предпочтительному варианту реализации тетрамерная суперспираль получена из тетрабрахиона, предпочтительно, тетрамерная

суперспираль из тетрабрахиона (1FE6, как представлено в SEQ ID NO: 57) или из тетрабрахиона (1FE6, как представлено в SEQ ID NO: 57), которая содержит модификацию аминокислоты и/или укорочена на одном или обоих концах, причем каждый тетрабрахион указан в соответствии с номером идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB), в частности, тетрамерная суперспираль представляет собой тетрамерную суперспираль, содержащую SEQ ID NO: 19.

Конкретные суперспирали

Наиболее предпочтительными являются последовательности суперспиралей и мономерные структурные элементы, описанные в примерах.

10 SHB

Пептид или белок SHB в настоящем документе обозначает пептид или белок, который образует пучки, состоящие из шести спиралей, обычно упакованные в центральную тримерную суперспиральную конфигурацию. Спираль SHB в настоящем документе обозначает пептид или белок, обычно представляющий собой спираль, которая вместе с пятью другими спиральями SHB образует шестиспиральный пучок. Спираль SHB обычно представляет собой альфа-спираль. Обычно домены SHB1 и SHB2 одного мономерного структурного элемента согласно настоящему изобретению образуют шестиспиральный пучок вместе с доменами SHB1 и SHB2 двух следующих мономерных структурных элементов согласно настоящему изобретению, как продемонстрировано, например, на фигурах 2B), 6B) и 14B).

SHB в настоящем документе обычно представляют собой суперспиральные белки. Белки SHB обычно состоят из центрального тримерного суперспирального домена, который собирается с тремя другими спиральями, идущими антипараллельно центральному тримерному суперспиральному домену, с образованием SHB. Вследствие этого присоединение суперспиральной спирали к антипараллельной спирали с помощью аминокислотной последовательности после образования SHB позволяет получить петлевую структуру данной последовательности. Поскольку состояние олигомеризации SHB представляет собой тример, таким образом можно стабилизировать тримерные образующие петлю белки в их нативной конформации путем их применения для соединения двух спиралей SHB (фигура 1).

Суперспиральные SHB можно получить из базы данных RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) с помощью поиска в отношении стехиометрии в биологической сборке с использованием дискриминатора «Стехиометрия представляет собой АЗВЗ» (“Stoichiometry is A3B3”) в сочетании с текстовым поиском «пучок» (“bundle”), если две спирали расположены на
5 отдельных цепях. Подходящие идентификаторы, которые содержат SHB, представляют собой 4I2L, 3W19, 3VTQ, 3VU5, 3VU6, 3VTP, 3VGX, 3VH7, 3VGX, 3VIE, 3RRR, 3RRT, 3KPE, 3G7A, 3F4Y, 3F50, 1ZV8, представляющие собой SHB из ВИЧ, РСВ, SARS (severe acute respiratory syndrome, тяжелого острого респираторного синдрома) и парамиксовируса. Если две спирали являются частью одной цепи белка, тогда следует
10 выбрать стехиометрию «АЗ» или симметрия является ‘циклической – СЗ’ (‘cyclic – C3’). Сочетание с текстовым поиском для «пучок» (“bundle”) и «шесть» (“six”) позволяет получить следующий перечень подходящих идентификаторов pdb: 4NJL, 4NSM, 4JF3, 4JGS, 4JPR, 2OT5, 3CP1, 3CYO, 2IEQ, 1JPX, 1JQ0, 1K33, 1K34.

Также было описано конструирование белков SHB *de novo* (Boyken, S. E., et al. Science
15 2016, 352(6286): 680-687). Идентификаторы pdb для данных структур представляют собой 5J0J, 5J0I, 5J0H, 5IZS, 5J73, 5J2L, 5J0L, 5J0K, 5J10.

Также предусмотрены модификации аминокислот SHB, используемых в настоящем документе. Такие модификации могут, например, представлять собой замену аминокислот, которые представляют собой остатки, отличные от остатков сердцевины
20 (aa(a) и aa(d)), за пределами сердцевины тримера в положениях aa(e), aa(g), aa(b), aa(c) или aa(f), предпочтительно, в положениях aa(b), aa(c) или aa(f), наиболее предпочтительно, в положении aa(f). Другие остатки представляют собой экспонированные на поверхности остатки антипараллельной спирали. Однако данные модификации могут не препятствовать способности SHB1 образовывать комплекс
25 шестиспирального пучка с SHB2. Возможные модификации представляют собой замены на заряженные остатки, чтобы сделать SHB более растворимым. Также в настоящем изобретении предусмотрены более короткие конструкции данных доменов. Более короткие конструкции данных доменов обычно содержат по меньшей мере три гептадных повтора (т.е. по меньшей мере 21 аминокислоту) в центральном
30 суперспиральном домене; не опираясь на какую-либо теорию, считают, что для взаимодействия SHB1 с SHB2 обычно требуется по меньшей мере шесть поворотов спирали, – что соответствует трем гептадным повторам центральной тримерной суперспирали, – чтобы данное взаимодействие было в достаточной степени

- специфичным. Более предпочтительно, центральный суперспиральный домен составляет по меньшей мере четыре гептадных повтора в длину. Другие модификации могут представлять собой, например, замену аминокислот в положениях сердцевины (aa(a) и aa(d)) для стабилизации сердцевины тримера, т.е. путем замены менее благоприятных остатков более благоприятными остатками, т.е., в качестве общего правила, остатки в положениях сердцевины с меньшей склонностью к суперспирализации согласно таблице 1 можно заменить остатками с более высокой склонностью к суперспирализации, если они не изменяют состояние олигомеризации суперспирали. В примере 5) модификация T560V заменяет треонин в положении aa(d) на валин, таким образом, заменяя треонин со склонностью к суперспирализации -1,2 на валин с более высокой склонностью, составляющей 1,1, в положении сердцевины aa(d). Аналогично, T564V заменяет треонин в положении aa(a) на валин, таким образом, заменяя треонин со склонностью к суперспирализации 0,2 на валин с более высокой склонностью, составляющей 4,1, в положении сердцевины aa(a).
- 15 Согласно предпочтительному варианту реализации домены SHB1 и/или SHB2 каждый независимо выбран из группы, состоящей из 4I2L, 3W19, 3VTQ, 3VU5, 3VU6, 3VTP, 3VGY, 3VH7, 3VGX, 3VIE, 3RRR, 3RRT, 3KPE, 3G7A, 3F4Y, 3F50, 1ZV8, 4NJL, 4NSM, 4JF3, 4JGS, 4JPR, 2OT5, 3CP1, 3CYO, 2IEQ, 1JPX, 1JQ0, 1K33, 1K34, 5J0J, 5J0I, 5J0H, 5IZS, 5J73, 5J2L, 5J0L, 5J0K и 5J10, или независимо выбран из группы, состоящей из
- 20 4I2L, 3W19, 3VTQ, 3VU5, 3VU6, 3VTP, 3VGY, 3VH7, 3VGX, 3VIE, 3RRR, 3RRT, 3KPE, 3G7A, 3F4Y, 3F50, 1ZV8, 4NJL, 4NSM, 4JF3, 4JGS, 4JPR, 2OT5, 3CP1, 3CYO, 2IEQ, 1JPX, 1JQ0, 1K33, 1K34, 5J0J, 5J0I, 5J0H, 5IZS, 5J73, 5J2L, 5J0L, 5J0K и 5J10, которые содержат модификацию аминокислоты и/или укорочены на одном или обоих концах, причем каждый SHB указан в соответствии с номером идентификатора pdb банка
- 25 данных белков RCSB (RCSB PDB).

Согласно следующему предпочтительному варианту реализации домены SHB1 и/или SHB2 каждый независимо выбран из группы, состоящей из 4I2L, как представлено в SEQ ID NO: 58, 3W19, как представлено в SEQ ID NO: 59, 3VTQ, как представлено в SEQ ID NO: 60, 3VU5, как представлено в SEQ ID NO: 61, 3VU6, как представлено в SEQ ID NO: 62, 3VTP, как представлено в SEQ ID NO: 63, 3VGY, как представлено в SEQ ID NO: 64, 3VH7, как представлено в SEQ ID NO: 65, 3VGX, как представлено в SEQ ID NO: 66, 3VIE, как представлено в SEQ ID NO: 67, 3RRR, как представлено в SEQ ID NO: 68, 3RRT, как представлено в SEQ ID NO: 69, 3KPE, как представлено в SEQ ID NO: 70, 3G7A, как

представлено в SEQ ID NO: 71, 3F4Y, как представлено в SEQ ID NO: 72, 3F50, как представлено в SEQ ID NO: 73, 1ZV8, как представлено в SEQ ID NO: 74, 4NJL, как представлено в SEQ ID NO: 75, 4NSM, как представлено в SEQ ID NO: 76, 4JF3, как представлено в SEQ ID NO: 77, 4JGS, как представлено в SEQ ID NO: 78, 4JPR, как

5 представлено в SEQ ID NO: 79, 2OT5, как представлено в SEQ ID NO: 80, 3CP1, как представлено в SEQ ID NO: 81, 3CYO, как представлено в SEQ ID NO: 82, 2IEQ, как представлено в SEQ ID NO: 83, 1JPX, как представлено в SEQ ID NO: 84, 1JQ0, как представлено в SEQ ID NO: 85, 1K33, как представлено в SEQ ID NO: 86, 1K34, как представлено в SEQ ID NO: 87, 5J0J, как представлено в SEQ ID NO: 88, 5J0I, как

10 представлено в SEQ ID NO: 89, 5J0H, как представлено в SEQ ID NO: 90, 5IZS, как представлено в SEQ ID NO: 91, 5J73, как представлено в SEQ ID NO: 92, 5J2L, как представлено в SEQ ID NO: 93, 5J0L, как представлено в SEQ ID NO: 94, 5J0K, как представлено в SEQ ID NO: 95, и 5J10, как представлено в SEQ ID NO: 96, или независимо выбран из группы, состоящей из 4I2L, как представлено в SEQ ID NO: 58,

15 3W19, как представлено в SEQ ID NO: 59, 3VTQ, как представлено в SEQ ID NO: 60, 3VU5, как представлено в SEQ ID NO: 61, 3VU6, как представлено в SEQ ID NO: 62, 3VTP, как представлено в SEQ ID NO: 63, 3VGY, как представлено в SEQ ID NO: 64, 3VH7, как представлено в SEQ ID NO: 65, 3VGX, как представлено в SEQ ID NO: 66, 3VIE, как представлено в SEQ ID NO: 67, 3RRR, как представлено в SEQ ID NO: 68, 3RRT, как

20 представлено в SEQ ID NO: 69, 3KPE, как представлено в SEQ ID NO: 70, 3G7A, как представлено в SEQ ID NO: 71, 3F4Y, как представлено в SEQ ID NO: 72, 3F50, как представлено в SEQ ID NO: 73, 1ZV8, как представлено в SEQ ID NO: 74, 4NJL, как представлено в SEQ ID NO: 75, 4NSM, как представлено в SEQ ID NO: 76, 4JF3, как представлено в SEQ ID NO: 77, 4JGS, как представлено в SEQ ID NO: 78, 4JPR, как

25 представлено в SEQ ID NO: 79, 2OT5, как представлено в SEQ ID NO: 80, 3CP1, как представлено в SEQ ID NO: 81, 3CYO, как представлено в SEQ ID NO: 82, 2IEQ, как представлено в SEQ ID NO: 83, 1JPX, как представлено в SEQ ID NO: 84, 1JQ0, как представлено в SEQ ID NO: 85, 1K33, как представлено в SEQ ID NO: 86, 1K34, как представлено в SEQ ID NO: 87, 5J0J, как представлено в SEQ ID NO: 88, 5J0I, как

30 представлено в SEQ ID NO: 89, 5J0H, как представлено в SEQ ID NO: 90, 5IZS, как представлено в SEQ ID NO: 91, 5J73, как представлено в SEQ ID NO: 92, 5J2L, как представлено в SEQ ID NO: 93, 5J0L, как представлено в SEQ ID NO: 94, 5J0K, как представлено в SEQ ID NO: 95, и 5J10, как представлено в SEQ ID NO: 96, которые

содержат модификацию аминокислоты и/или укорочены на одном или обоих концах, причем каждый SHB указан в соответствии с номером идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB).

5 Согласно более предпочтительному варианту реализации SHB1 и/или SHB2 представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:35.

Домен В

Домен В представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область. Обычно
10 домен В представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область, причем домен содержит антиген. Антигены, подлежащие включению в домен В согласно настоящему изобретению, могут представлять собой В-клеточные эпитопы и/или Т-клеточные эпитопы и выбраны из группы, состоящей из (а) белков или пептидов, которые вызывают (индуцируют) иммунный ответ против раковых клеток; (b) белков,
15 пептидов или углеводов, которые вызывают иммунный ответ против инфекционных заболеваний; (с) белков или пептидов, которые вызывают иммунный ответ против аллергенов; и (d) белковых или пептидных гормонов, которые вызывают иммунный ответ для лечения заболевания человека. SAPN, содержащие такие белки, или их пептидные фрагменты могут быть подходящими для вызова иммунного ответа у людей
20 или также у сельскохозяйственных и домашних животных. Конкретные подходящие антигены, содержащиеся в домене В, представляют собой белок или пептид, который вызывает иммунный ответ против раковых клеток, белок или пептид, который вызывает иммунный ответ против инфекционных заболеваний, белок или пептид, который вызывает иммунный ответ против аллергенов, белок или пептид, который вызывает
25 иммунный ответ для лечения заболевания человека.

Наиболее предпочтительно, антигены, подлежащие включению в домен В согласно настоящему изобретению и подлежащие экспонированию в петлевой конформации на SAPN, выбраны из группы, состоящей из тримерных гликопротеинов поверхности оболочечных вирусов. Существует множество различных схем классификации вирусов.
30 Как правило, фузогены вирусов относят к одному из трех различных классов (Podbilewicz, В. Annu Rev Cell Dev Biol. 2014, 30: 111-139). Классом, представляющим особенный интерес, является класс I, хорошо известным членом которого является

грипп с его белком поверхности ГА. Данный класс I включает фузогены из множества различных семейств вирусов, таких как, среди прочих, парамиксовирусы, филовирусы, ретровирусы и коронавирусы. Структурным свойством, представляющим интерес, фузогенов класса I являются трехспиральные гликопротеины в конформации, предшествующей слиянию, которые переупорядочиваются в шестиспиральный пучок с образованием так называемой конформации, наступающей после слияния. Наиболее важные виды вирусов, представляющие интерес, с их тримерным гликопротеином поверхности включают вирус гриппа А и В (ГА – см. пример 5), ВИЧ (gp160 – см. пример 12), Эбола (GP), Марбург (GP), РСВ (F-белок), ЦМВ (gB-белок – см. пример 1), ВПГ (вирус простого герпеса, gB-белок), SARS (S-белок) и MERS (Middle East respiratory syndrome, ближневосточный респираторный синдром, S-белок). Также фрагменты данных гликопротеинов поверхности могут быть экспонированы в тримерном состоянии олигомеризации в качестве образующих петлю белков (см. пример 1 и пример 12).

Особенный интерес представляют структурированные в форме петли белки, которые образуют тримеры, такие как множество белков поверхности оболочечных вирусов, демонстрирующие такую тримерную петлевую структуру. Примеры представляют собой ГА гриппа, gB-белок ЦМВ, F-белок РСВ, gp160 ВИЧ и многие другие. Данные тримерные белки поверхности оболочечных вирусов находятся в метастабильном предфузогенном состоянии, которое можно стабилизировать путем конструирования данных белков в мотив спираль-петля-спираль SHB в наночастицах согласно настоящему изобретению. В качестве альтернативы, субструктуры тримерных белков могут удерживаться вместе в тримерной конформации при применении SHB в качестве каркаса. Одна конкретная субструктура представлена в примере 12 в форме петлевой структуры V1V2 вершины gp160 ВИЧ. Также простые петлевые структуры могут быть экспонированы в виде петель на SHB без необходимости и обязательного условия образовывать конкретную тримерную конформацию, но просто будучи удерживаемыми в петлевой структуре. Таким образом, согласно предпочтительному варианту реализации домен В имеет тримерную петлевую структуру.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации домен В выбран из белка или пептида, который вызывает иммунный ответ против раковых клеток, белка или пептида, который вызывает иммунный ответ против инфекционных заболеваний, белка или пептида, который вызывает иммунный ответ против аллергенов, белка или пептида, который вызывает иммунный ответ для лечения заболевания человека. Более

предпочтительно, В выбран из белка или пептида, который вызывает иммунный ответ против раковых клеток, белка или пептида, который вызывает иммунный ответ против аллергенов, белка или пептида, который вызывает иммунный ответ для лечения заболевания человека, в частности, В выбран из белка или пептида, который вызывает
5 иммунный ответ против раковых клеток, и/или белка или пептида, который вызывает иммунный ответ против аллергенов.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации домен В выбран из группы тримерных гликопротеинов поверхности оболочечных вирусов класса I.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации домен В выбран из группы,
10 состоящей из тримерных гликопротеинов поверхности вируса гриппа А и В (ГА), ВИЧ (gp160), Эбола (GP), Марбург (GP), РСВ (F-белок), ЦМВ (gB-белок), ВПГ (gB-белок), SARS (S-белок) и MERS (S-белок).

Согласно другому предпочтительному варианту реализации домен В выбран из группы, состоящей из ГА гриппа, gB-белка ЦМВ, F-белка РСВ, gp160 ВИЧ и белка с
15 идентификатором pdb 4TVP, или выбран из группы, состоящей из ГА гриппа, gB-белка ЦМВ, F-белка РСВ, gp160 ВИЧ и белка с кодом pdb 4TVP, который содержит модификацию аминокислоты и/или укорочен на одном или обоих концах. В частности, предпочтительно, домен В выбран из группы, состоящей из ГА гриппа, gB-белка ЦМВ, gp160 ВИЧ и белка с идентификатором pdb 4TVP, или выбран из группы, состоящей из
20 ГА гриппа, gB-белка ЦМВ, gp160 ВИЧ и белка с кодом pdb 4TVP, который содержит модификацию аминокислоты и/или укорочен на одном или обоих концах (пример 12). Согласно другому предпочтительному варианту реализации домен В выбран из группы, состоящей из белка, содержащего SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:29.

Область петли обычно представляет собой белок, в котором N-терминальный конец и
25 C-терминальный конец конкретной петли находятся в непосредственной близости, так что они могут быть сконструированы на двух спиралях SHB, которые также находятся в непосредственной близости. В зависимости от конкретных положений аминокислот двух спиралей, к которым с помощью линкера L2 и L3 присоединена петлевая структура, расстояние между точками присоединения в некоторой степени варьирует. Для
30 шестиспирального пучка из РСВ (код pdb 5J3D) наиболее короткое расстояние между C α -положениями пептидных цепей составляет приблизительно 5 Å (на поверхности взаимодействия спираль-спираль), тогда как наиболее длинное расстояние составляет

приблизительно 15 Å (на противоположных сторонах спиралей). Для шестиспирального пучка из ВИЧ (код pdb 3G7A) расстояния между C α -положениями пептидных цепей являются весьма сравнимыми и характеризуются значениями, составляющими от 5,5 Å до приблизительно 15 Å для наиболее короткого и наиболее длинного расстояния, соответственно. Прибавление длины линкеров L2 и L3 к наиболее длинному расстоянию позволяет получить максимальное расстояние, которое может разделять два конца В друг от друга. Для ГА расстояние между N-терминальным и C-терминальным концом в кристаллической структуре согласно коду pdb 3SM5 составляет 15,8 Å (примеры 5 – 9), в то время как для петли V1V2 из примера 12 расстояние между N-терминальным и C-терминальным концом в кристаллической структуре согласно коду pdb 4TVP составляет 13,1 Å. Согласно предпочтительному варианту реализации область петли обычно представляет собой белок, в котором расстояние между N-терминальным и C-терминальным концом в кристаллической структуре составляет от приблизительно 3 Å до приблизительно 20 Å, предпочтительно, от приблизительно 5 Å до приблизительно 17 Å.

Согласно предпочтительному варианту реализации N-терминальный или C-терминальный конец В находятся в α -спиральной конформации, так что В может быть присоединен к SHB1 или SHB2 с помощью непрерывной α -спирали, такой как для петли V1V2 gp160 в примере 12 (фигура 14).

Если домен В представляет собой простой β -изгиб, тогда расстояние между N- и C-терминальными концами составляет приблизительно 4,5 Å. Обычная структура β -изгиба, которую можно использовать в качестве домена В, представляет собой петлю V3 gp160 ВИЧ. Расстояние между возможными N-терминальным и C-терминальным концами в кристаллической структуре кода pdb 4TVP составляет 4,6 Å (остатки с 306 по 318), 6,7 Å (остатки с 300 по 326) или 4,2 Å (остатки с 296 по 331) для петли V3 gp160 ВИЧ. Согласно предпочтительному варианту реализации домен В представляет собой простой β -изгиб, и расстояние между возможными N-терминальным и C-терминальным концами составляет от приблизительно 3 Å до приблизительно 8 Å, предпочтительно, от приблизительно 4 Å до приблизительно 7 Å.

Линкеры

Цепь линкера L1, L2 или L3 состоит из одной пептидной связи или пептидной цепи, предпочтительно, пептидной цепи, состоящей из от 1 до 50 аминокислот, или одной пептидной связи, более предпочтительно, пептидной цепи, состоящей из от 1 до 30 аминокислот, или одной пептидной связи, еще более предпочтительно, пептидной цепи, состоящей из от 1 до 20 аминокислот, или одной пептидной связи, наиболее предпочтительно, пептидной цепи, состоящей из от 1 до 15 аминокислот, или одной пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации цепь линкера L1, L2 или L3 выбрана из группы, состоящей из пептидной связи, AAA, GS, GG, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:27. Предпочтительно, линкер L1 содержит α -спиральный сегмент, присоединенный к домену SHB1, более предпочтительно, содержит суперспиральную последовательность, которая совмещена со следующим доменом SHB1. Если домен SHB1 представляет собой центральную тримерную суперспираль SHB, данный α -спиральный сегмент L1, предпочтительно, представляет собой часть суперспиральной последовательности. Например, в последовательности L1 примера 1 часть ELYSRLAEIE (SEQ ID NO:36) представляет собой суперспираль, которая совмещена с суперспиралью следующего домена SHB1. Аналогично, остатки с 1 по 8 L1 примера 5 представляют собой суперспиральный участок, который совмещен с предшествующим доменом SHB1. Вновь, остатки с 4 по 14 L1 в примере 12 содержат суперспиральную последовательность, которая совмещена со следующим доменом SHB1.

Самосборные белковые наночастицы: единицы LCM

SAPN образованы из мономерных структурных элементов формулы (Ia) или (Ib) и/или формулы (IIa) или (IIb). Если такие структурные элементы собираются, они образуют так называемые «единицы LCM». Число мономерных структурных элементов, которые соберутся в такую единицу LCM, будет определено наименьшим общим кратным (least common multiple, LCM). Вследствие этого, если, например, домены олигомеризации мономерного структурного элемента образует пентамер (ND1)₅ (m=5) и тримерный SHB, единицу LCM образуют 15 мономеров. Если линкерный сегмент L2 имеет соответствующую длину, данная единица LCM может собираться в форме сферической белковой наночастицы. SAPN могут быть образованы в результате сборки только одной

или более чем одной единицы LCM (таблица 2). Такие SAPN представляют собой топологически закрытые структуры.

Правильный многогранник

Существует пять правильных многогранников: тетраэдр, куб, октаэдр, додекаэдр и икосаэдр. Они характеризуются различными элементами внутренней вращательной симметрии. Тетраэдр имеет ось 2-го и две оси 3-го порядков, куб и октаэдр имеют по одной оси 2-го, 3-го и 4-го порядков вращательной симметрии, и додекаэдр и икосаэдр имеют ось вращательной симметрии 2-го, 3-го и 5-го порядков. В кубе пространственная ориентация данных осей является абсолютно такой же, как в октаэдре; в додекаэдре и икосаэдре пространственная ориентация данных осей друг относительно друга также является абсолютно одинаковой. Вследствие этого для SAPN согласно настоящему изобретению додекаэдр и икосаэдр можно считать идентичными. Додекаэдр / икосаэдр образованы из до 60 идентичных трехмерных структурных элементов (таблица 2). Данные структурные элементы представляют собой асимметричные единицы (asymmetric units, AU) многогранника. Они представляют собой пирамиды, и грани пирамиды соответствуют одной из осей вращательной симметрии, вследствие этого данные AU будут нести на своих гранях элементы симметрии 2-го, 3-го и 5-го порядков. Если данные элементы симметрии получены из доменов олигомеризации белка, такие AU сконструированы из мономерных структурных элементов, как описано выше. Достаточно выровнять два домена олигомеризации ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, и SHB1/2 вдоль двух осей симметрии AU. SHB, образованный SHB1 и SHB2, всегда характеризуется тримерной симметрией. ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, могут представлять собой пентамер, тетрамер или димер. Если данные два домена олигомеризации образуют стабильные олигомеры, поверхность симметрии вдоль третьей оси симметрии будет образована автоматически, и она может быть стабилизирована путем оптимизации взаимодействий вдоль данной поверхности, например, гидрофобных, гидрофильных или ионных взаимодействий, либо ковалентных связей, таких как дисульфидные мостики.

Сборка в самосборные белковые наночастицы (SAPN) с симметрией правильного многогранника

Для получения самосборных белковых наночастиц (SAPN) с правильной геометрией (додекаэдр, икосаэдр, октаэдр, куб и тетраэдр) необходимо более одной единицы LCM.

Например, для получения икосаэдра из мономера, содержащего тримерный и пентамерный домены олигомеризации, необходимы 4 единицы LCM, каждая из которых состоит из 15 мономерных структурных элементов, т.е. белковая наночастица с правильной геометрией будет состоять из 60 мономерных структурных элементов.

- 5 Необходимые комбинации состояний олигомеризации двух доменов олигомеризации и число единиц LCM для образования соответствующего многогранника перечислены в таблице 2.

Таблица 2: Возможные комбинации состояний олигомеризации при образовании правильного многогранника

№ п.п.	m	Тип многогранника	LCM	Число единиц LCM	Число структурных элементов
1	5	додекаэдр / икосаэдр	15	4	60
2	4	куб / октаэдр	12	2	24
3	2	тетраэдр	6	2	12
4	2	куб / октаэдр	6	4	24
5	2	додекаэдр / икосаэдр	6	10	60

10

Будут ли единицы LCM затем собираться с образованием правильного многогранника, который состоит из более одной единицы LCM, зависит от геометрического выравнивания двух доменов олигомеризации ND1 и/или ND2, предпочтительно, ND1 и ND2, и SHB1/2 относительно друг друга, в особенности, от угла между осями вращательной симметрии двух доменов олигомеризации. Это, главным образом, регулируется i) взаимодействиями между соседними доменами в наночастице, ii) длиной линкерного сегмента L2, iii) формой индивидуальных доменов олигомеризации. Данный угол является большим в единицах LCM по сравнению с упорядочиванием в правильном многограннике. Также данный угол не идентичен в мономерных структурных элементах, в отличие от правильного многогранника.

15

20

Если угол между двумя доменами олигомеризации является достаточно малым (даже меньшим, чем в правильном многограннике с икосаэдрической симметрией), тогда большое количество (несколько сотен) белковых цепей могут собираться в белковую наночастицу. Недавно был опубликован биофизический и математический анализ SAPN с архитектурой тримера-пентамера (Indelicato, G., et al. Biophys J 2016, 110(3): 646-660).

25

Согласно следующему аспекту настоящее изобретение относится к мономерным структурным элементам формулы (Ia) или (Ib) либо формулы (IIa) или (IIb), как определено выше.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей
5 белковую наночастицу, как описано в настоящем документе. Такая композиция является в особенности подходящей в качестве вакцины. Предпочтительные композиции вакцины содержат белковую наночастицу в водном буферном растворе и могут дополнительно содержать, например, вспомогательные вещества, полученные из сахара (такие как глицерол, трегалоза, сахароза и т.д.), или вспомогательные вещества, полученные из
10 аминокислот (такие как аргинин, пролин, глутамат и т.д.), или анионные, катионные, неионные или цвиттер-ионные детергенты (такие как холат, дезоксихолат, твин, и т.д.) или соли любого типа (такие как NaCl, MgCl₂, и т.д.) для корректировки ионной силы раствора.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу вакцинации
15 человека или животного, отличного от человека, причем указанный способ включает введение эффективного количества белковой наночастицы, как описано в настоящем документе выше, субъекту, который нуждается в такой вакцинации.

Настоящее изобретение также относится к белковой наночастице, как описано в настоящем документе выше, для применения в способе вакцинации человека или
20 животного, отличного от человека, причем указанный способ включает введение эффективного количества белковой наночастицы, как описано в настоящем документе выше, субъекту, который нуждается в такой вакцинации.

Настоящее изобретение также относится к применению белковой наночастицы, как описано в настоящем документе выше, с целью получения лекарственного средства для
25 вакцинации человека или животного, отличного от человека, причем указанный способ включает введение эффективного количества белковой наночастицы, как описано в настоящем документе выше, субъекту, который нуждается в такой вакцинации.

Конструкция SHB-SAPN (самосборной белковой наночастицы с SHB)

Конкретный пример SHB-SAPN согласно настоящему изобретению представляет собой следующую конструкцию «HC_AD1g», соответствующую формуле (Ia), с последовательностью

- 5 MGHHHHHHKRGSWREWNAKWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWAYWTLTWRYGELYSRLAEIETL
 LRGI VQQQQQLLDVVKRQQEMLRLVWVGTKNLQARVAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAIL
 SAIY NKPIAARFMGDV LGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVI FNFARSEYVQY
 GQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKI FFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDDGGEGPYRVCSMAQGTD
 LIRFERNIVCTGTDEDKQEWENKIRFLEANISESLEQAQIQQEK NMYELQKL (SEQ ID
 10 NO:1)

Данная конструкция состоит из следующих подструктур:

- X1: MGHHHHHHKRG S (SEQ ID NO:2)
 ND1: WREWNAKWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWAYWTLTW (SEQ ID NO:3)
 L1: RYGELYSRLAEIE (SEQ ID NO:4)
 15 SHB1: TLLRGI VQQQQQLLDVVKRQQEMLRLVWVGTKNLQARV (SEQ ID NO:5)
 L2: пептидная связь
 B: AEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAILS AIY NKPIAARFMGDV LGLASCVTINQTS
 VKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVI FNFARSEYVQY GQLGEDNEILLGNHRTEECQL
 PSLKIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDDGGEGPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCT (SEQ
 20 ID NO:6)
 L3: GTDEDK (SEQ ID NO:15)
 SHB2: QEWEHKIRFLEANISESLEQAQIQQEK NMYELQKL (SEQ ID NO:7)
 Y1: отсутствует

- 25 Для облегчения очистки HC_AD1g начинается с последовательности X1, как определено в формуле (Ia) или (Ib):

MGHHHHHHKRG S (SEQ ID NO:2),

которая содержит His-метку для аффинной очистки на основе никеля, а на уровне ДНК – сайты рестрикции для последующего субклонирования (NcoI и BamHI).

Для ND1 был выбран домен пентамеризации ($m=5$). Конкретная пентамерная суперспираль представляет собой новую модификацию домена пентамеризации триптофановая молния (Liu, J., et al. Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101(46): 16156-16161) с идентификатором pdb 1T8Z.

- 5 Исходный домен пентамеризации триптофановая молния содержит последовательность

SSNAKWDQWSSDWQTNNAKWDQWSNDWNAWRS DWQAWKDDWARWNQRWDNWAT (SEQ ID NO: 8)

- 10 Модифицированная суперспиральная последовательность домена пентамеризации, использованного для *HC_AD1g*, начинается в положении 13, оканчивается в положении 49 и содержит вариации последовательности на С-терминальном конце (TLTW вместо NQRW) и, с целью оптимизации растворимости, - несколько модификаций заряда в положениях суперспирали, отличных от положений сердцевины, но с сохранением паттерна гептадного повтора триптофановых остатков в положениях сердцевины, как в
- 15 исходной последовательности (SEQ ID NO:8).

13-WREWNAKWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWAYWTLTW-48 (SEQ ID NO: 3)

- Данная последовательность затем удлинена коротким линкером L1 RYGELYSRLAEIE (SEQ ID NO:4), после чего присоединена к первой спирали SHB SHB1 из gp41 ВИЧ. L1 содержит гибкий остаток G (глицин) между частями пентамера и тримера наночастицы,
- 20 за которым следует суперспиральный участок ELYSRLAEIE (SEQ ID NO:36), который вводится в SHB ВИЧ, со следующей последовательностью:

TLLRGIVQQQQQLLDVVKRQQEMLRLVWGTKNLQARV (SEQ ID NO: 5)

Данная последовательность SHB1 соответствует остаткам с 534 по 571 белка P12449.1 gp41 ВИЧ с последовательностью

- 25 534-TLFRGIVQQQQQLLDVVKRQQEMLRLTVWGTKNLQARV-571 (SEQ ID NO:9)

с двумя точечными мутациями F536L и T560V, причем две точечные мутации F536L и T560V дополнительно стабилизируют сердцевину суперспирального тримера SHB. Две спирали SHB в гликопротеине оболочки ВИЧ (P12449.1) содержат следующую последовательность (жирный шрифт):

MSGKIQLLVAFLLTSACLIYCTKYVTVFYGVPVWKNAS I PLFCATKNRDTWGTIQCLPDNDY
 QEIPLNVTEAFDAWDNIVTEQAVEDVWNLFETS I KPCVKLTPLCVTMNCNASTESAVATTS PS
 GPDMINDDPCIQLNCSGLREEDMVECQFNMTGLELDKKKQYSETWYSKDVVCESDNSTDRK
 RCYMNHCNTSVITESCDKHYWDAMRFYCAPPGFVLLRCNDTNYSGFEPNCSKVVASTCTRMM
 5 ETQPSTWLGFNNGTRAENRTYIYWHGRDNRTIISLNKYNNLTILCRPENKTVVPITLMSGRRF
 HSQKIINKKPRQAWCRFKGEWREAMQEVKQTLVKHPRYKGTNDTNKINFTAPEKDS DPEVAYM
 WTNCRGEFLYCNMTWFLNWVENKTGQQHNYVPCHEQIINTWHKVGKNVYLPPREGELSCEST
 VTSIIANI DVDGDNRTNITFSAEVAELYRLELGDYKLVEVTPIGFAPTAEKRYSSAPGRHCRG
 VLVLGFLGFLTTAGAAMGAASLTLSAQSR**TLFRGIVQQQQQLLDVVVKRQEQEMLRLTVWGTKNL**
 10 **QARVTAIEKYLADQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDTLTPEWNNMTWQEWHEHKIRFLEANIS**
ESLEQAQIQQEKMYELQKLNSWDVFNGWFDLTSWIKYIQYGVMI VVGIVALRIVIVVQMLS
 RLRKGYRPFVSSPPGYIQQIHINKDWEQPDREETEEDVGNDVGSRSWPWPIEYIHFLIRLLIR
 LLTRLYNSCRDLLSRLYLILQPLRDWLRKAAYLQYGCEWIQEAFQALARVTRETLTSAGRSL
 WGALGRIGRILAVPRRIRQGAEIALL (SEQ ID NO:10)

- 15 За данным SHB1 затем следует пептидная связь со следующей аминокислотой – аланином – образующего петлю белка В с последовательностью:

AEAWCVDQRRRTLEVFKELSKINPSAISAIYNKPIAARFMGDVLGLASCVTINQTSVKVLRDM
 NVKESPGRCYSRPVVI FNFARSEYVQYGLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKI FIAGNSAYEY
 VDYLFKRMIDDGGEGPYRVC SMAQGTDLIRFERNIVCT (SEQ ID NO:6)

- 20 Данный образующий петлю белок В представляет собой нечто более сложное. Он содержит вершину gB-белка ЦМВ с доменом AD1. Остатки с 504 по 638 (AEAWCVDQRRRTLEVFKELSKINPSAI

LSAIYNKPIAARFMGDVLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVWIFNFANSSYV
 Q YGQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKI FIAGNSAYEYVDYLFKRMID (SEQ ID NO:11))

- 25 присоединены к остаткам с 90 по 112 (PYRVC SMAQGTDLIRFERNIVCT (SEQ ID NO:12) пептидной нитью DGGEG (SEQ ID NO:13). Данный подход позволяет получить непрерывный образующий петлю белковый домен области вершины gB-белка (фигура 2A), который затем удерживается вместе с помощью SHB в тримерной конформации (фигура 2B). Данный белок также содержит две точечные мутации N587R и S589E,
 30 чтобы сделать его более растворимым. Последовательность полноразмерного gB-белка представляет собой:

MESRIWCLVVCVNLICIVCLGAAVSSSTRGTSATHSHHSSHTTSAAHSRSGSVSQRVTSSTQTV
 SHGVNETIYNTTLKYGDVVGVTTKY**PYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCT**SMKPINEDLDEGIM
 VVYKRNIWAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIHHINSHSQCYSSY
 SRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSRGSTWLYRETCLNLCMV
 5 TITARSKYPHYFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTI VSDFGRPNSA
 LETHRLVAFLERADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSK
 KQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQOIFNTSYNQTYEKYGNVSVFETTGGGLVFWQGIKQKSLVE
 LERLANRSSNLNTHNRTKR | STDGNNATHLSNMESVHNLVYAQLQOFTYDTLRGYINRALAQIA
EAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAILSAIYNKPIAARFMGDVGLASCVTINQTSVKVLRDMN
 10 **VKESPGRCYSRPVVIFNFANSSYVQYGQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFIAGNSAYEYV**
DYLFKRMIDLSSISTVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREFNSYKQ
 RVKYVEDKVVDPLPPYLKGLDDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVEGVATFLKNPFGAF
 TIIILVAIAVVI I IYLIYTRQRRLCMQPLQNLFPYLVSADGTTVTSNGTKDTSLQAPPSYEESV
 YNSGRKGPSPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALVRLDAEQRAQQNGTDSLQDGTGTQDKGQK
 15 PNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEENV (SEQ ID NO:14)

Затем за данным В-доменом следует пептидный линкер L3 с последовательностью GTDEDK (SEQ ID NO:15), соединенный со второй спиралью SHB SHB2 из gp41 ВИЧ со следующей последовательностью:

QEWENKIRFLEANISESLEQAQIQQEKMYELQKL (SEQ ID NO:7)

20 Данная последовательность соответствует остаткам с 616 по 650 белка P12449.1 gp41 ВИЧ (SEQ ID NO:10). Наконец, фрагмент Y1 формулы (Ia) в данной конструкции *HC_AD1g* отсутствует.

Модель мономера *HC_AD1g* представлена на фигуре 2 в ее мономерной, тримерной и икосаэдрической формах, при условии T=1 икосаэдрической симметрии. Снимок

25 *HC_AD1g*, полученный с помощью электронного микроскопа, представлен на фигуре 3.

Примеры

Следующие примеры являются подходящими для дополнительного пояснения настоящего изобретения, но никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

5 Пример 1 - *Клонирование*

ДНК, кодирующую конструкции наночастиц, получали с применением стандартных процедур молекулярной биологии. Например, плазмиды, содержащие ДНК, кодирующую последовательность белка *HC_AD1g*

MGHHNNHHKRGSWREWNAKWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWAYWTLTWRYGELYSRLAEIETL
 10 LRGIVQQQQQLLDVVKRQQEMLRLVVGWTKNLQARVAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAIL
 SAIYNKPIAARFMGDVLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVI FNFARSEYVQY
 GQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKI FIAGNSAYEYVDYLFKRMIDDGGEGPYRVCSMAQGTD
 LIRFERNIVCTGTDEDKQEWENKIRFLEANISESLEQAQIQQEKNMYYELQKL (SEQ ID
 NO: 1),

15 конструировали путем клонирования в сайты рестрикции *NcoI/EcoRI* основной конструкции экспрессии SAPN согласно фигуре 4.

Данная конструкция формулы (Ia) X1 – ND1 – L1 – SHB1 – L2 – B – L3 – SHB2 – Y1
 состоит из His-метки (X1), пентамерной суперспиральной триптофановой молнии (ND1),
 линкера (L1), тримерной суперспирали gp41 ВИЧ SHB (SHB1), пептидной связи в
 20 качестве линкера (L2), вершины гликопротеина gB ЦМВ (B), образующей тримерную
 петлевую структуру (B), линкера (L3), присоединяющего C-конец B к второй спирали SHB
 в пределах gp41 ВИЧ (SHB2), в то время как Y1 в данной конструкции отсутствует.

Пример 2 - *Экспрессия*

Клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3), которые выращивали в бульоне Лурия с
 25 ампициллином при температуре 37°C, трансформировали плазмидами. Можно
 использовать другие линии клеток, такие как Tuner BL21(DE3), Origami 2(DE3) и Rosetta
 2(DE3)pLysS. Экспрессию индуцировали изопропил-β-D-тиогалакто-пиранозидом. Через
 четыре часа после индукции клетки переносили из температуры 37°C и собирали путем
 30 центрифугирования при 4000 x g в течение 15 мин. Осадок клеток хранили при
 температуре -20°C. Осадок оттаивали на льду и суспендировали в лизирующем буфере,

состоящем из 9 М мочевины, 100 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Трис, pH 8, 20 мМ имидазола и 0,2 мМ Трис-2-карбоксиилфосфина (ТСЕР).

В качестве альтернативы, для экспрессии также можно использовать другие линии клеток, такие как клетки KRX. В клетках KRX экспрессию можно осуществлять с помощью протокола ранней автоиндукции клеток KRX с применением предварительных культур O/N при температуре 37 градусов с ампициллином (100 мкг/мл) и глюкозой (0,4%). Предварительные культуры O/N разводили в соотношении 1:100 в культуру для экспрессии, содержащую ампициллин (100 мкг/мл), глюкозу (0,05%) и рамнозу (0,1%), при температуре 25°C в течение 24 часов. Уровень экспрессии белка оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ; фигура 5А).

Пример 3 - *Очистка*

Клетки лизировали с помощью ультразвуковой обработки, а затем лизат осветляли путем центрифугирования при 30500 x g в течение 45 мин. Осветленный лизат инкубировали с Ni-NTA агарозными гранулами (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США) в течение по меньшей мере 1 часа. Колонку промывали лизирующим буфером, а затем очищали с помощью следующего протокола промывки и элюирования:

Лизирующий буфер: 100 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Трис, 9 М мочевины, 5 мМ DTT, pH 8,0

Промывка 1: лизирующий буфер

20 Промывка 2: 500 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Трис, 9 М мочевины, 5 мМ DTT, pH 8,0

Промывка 3: 100 мМ NaH_2PO_4 , 20 мМ лимонная кислота, 9 М мочевины, 5 мМ DTT, pH 6,3

Промывка 4: 100 мМ NaH_2PO_4 , 20 мМ лимонная кислота, 9 М мочевины, 5 мМ DTT, pH 5,9

25 Промывка 5: 100 мМ NaH_2PO_4 , 20 мМ лимонная кислота, 9 М мочевины, 5 мМ DTT, pH 4,5

Промывка 6: лизирующий буфер

Промывка 7: 60% изопропанол, 10 мМ Трис, pH 8,0 (удаление эндотоксина)

Промывка 8: лизирующий буфер

30 Промывка 9: лизирующий буфер

Элюирование: лизирующий буфер с 250 мМ имидазолом

Чистоту оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ), как представлено на фигуре 5В.

Пример 4 – Рефолдинг

Для рефолдинга проводили смену буфера для белка на следующие условия: pH 8,5, 20
 5 mM Трис, 50 mM NaCl, 5% глицерол, 1 mM ТСЕР. Для быстрого рефолдинга проводили рефолдинг 6,7 мл белка (16,75 мг) в 328 мл буфера для рефолдинга, состоящего из pH 8,0, 20 mM Трис, 50 mM NaCl, 5% глицерола. Конечная концентрация белка после рефолдинга составляла 0,05 мг/мл. После быстрого рефолдинга белок диализовали в 2х 4000 л в буфере для рефолдинга с целью удаления оставшейся мочевины. Затем
 10 раствор анализировали методом трансмиссионной электронной микроскопии с негативным окрашиванием при различных разрешениях. Снимки HC-AD1g после рефолдинга, полученные с помощью электронного микроскопа, демонстрируют образование надлежащих наночастиц (фигура 3).

Пример 5 – Архитектура противогриппозной вакцины F34-HAPR-HIVlong

15 С помощью компьютерной графики была разработана SHB-SAPN на основе ГА гриппа, обозначенная «F34-HAPR-HIVlong», со следующей последовательностью:

MGNNMTWQEWENKIRFLEANISESLEQAQIQQEKKNMYELQKLNWDVFGAAADADTICIGYHA
 NNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLP
 VRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAAC
 20 SHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKYVNKKGKEVLVWGIHHPNSKEQQNLYQENAYV
 SVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYWTL LKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALS RGF
 SGIITSNASMHECNTKCTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQ
 SRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNI
 QFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLD FHD SNVKNLYEKVKS
 25 QLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKGSTLSAQVRTLLAGIVQQQQ
 QLLDVVKRQQEMLRLVWVGKNLQARVTAIEKYLKRLRAALQGGAIINETADDIVYRLTVIID
 DRYESLKNLITLRADRLEMIINDNVSTILASIGGDEGDEGDEAREGHHHHHHHHHHHGS (SEQ
 ID NO:16)

F34-HAPR-HIVlong представляет собой конструкцию, которая характеризуется
 30 архитектурой согласно формуле (Ib) и состоит из следующих подструктур:

Y1: MG

SHB2: NNMTWQEWEHKIRFLEANISESLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFG (SEQ ID NO:17)

L3: AAA

5 B:DADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCN
IAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPK
ESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLVWGIH
HPPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLKPGDTII
FEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECF
10 KYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAAD
QKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLV
LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPK
YSEESK (SEQ ID NO:18)

L2: GS

15 SHB1: TLSAQVRTLLAGIVQQQQQLLDVWKRQQEMLRLVWVGKLNQARVTAIEKYL
(SEQ ID NO:19)

L1: KRLRAALQGGA (SEQ ID NO:20)

ND1: IINETADDIVYRLTVIIDDRIYESLKNLITLRADRLEMIINDNVSTILASI (SEQ ID NO:21)

X1: GGDEGDEGDEAREGHHHHHHHHHHHGS (SEQ ID NO:22)

20 Конкретные происхождение и функция частей данной конструкции противогриппозной вакцины являются следующими. Y1 на уровне ДНК содержит сайт клонирования для NcoI; SHB2 представляет собой длинную форму (остатки с 611 по 657) последовательности P12449.1 SHB gp41 ВИЧ; L3 содержит сайт рестрикции для NotI; В соответствии остаткам с 16 по 511 белка ГА P03452.2 вируса гриппа А/Пуэрто-
25 Рико/8/1934(H1N1); L2 содержит сайт рестрикции для BamHI; SHB1 представляет собой длинную форму (остатки с 527 по 578) другой спирали последовательности P12449.1 SHB gp41 ВИЧ с четырьмя точечными мутациями для стабилизации суперспирального тримера (F536L, R537A, T560V и T564V); L1 содержит короткий суперспиральный участок, сайт рестрикции для PstI и гибкую последовательность GG между тримерной и
30 тетрамерной суперспиралью; ND1 содержит остатки с 3 по 52 последовательности из кристаллической структуры тетрабрахиона с кодом pdb 1YBK, образующие тетрамерную суперспираль; X1 содержит участок заряженных остатков, за которым следует His-метка.

Пример 6 – Клонирование

Последовательность, кодирующую *F34-HAPR-HIVlong*, заказывали с фланкирующими сайтами рестрикции (NcoI/EcoRI) в компании Genscript. Для субклонирования *F34-HAPR-HIVlong* в вектор экспрессии рPEP-T использовали рестрикционные ферменты NcoI и EcoRI (фигура 4).

Пример 7 –Экспрессия, очистка и рефолдинг белка

Конструкциями *F34-HAPR-HIVlong* трансформировали экспрессирующие клетки BL21(DE3) (New England BioLabs) и экспрессировали в среде Hyper Broth (Athena). Свежетрансформированные колонии бактерий использовали для инокуляции 10 мл Hyper Broth с ампициллином (100 мкг/мл) и выращивали в течение ночи при температуре 28°C (200 об./мин.). 1% культуры, выращиваемой в течение ночи, использовали для инокуляции культуры для экспрессии (Hyper Broth с ампициллином, 100 мкг/мл). Культуру для экспрессии выращивали при температуре 37°C, 200 об./мин. Культуру индуцировали в течение 3 ч при температуре 37°C с применением IPTG (конечная концентрация 1 мМ), когда плотность клеток при ОП 600 нм достигла 0,8. Осадок клеток собирали с помощью центрифугирования (4000g, 4°C) и промывали ледяным 1x ФБР. Очистку проводили в денатурирующих и восстанавливающих условиях. Осадок клеток ресуспендировали в лизирующем буфере (рН 8,0, 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 100 мМ NaH₂PO₄, 2 мМ ТСЕР) и обрабатывали ультразвуком в течение 3 мин. (амплитуда 40%, 3 сек. импульс включен, 3 сек. импульс выключен), после чего следовало центрифугирование (14'000x g, 50 мин., 4°C) для осаждения дебриса клеток. Белки очищали с применением колонки 5 мл HisTrap (GE Healthcare) на системе ÄKTA Prime FPLC (GE Healthcare). Связывание белка проводили при скорости потока 0,5 мл/мин., после чего следовала промывка 1 (лизирующий буфер, скорость потока 2 мл/мин.), промывка 2 (лизирующий буфер, содержащий 10 мМ имидазол, рН 8,0), промывка 3 (рН 8, 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 500 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ имидазол, 2 мМ ТСЕР), промывка 4 (рН 4,5, 8 М мочевины, 20 мМ цитрат натрия, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ имидазол, 2 мМ ТСЕР), промывка 5 (рН 8,0, 10 мМ Трис, 60% изопропанол), после чего следовало уравнивание обратно к буферу для промывки 2 перед элюированием. Белок элюировали буфером для элюирования (рН 8,0, 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 100 мМ NaH₂PO₄, 2 мМ ТСЕР, 500 мМ имидазол). Фракции, содержащие белок, объединяли и инкубировали с EDTA с конечной концентрацией 5 мМ для хелатирования

высвободившегося никеля (инкубация в течение 1 ч при к.т.) и проводили замену буфера на буфер для пред-рефолдинга (6 М GndHCl, 50 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, 10 мМ ТСЕР, 10% глицерол, рН 8,0). Концентрацию белка определяли с помощью считывания ОП280. Рефолдинг проводили путем 100-кратного разведения, добавляя
5 белок по каплям (4x 1 мл с интервалом 90 мин.) к буферу для рефолдинга (100 мМ Трис, 400 мМ L-аргинин, 2 мМ EDTA, 5 мМ GSH, 1 мМ GSSG, 25% глицерол, рН 8,0) при постоянном перемешивании. Частицы после рефолдинга фильтровали (мембранный фильтр PES с размером пор 0,1 мкм, Sartolab, Satorius), концентрировали с помощью Amicon Ultra (порог отсечения 100 кДа, Millipore) и снова фильтровали (шприцевый
10 фильтр размером пор 0,1 мкм, Minisart, Sartorius). В препарате частиц была определена конечная концентрация 0,37 мг/мл. Потеря белка в течение процесса рефолдинга, фильтрации, концентрирования и итоговой фильтрации составила 65%.

Анализ культуры для экспрессии методом ДСН-ПААГ продемонстрировал хорошую экспрессию мономера *F34-HAPR-HIVlong*, который перемещался до спрогнозированного
15 уровня молекулярной массы, составляющего 77,9 кДа (фигура 7А). Белок экспрессировался в тельцах включения (данные не показаны), и его можно было очистить с помощью аффинной очистки с высокой степенью чистоты после солюбилизации в денатурирующих буферных условиях (фигура 7В); наночастицы образовывались, что подтверждается методом электронной микроскопии (фигура 8).

20 **Пример 8 – Получение характеристик *F34-HAPR-HIVlong* с применением МАТ, направленных против глобулярного головного домена, и поликлональной гипериммунной сыворотки, специфичной к ГА**

Правильный рефолдинг ГА на SHB-SAPN подтверждали с помощью связывающего анализа ELISA со специфичным к конформации моноклональным антителом (IC5-4F8,
25 BEI Resources) или поликлональной гипериммунной сывороткой (NIBSC) при сравнении с инактивированным вирусом гриппа PR8/34. Планшеты сенсibiliзировали в трех повторах частицами *F34-HAPR-HIVlong* после рефолдинга (1,7 мкг/мл) или инактивированным вирусом PR8/34 (1,7 мкг/мл) в буфере для сенсibiliзации (рН 9,0, 100 мМ NaHCO₃, 12 мМ Na₂CO₃) в течение ночи при температуре 4°C. В качестве
30 отрицательного контроля в 3 лунки добавляли только буфер для сенсibiliзации. Планшеты промывали 3 раза буфером для промывки (1x DPBS, 0,05% Твин, 300 мкл/лунку) и блокировали блокирующим буфером (1x DPBS, 3% БСА, бычий

сывороточный альбумин, 300 мкл/лунку) в течение 2 ч при к.т. на шейкере. Коммерческое моноклональное антитело против ГА вируса гриппа А, клон IC5-4F8 (1:500; BEI Resources), которое, как было показано, распознает правильно свернутый тримерный глобулярный головной домен на вирусе, использовали для анализа образования глобулярного головного домена на поверхности частиц согласно настоящему изобретению. Для получения дополнительных характеристик молекулы ГА после рефолдинга на поверхности частицы использовали коммерчески доступную поликлональную гипериммунную сыворотку овцы против гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (1:1000, NIBSC). Планшеты промывали 3 раза буфером для промывки (300 мкл/лунку), добавляли вторичное антитело – меченное пероксидазой антитело против IgG мыши (1:5000 в 1хФБП/ 3%БСА, 100 мкл/лунку, Sigma) или меченное пероксидазой антитело против IgG козы/овцы (1:1000, в 1хФБП/ 3%БСА, 100 мкл/лунку, Sigma), соответственно, и инкубировали в течение 1 ч при к.т. Планшеты промывали 3 раза буфером для промывки и проявляли путем добавления проявляющего раствора TMB (100 мкл/лунку, Sigma). Реакцию останавливали через 15 мин. или 2 мин., соответственно, с применением 0,5 М серной кислоты (100 мкл/лунку), цветную реакцию считывали с применением считывающего устройства для ELISA (Tecan GENios Pro) при 450 нм.

Поскольку инактивированный вирус был зафиксирован в формалине, авторы настоящего изобретения могли ожидать, что молекулы ГА на поверхности инактивированного вируса демонстрируют правильную конформацию. Наблюдалось устойчивое распознавание частиц *F34-HAPR-HIVlong* как специфичным к конформации MAT IC5-4F8, так и поликлональной иммунной сывороткой, что подтверждало правильный фолдинг ГА на SHB-SAPN. Распознавание было лишь в некоторой степени снижено по сравнению с инактивированным вирусом в случае обеих сывороток; это позволяет предположить, что часть молекул ГА на SHB-SAPN не была свернута правильным образом (фигура 9A,B). В случае MAT, специфичного к глобулярному головному домену, авторы настоящего изобретения наблюдали снижение в 1,6 раз при использовании гипериммунной сыворотки, снижение в 1,8 раз по сравнению с распознаванием инактивированного вируса.

Пример 9 – Конкурентный анализ ELISA для анализа правильной конформации ГА

Инкубация *F34-HAPR-HIVlong* в буфере для сенсibilизации может продемонстрировать, что ГА характеризуется правильной конформацией для связывания антител и для предотвращения их связывания с иммобилизованным инактивированным вирусом. Вследствие этого авторы настоящего изобретения провели анализ ингибирования ELISA для определения того, конкурируют ли растворимые частицы с антителом за распознавание инактивированного вируса.

Планшеты для ELISA сенсibilизировали инактивированным вирусом PR8/34 (1 мкг/мл) в буфере для сенсibilизации (pH 9,0, 100 мМ NaHCO₃, 12 мМ Na₂CO₃) в течение ночи при температуре 4°C. Планшеты промывали 3 раза буфером для промывки (1x DPBS, 0,05% Твин, 300 мкл/лунку) и блокировали блокирующим буфером (1x DPBS, 3% БСА, 300 мкл/лунку) в течение 2 ч при к.т. на шейкере. Коммерческое моноклональное антитело против ГА вируса гриппа А, клон IC5-4F8 (1:500; BEI Resources) и коммерчески доступную гипериммунную поликлональную сыворотку овцы против гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (1:1000, NIBSC) предварительно инкубировали с 80 нг *F34-HAPR-HIVlong* в буфере для частиц (pH 8,0, 100 мМ Трис, 400 мМ L-аргинин, 2 мМ EDTA, 5 мМ GSH, 1 мМ GSSG, 25% глицерол), в течение 1 ч перед добавлением на планшеты для ELISA (100 мкл/лунку). В качестве положительного контроля на том же планшете анализировали смесь антител без предварительной инкубации с частицами. Смесь антитело/частица инкубировали в течение 1 ч при к.т. на шейкере. Планшеты промывали 3 раза буфером для промывки (300 мкл/лунку), добавляли вторичное антитело – меченное пероксидазой антитело против IgG мыши (1:5000 в 1xФБР/ 3%БСА, 100 мкл/лунку, Sigma) или меченное пероксидазой антитело против IgG козы/овцы (1:1000, в 1xФБР/ 3%БСА, 100 мкл/лунку, Sigma), соответственно, и инкубировали в течение 1 ч при к.т. Планшеты промывали 3 раза буфером для промывки и проявляли путем добавления проявляющего раствора ТМВ (100 мкл/лунку, Sigma). Реакцию останавливали через 15 мин. или 2 мин., соответственно, с применением 0,5 М серной кислоты (100 мкл/лунку), цветную реакцию считывали с применением считывающего устройства для ELISA (Tecan GENios Pro) при 450 нм.

Растворимые *F34-HAPR-HIVlong* были способны конкурировать с антителом, связывающимся с инактивированным вирусом PR8/34 (фигура 9C,D). 80 нг *F34-HAPR-HIVlong* были способны ингибировать распознавание PR8/34 МАТ в 1,9 раз и гипериммунной сывороткой – в 4,6 раз. Полученные данные подтверждают, что ГА на SAPN характеризуется правильной конформацией для конкурирования со

специфичными к конформации антителами за связывание с иммобилизированным вирусом.

Пример 10 - **Получение характеристик F3-HAPR с применением МАТ, направленных против глобулярного головного домена, и поликлональной гипериммунной сыворотки, специфичной к ГА**

Получали конструкцию, подобную *F34-HAPR-HIVlong*, в которой отсутствовал домен тетрамеризации из тетрабрахиона и которая вследствие этого после рефолдинга образовывала только тримеры. Молекулу ГА стабилизировали в тримерной конформации, предшествующей слиянию, путем присоединения к SHB ВИЧ, но последующая сборка в SAPN была невозможной, поскольку отсутствовал второй домен олигомеризации. Данная конструкция обозначена *F3-HAPR* и содержит следующую последовательность:

MGNNMTWQEWENKIRFLEANISESLEQAQIQQEKKNMYELQKLNWDVFGAAADADTICIGYHA
 NNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLP
 15 VRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAAC
 SHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKYVNKKGKEVLVWGIHHPNSKEQQONLYQONENAYV
 SVVTSNYNRRFTPEIAERPVRDQAGRMNYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALS RGF
 SGIITSNASMHECNTKCTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQ
 SRGLFGAIAAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNI
 20 QFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKS
 QLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKGSTLSAQVRTLLAGIVQQQQ
 QLLDVVKRQQEMLRLVWGVKNLQARVTAIEKYLKRLRAALQGGGDEGDEGDEAREGHHHHHH
 HHHHGS (SEQ ID NO:23)

Конструкцию клонировали, экспрессировали, очищали, проводили ее рефолдинг с применением протокола, описанного в примерах 6 и 7, и получали ее характеристики с применением поликлональной специфичной к ГА гипериммунной сыворотки для исследования правильного фолдинга молекулы ГА на *F3-HAPR* по сравнению с планшетами, сенсублизованными инактивированным вирусом гриппа PR8/34. В частности, рефолдинг проводили путем 100-кратного разведения, 2x 500 мл с интервалом 90 мин. (всего 1 мл белка в 100 мл буфера для рефолдинга, содержащего 100 мМ Трис, 400 мМ L-аргинин, 2 мМ EDTA, 5 мМ GSH, 1 мМ GSSG, pH 8,0), и исследуя

различные концентрации глицерола – 5%, 10%, 20% и 20%. Материал после рефолдинга концентрировали с применением концентратора Amicon с порогом отсечения 30 кДа и фильтровали с помощью фильтра с размером пор 0,2 мкм до объема приблизительно 3 мл и концентраций белка 70 мг/мл, 58 мг/мл, 25 мг/мл и 26 мг/мл для увеличивающихся 5 концентраций глицерола, соответственно.

Для получения характеристик молекулы ГА после рефолдинга на тримере *F3-HAPR* использовали коммерчески доступную поликлональную гипериммунную сыворотку овцы против гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (1:1000, NIBSC). Планшеты промывали 3 раза буфером для промывки (300 мкл/лунку), добавляли вторичное антитело – меченное 10 пероксидазой антитело против IgG мыши (1:5000 в 1хФБР/ 3%БСА, 100 мкл/лунку, Sigma) или меченное пероксидазой антитело против IgG козы/овцы (1:1000, в 1хФБР/ 3%БСА, 100 мкл/лунку, Sigma), соответственно, и инкубировали в течение 1 ч при к.т. Планшеты промывали 3 раза буфером для промывки и проявляли путем добавления проявляющего раствора TMB (100 мкл/лунку, Sigma). Реакцию останавливали через 15 15 мин. или 2 мин., соответственно, с применением 0,5 М серной кислоты (100 мкл/лунку), цветную реакцию считывали с применением считывающего устройства для ELISA (Tecan GENios Pro) при 450 нм. На фигуре 10 ELISA демонстрирует практически идентичные профили для экспрессированных в бактериях *F3-HAPR* и инактивированного вируса гриппа PR8/34 в отношении их специфичностей связывания 20 с поликлональной сывороткой, которую хранили при различных температурных условиях. Это свидетельствует, что ГА при стабилизации с помощью SHB на конструкции *F3-HAPR* правильно свернут даже при экспрессии в стандартной бактериальной системе экспрессии BL21(DE3).

Пример 11 – **Эксперименты по иммунизации и стимуляции антигеном на мышах**

25 Проводили эксперименты по иммунизации и стимуляции антигеном. Мышей Balb/c (5 животных на группу) иммунизировали внутримышечно (в дни 0, 14 и 28) с помощью 30 мкг *F34-HAPR-HIVlong*, инактивированного вируса PR8/34 (группа положительного контроля) или ФБР (группа отрицательного контроля). Проводили забор крови (в дни 14, 28, 41). Мышей стимулировали антигеном с помощью вируса PR8/34 в день 42 - 30 летальной дозой 100 БОЕ (10 LD₉₀) А/PR/8/34 (H1N1), за мышами наблюдали ежедневно (выживаемость, состояние здоровья, масса тела) до дня 14 после стимуляции антигеном.

Все животные (группа из 5 мышей), которых иммунизировали *F34-HAPR-HIVlong*, выжили после гомологичной стимуляции антигеном (фигуры 11 и 12A). Как и ожидалось, 100% выживаемость также наблюдалась для группы, иммунизированной инактивированным вирусом PR8/34 (фигура 11 и 13A). У всех мышей контрольной группы, которых иммунизировали ФБР, развилось тяжелое состояние здоровья, и они погибли (фигура 11).

В высокой степени протективные антитела, индуцированные в результате иммунизации *F34-HAPR-HIVlong*, продемонстрировали лишь слабое распознавание инактивированного вируса PR8/34 в анализе ELISA (фигура 12B), при этом наблюдались в значительной степени более высокие титры антител, специфичных к инактивированному вирусу PR8/34, при иммунизации инактивированным вирусом PR8/34 (фигура 13B).

Это свидетельствует, что, хотя на инактивированном химическим способом вирусе иммунной системе, главным образом, доступна вершина ГА, *F34-HAPR-HIVlong* презентует ГА значительно лучше - части на боковой стороне молекул ГА также являются поверхностно доступными. Таким образом, *F34-HAPR-HIVlong* могут индуцировать более широкое разнообразие антител, чем инактивированный вирус, и вследствие этого потенциально могут обеспечивать лучшую защиту, поскольку вершина ГА является в высокой степени вариабельной, в то время как на боковой стороне молекул ГА экспонируется более консервативная область стволового домена.

Пример 12 – *Архитектура вакцины против ВИЧ 4TVP-1ENV*

С помощью компьютерной графики были разработаны SHB-SAPN на основе gp160 ВИЧ, обозначенные «4TVP-1ENV», со следующей последовательностью:

```

MGDKHHHHHHHHKDGSDKGSWEEWNARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWARWRATWMMGGRL
LSRLERLERRNVEARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWVKLTPLCVTLQCTNVTNNI
TDDMRGELKNCSFNMTTELDRKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAI
MEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDK (SEQ ID NO: 24)

```

4TVP-1ENV представляет собой конструкцию, которая характеризуется архитектурой согласно формуле (Ia) и состоит из следующих подструктур:

X1: MGDKHHHHHHHHHHKDGSDKGS (SEQ ID NO:25)

ND1: WEEWNARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWARWRATW (SEQ ID NO:26)

L1: MGGRLLSRLERLERRNV (SEQ ID NO:27)

SHB1: EARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVW (SEQ ID NO:28)

L2: пептидная связь

B: VKLTPLCVTLQCTNVTNNITDDMRGELKNCSFNMTELKDKKQKVYSLFYRLDVVQ

5 INENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAI (SEQ ID NO:29)

L3: пептидная связь

SHB2: MEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDK (SEQ ID NO:30)

Y1: отсутствует

Данная конструкция основана на кристаллических структурах 4TVP и 1ENV белков gp120
 10 и gp41 ВИЧ из базы данных белков RCSB. 4TVP представляет собой кристаллическую
 структуру тримерного эктодомена bg505 sosip.664 env ВИЧ-1, содержащего gp120 и gp41
 в конформации, предшествующей слиянию, в комплексе с антителами человека PGT122
 и 35O22 (Pancera, M., et al. Nature 2014, 514(7523): 455-461). 1ENV представляет собой
 атомную структуру эктодомена из gp41 ВИЧ-1 (Weissenhorn, W., et al. Nature 1997,
 15 387(6631): 426-430), т.е. SHB.

В частности, данная конструкция содержит в X1 His-метку, а также сайты рестрикции для
 NcoI и BamHI, в ND1 – пентамерную суперспиральную триптофановую молнию с
 множеством точечных мутаций в остатках, отличных от остатков сердцевины, чтобы
 сделать молекулу более растворимой. L1 представляет собой линкер, который
 20 содержит гибкий фрагмент GG между пентамером и тримером, за которым следует
 суперспиральная последовательность. SHB1 содержит остатки с 31 по 61 цепи A из
 1ENV. В содержит остатки с 90 по 170 цепи G из 4TVP. SHB2 содержит остатки с 87 по
 123 цепи A из 1ENV. Поскольку петля V1-V2 в B оптимально смоделирована на SHB,
 линкеры L2 и L3 представляют собой просто пептидные связи. Наконец, Y1 в данной
 25 конструкции отсутствует.

Поскольку ВИЧ является в высокой степени вариабельным, может быть предусмотрено
 множество других комбинаций аналогичной конструкции. В 4TVP петля V1V2 содержит
 длинные петли V1 и V2. Чтобы направить иммунный ответ на более консервативные
 части gp120, можно выбрать последовательности с короткими петлями V1 и V2. Также
 30 экспонирование структур с меньшей степенью гликозилирования может лучше
 экспонировать остов белка и индуцировать более широкие ответы нейтрализующих
 антител. Вследствие этого выбор последовательностей, в которых в некоторых из

сайтов гликозилирования наблюдаются мутации, может быть благоприятным. Возможный вариант будет представлять собой комбинацию последовательностей ACZ06517.1, ABW95233.1 и AFU33883.1 с получением для В последовательности VKLTPLCVTLICKDTTNSTGTMKNCSFSVTTELKDKKQKVYALFYKLDIVPIETGEYRLINCNT

5 SVI (SEQ ID NO:31), в которой обе петли характеризуются короткими формами, и два сайта гликозилирования изменены так, чтобы они были негликозилированными.

Также могут быть предусмотрены вариации последовательности SHB. Последовательности 1ENV можно заменить на 4TVP (QARNLLSGIVQQSNLLRAPEAQHLLKLTWW (SEQ ID NO:32) и

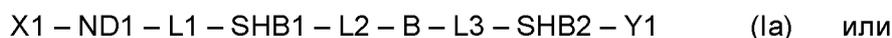
10 LQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQDLLALD (SEQ ID NO:33)), или на более растворимую форму SHB (SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:7)), или на пару T865/T651 (Bai, X., et al. Biochemistry 2008, 47(25): 6662-6670)

(QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQHLLQLTWW (SEQ ID NO:34) и MEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDK (SEQ ID NO:35)), которая

15 практически идентична 1ENV. Более короткие формы данных спиралей также являются подходящими при условии, что спирали все еще образуют в достаточной степени стабильный SHB (см. публикацию Bai, X., et al. Biochemistry 2008, 47(25): 6662-6670).

Формула изобретения

1. Самосборная белковая наночастица (self-assembling protein nanoparticle, SAPN), состоящая из множества структурных элементов формулы (Ia) или (Ib)



5 $Y1 - SHB2 - L3 - B - L2 - SHB1 - L1 - ND1 - X1 \quad (Ib),$

состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND1, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X1 и Y1, где

10 ND1 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры $(ND1)_m$ из m субъединиц ND1,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга

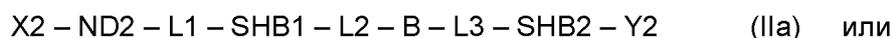
15 представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

Y1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка,

20 содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, причем множество структурных элементов формулы (Ia) или формулы (Ib) необязательно совместно собраны с множеством структурных элементов формулы (IIa) или формулы (IIb)



25 $Y2 - SHB2 - L3 - B1 - L2 - SHB1 - L1 - ND2 - X2 \quad (IIb),$

состоящих из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND2, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X2 и Y2, где

30 ND2 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры $(ND2)_m$ из m субъединиц ND2,

SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3, L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

V представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

- 5 X2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, Y2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, и причем по меньшей мере один из X2 и Y2 формулы (IIa) и/или формулы (IIb)
10 отличается от X1 и Y1 формулы (Ia) и/или формулы (Ib).

2. Белковая наночастица по п. 1, отличающаяся тем, что указанные домен олигомеризации ND1, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3 и домен SHB2 формулы (Ia) или формулы (Ib) идентичны
15 домену олигомеризации ND2, линкеру L1, домену SHB1, линкеру L2, домену B, содержащему петлевую область, линкеру L3 и домену SHB2 формулы (IIa) или формулы (IIb).

3. Белковая наночастица по п. 1, отличающаяся тем, что указанный ND1 и/или ND2
20 представляет собой суперспираль.

4. Белковая наночастица по п. 3, отличающаяся тем, что указанный ND1 и/или ND2 представляет собой пентамерную суперспираль.

- 25 5. Белковая наночастица по п. 4, отличающаяся тем, что указанный ND1 и/или ND2 представляет собой пентамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из 4PN8, 4PND, 4WBA, 3V2N, 3V2P, 3V2Q, 3V2R, 4EEB, 4EED, 3MIW, 1MZ9, 1FBM, 1VDF, 2GUV, 2HYN, 1ZLL и 1T8Z, или тем, что указанный ND1 и/или ND2 представляет собой пентамерную суперспираль, выбранную из группы, состоящей из 4PN8, 4PND, 4WBA,
30 3V2N, 3V2P, 3V2Q, 3V2R, 4EEB, 4EED, 3MIW, 1MZ9, 1FBM, 1VDF, 2GUV, 2HYN, 1ZLL и 1T8Z, которые содержат аминокислотную модификацию и/или укорочены на одном или обоих концах, причем каждая суперспираль указана в соответствии с номером идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB).

6. Белковая наночастица по п. 3, отличающаяся тем, что указанный ND1 и/или ND2 представляет собой тетрамерную суперспираль.
7. Белковая наночастица по п. 6, отличающаяся тем, что указанный ND1 и/или ND2
5 представляет собой тетрамерную суперспираль из тетрабрахиона (1FE6) или тетрамерную суперспираль из тетрабрахиона (1FE6), которая содержит аминокислотную модификацию и/или укорочена на одном или обоих концах, причем указанная тетрамерная суперспираль из тетрабрахиона указана в соответствии с номером идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB).
- 10
8. Белковая наночастица по любому из пп. 1 – 7, отличающаяся тем, что указанные домены SHB1 и/или SHB2 независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из 4I2L, 3W19, 3VTQ, 3VU5, 3VU6, 3VTP, 3VGY, 3VH7, 3VGX, 3VIE, 3RRR, 3RRT, 3KPE, 3G7A, 3F4Y, 3F50, 1ZV8, 4NJL, 4NSM, 4JF3, 4JGS, 4JPR, 2OT5, 3CP1, 3CYO, 2IEQ, 1JPX,
15 1JQ0, 1K33, 1K34, 5J0J, 5J0I, 5J0H, 5IZS, 5J73, 5J2L, 5J0L, 5J0K и 5J10, или тем, что указанные домены SHB1 и/или SHB2 независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из 4I2L, 3W19, 3VTQ, 3VU5, 3VU6, 3VTP, 3VGY, 3VH7, 3VGX, 3VIE, 3RRR, 3RRT, 3KPE, 3G7A, 3F4Y, 3F50, 1ZV8, 4NJL, 4NSM, 4JF3, 4JGS, 4JPR, 2OT5, 3CP1, 3CYO, 2IEQ, 1JPX, 1JQ0, 1K33, 1K34, 5J0J, 5J0I, 5J0H, 5IZS, 5J73, 5J2L, 5J0L, 5J0K и
20 5J10, которые содержат аминокислотную модификацию и/или укорочены на одном или обоих концах, причем каждый SHB указан в соответствии с номером идентификатора pdb банка данных белков RCSB (RCSB PDB).
9. Белковая наночастица по любому из пп. 1 – 8, отличающаяся тем, что В выбран
25 из белка или пептида, который индуцирует иммунный ответ против раковых клеток, белка или пептида, который индуцирует иммунный ответ против инфекционных заболеваний, белка или пептида, который индуцирует иммунный ответ против аллергенов, белка или пептида, который индуцирует иммунный ответ для лечения заболевания человека.
- 30
10. Белковая наночастица по любому из пп. 1 – 8, отличающаяся тем, что В выбран из группы тримерных гликопротеинов поверхности оболочечных вирусов класса I.

11. Белковая наночастица по любому из пп. 1 – 8, отличающаяся тем, что В выбран из группы, состоящей из тримерных гликопротеинов поверхности вируса гриппа А и В (ГА, гемагглютинина), ВИЧ (gp160), Эбола (GP), Марбург (GP), РСВ (респираторно-синцитиального вируса, F-белок), ЦМВ (цитомегаловируса, gB-белок), ВПГ (вируса простого герпеса, gB-белок), SARS (severe acute respiratory syndrome, тяжелого острого респираторного синдрома, S-белок) и MERS (Middle East respiratory syndrome, ближневосточного респираторного синдрома, S-белок).
12. Белковая наночастица по любому из пп. 1 – 11, отличающаяся тем, что указанное множество структурных элементов формулы (Ia) или формулы (Ib) совместно собраны с множеством структурных элементов формулы (IIa) или формулы (IIb), причем по меньшей мере один из X2 и Y2 формулы (IIa) и/или формулы (IIb) представляет собой полноразмерный флагеллин или флагеллин, содержащий только два или три домена.
13. Композиция, содержащая белковую наночастицу по любому из пп. 1 – 12.
14. Мономерный структурный элемент формулы (Ia) или (Ib)
- $$\begin{array}{ll} X1 - ND1 - L1 - SHB1 - L2 - B - L3 - SHB2 - Y1 & \text{(Ia) или} \\ Y1 - SHB2 - L3 - B - L2 - SHB1 - L1 - ND1 - X1 & \text{(Ib), или} \end{array}$$
- состоящий из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND1, линкер L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X1 и Y1, где
- ND1 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры (ND1)_m из m субъединиц ND1,
- SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,
- m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,
- L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,
- B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

X1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, Y1 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены,

5 или

мономерный структурный элемент формулы (IIa) или (IIb)



состоящий из непрерывной цепи, которая содержит домен олигомеризации ND2, линкер

10 L1, домен SHB1, линкер L2, домен B, содержащий петлевую область, линкер L3, домен SHB2 и дополнительные заместители X2 и Y2, где

ND2 представляет собой пептид или белок, который содержит олигомеры $(ND2)_m$ из m субъединиц ND2,

15 SHB1 и SHB2 независимо друг от друга представляют собой спираль пептида или белка с шестиспиральным пучком,

m представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно 3 и не кратно 3,

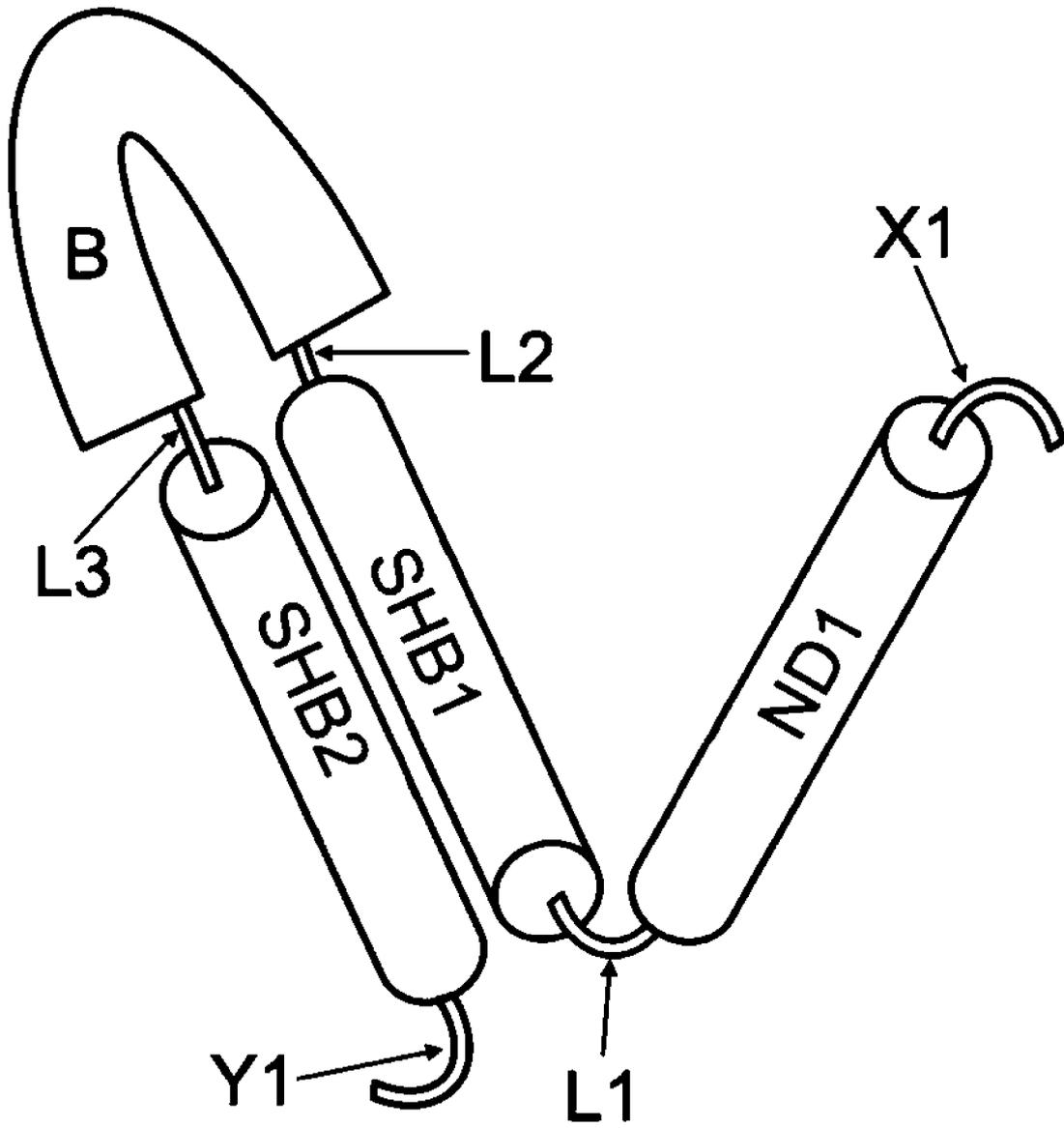
L1, L2 и L3 представляют собой линкеры, которые независимо друг от друга представляют собой пептидную связь или пептидную цепь,

B представляет собой пептид или белок, содержащий петлевую область,

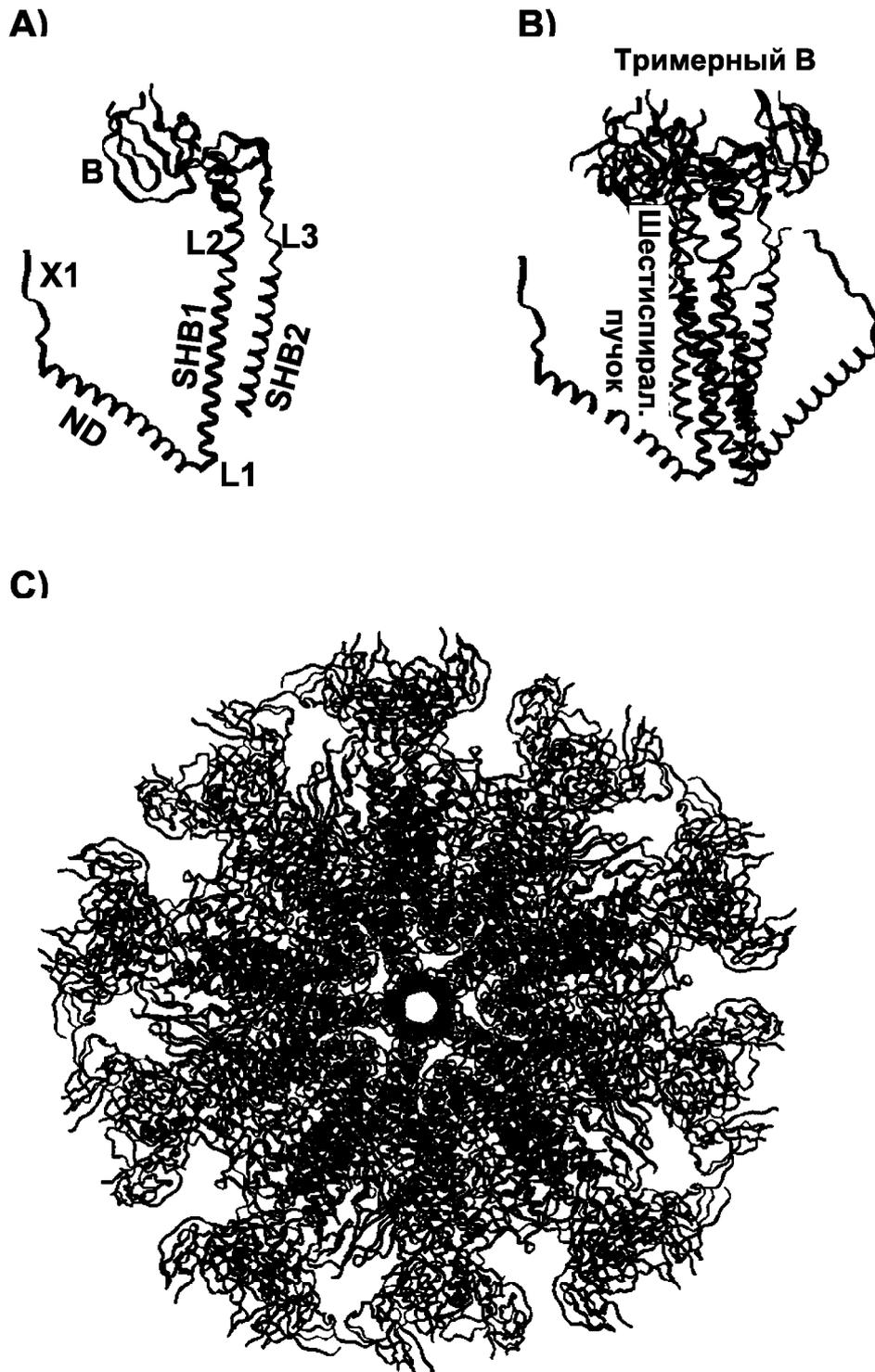
20 X2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены, Y2 отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот, которые могут быть дополнительно замещены.

25 15. Белковая наночастица по любому из пп. 1 – 12 для применения в способе вакцинации человека или животного, отличного от человека, причем указанный способ включает введение эффективного количества указанной белковой наночастицы субъекту, который нуждается в такой вакцинации.

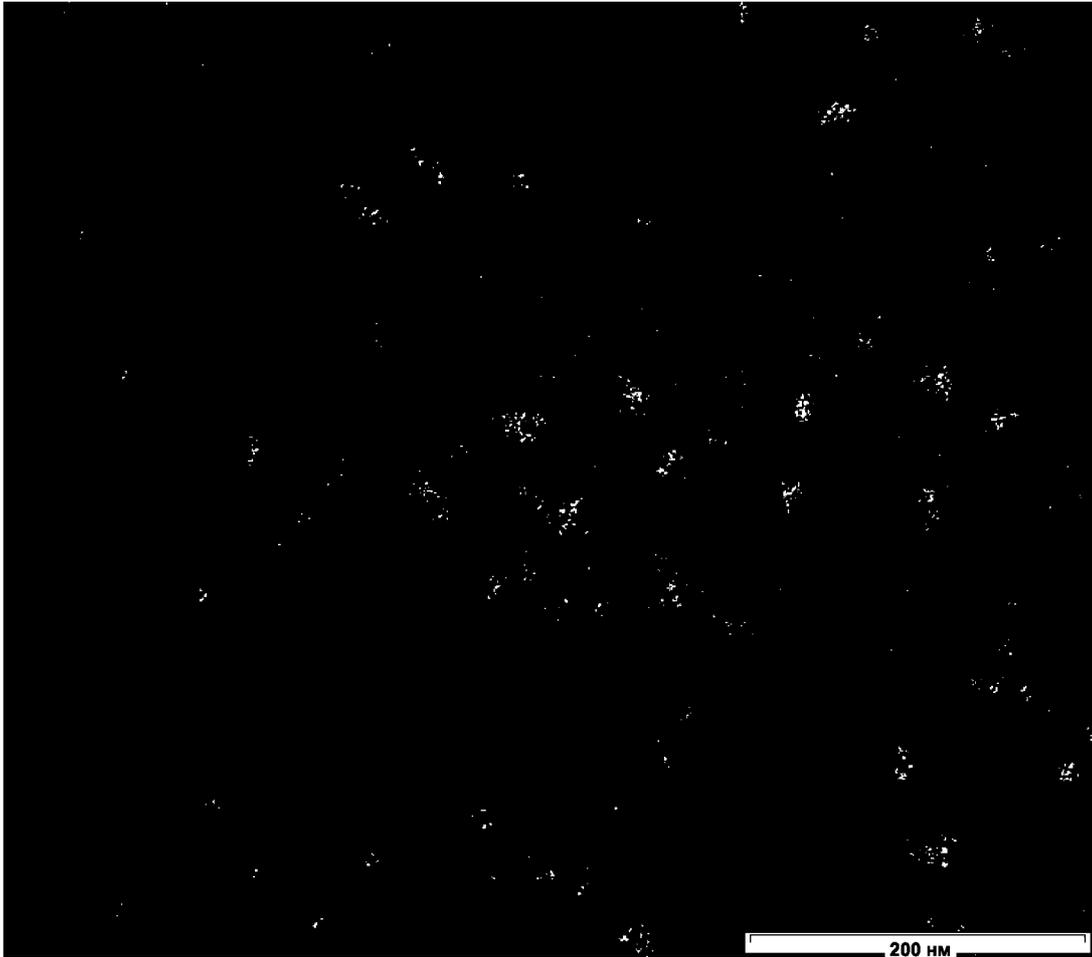
Фигура 1



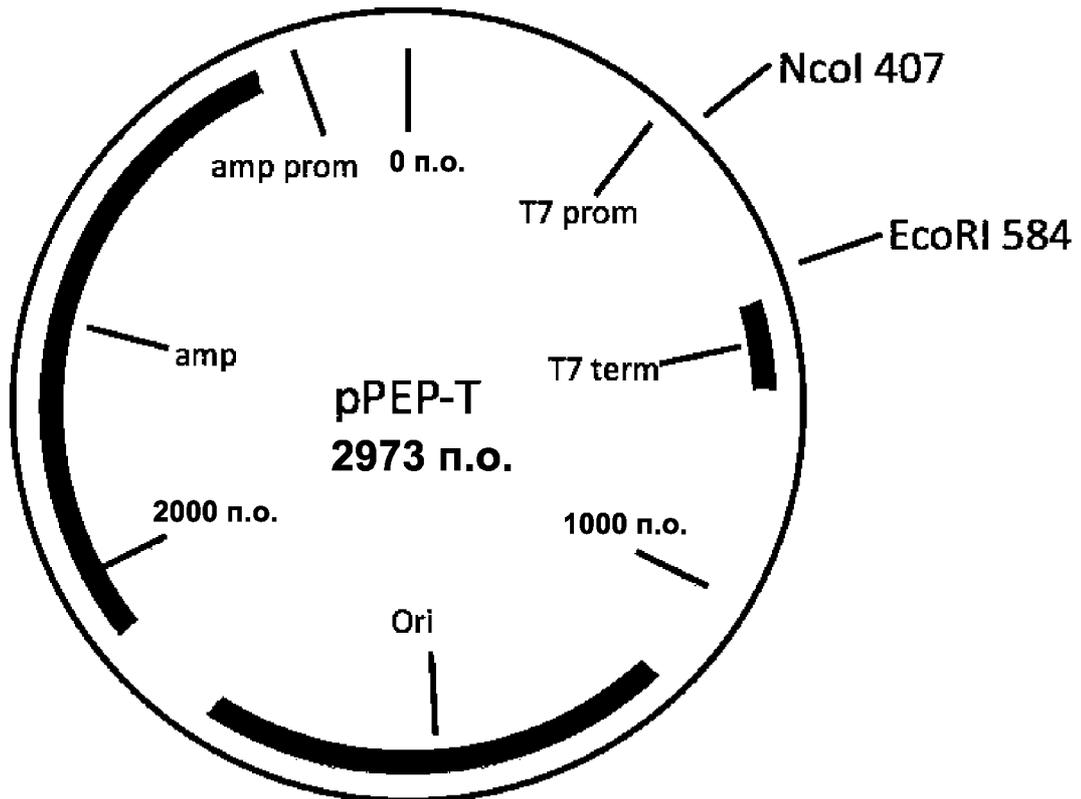
Фигура 2



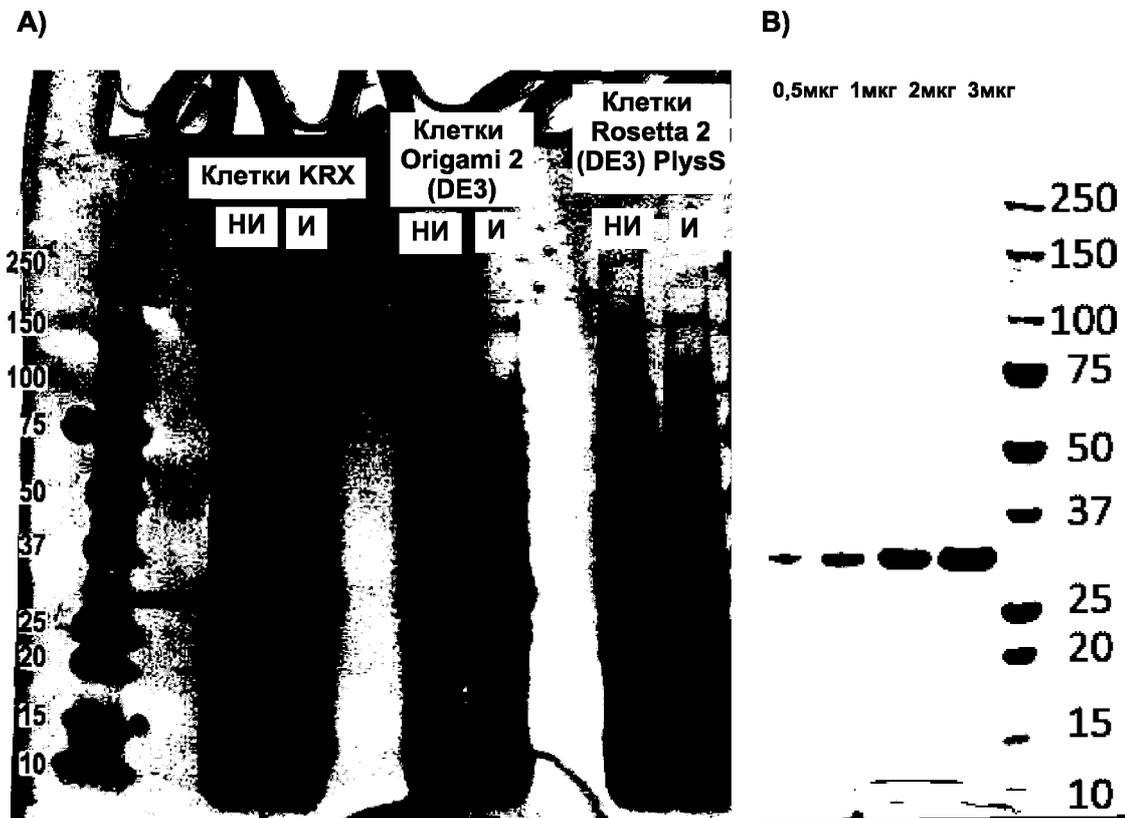
Фигура 3



Фигура 4

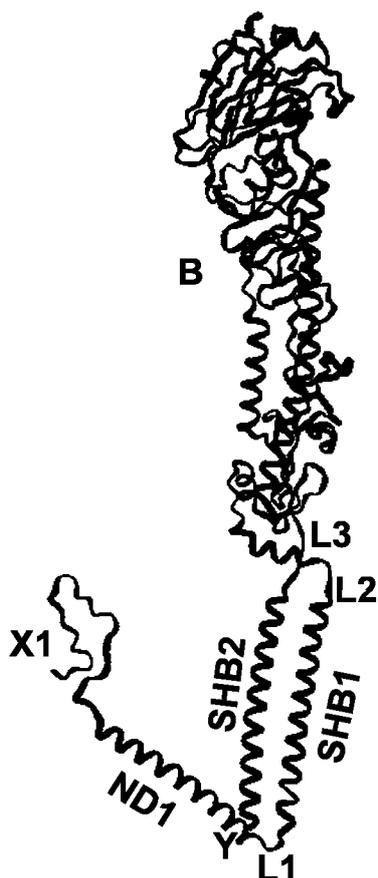


Фигура 5

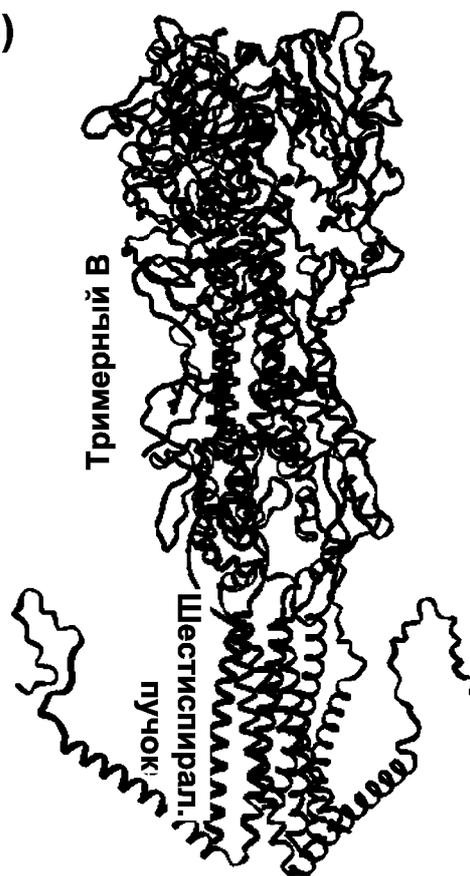


Фигура 6

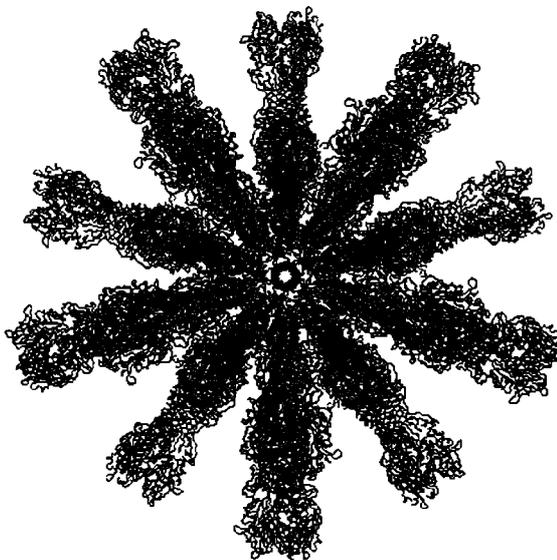
A)

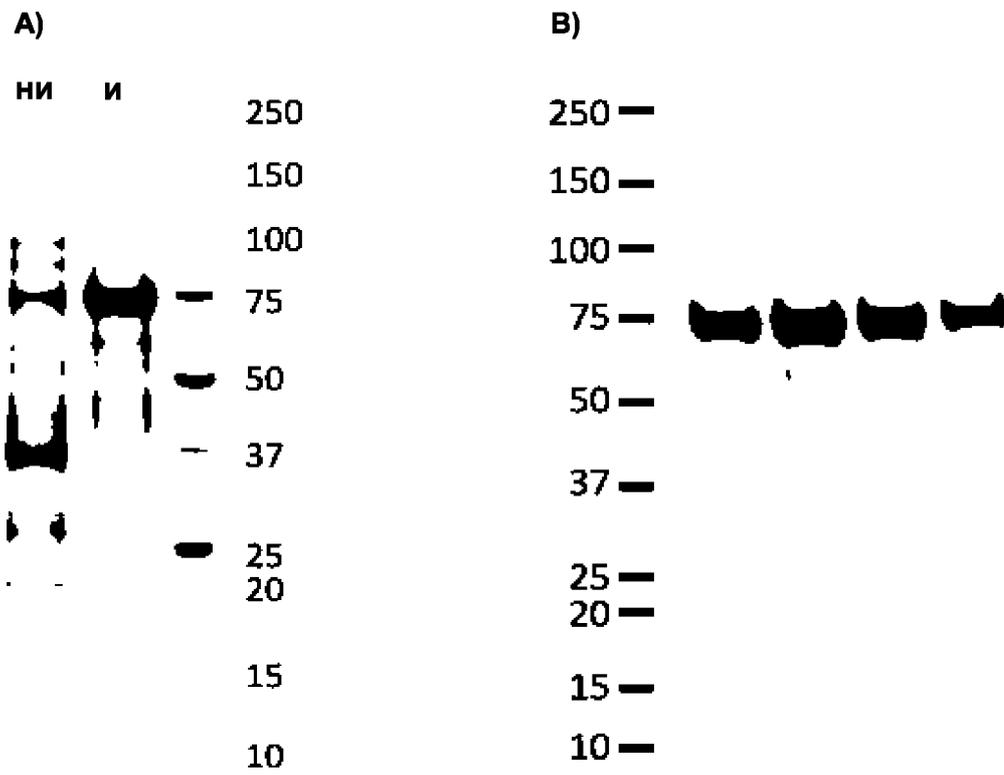


B)

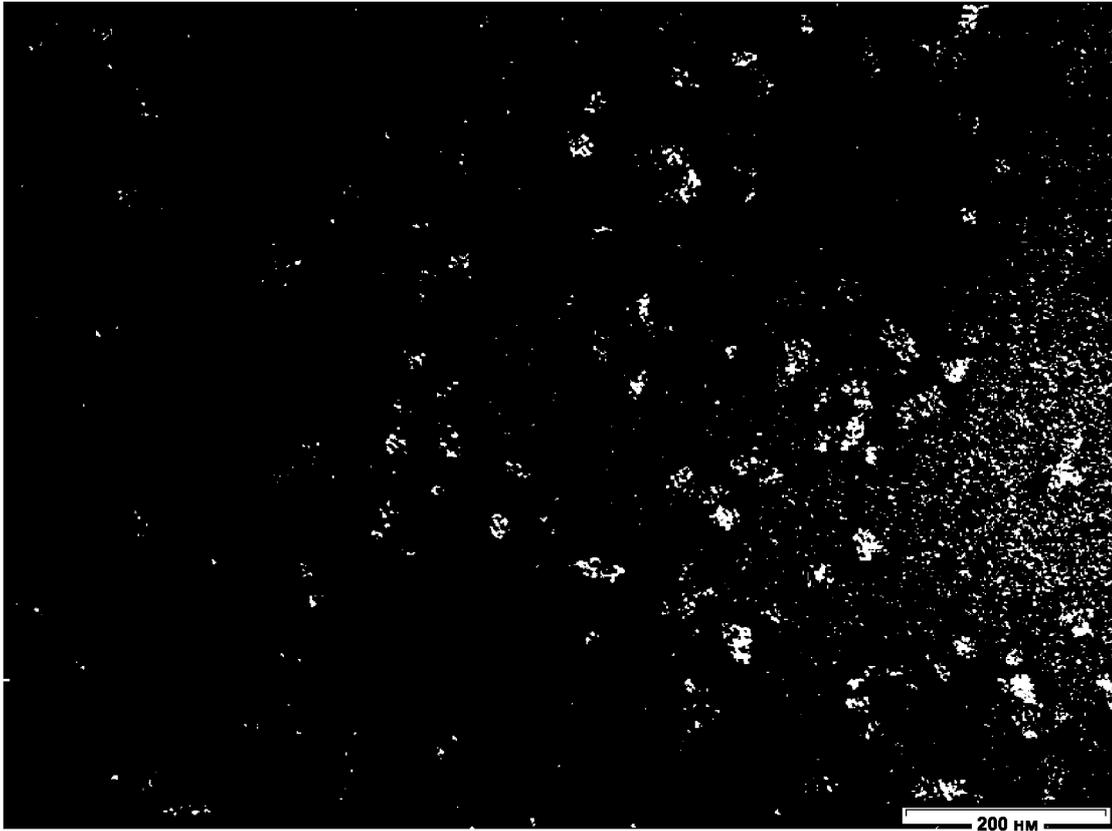


C)

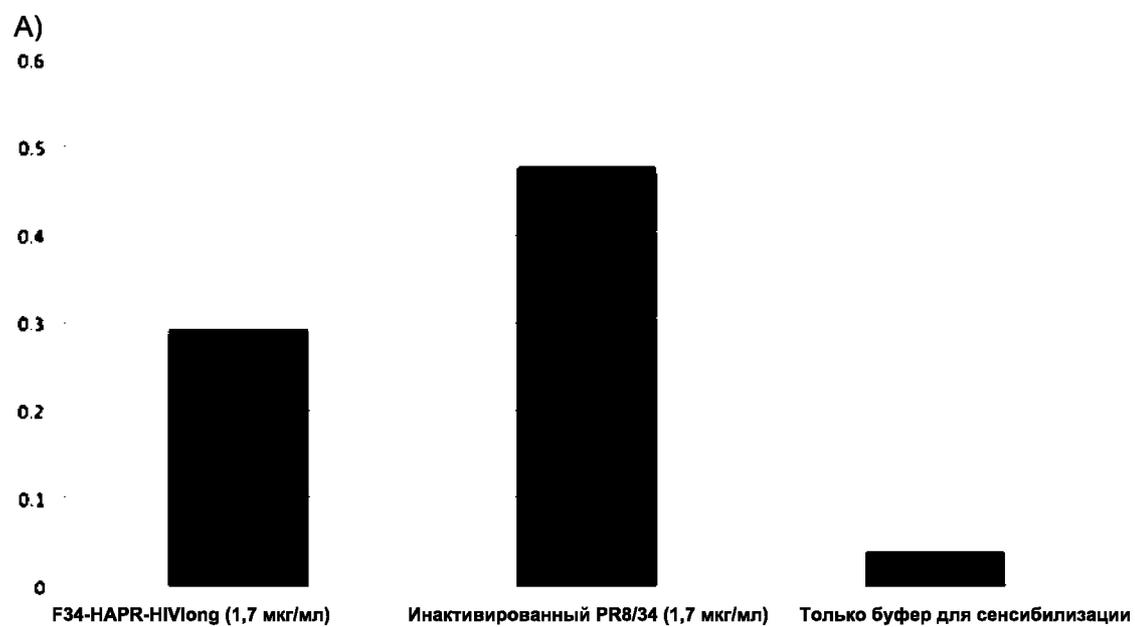


Фигура 7

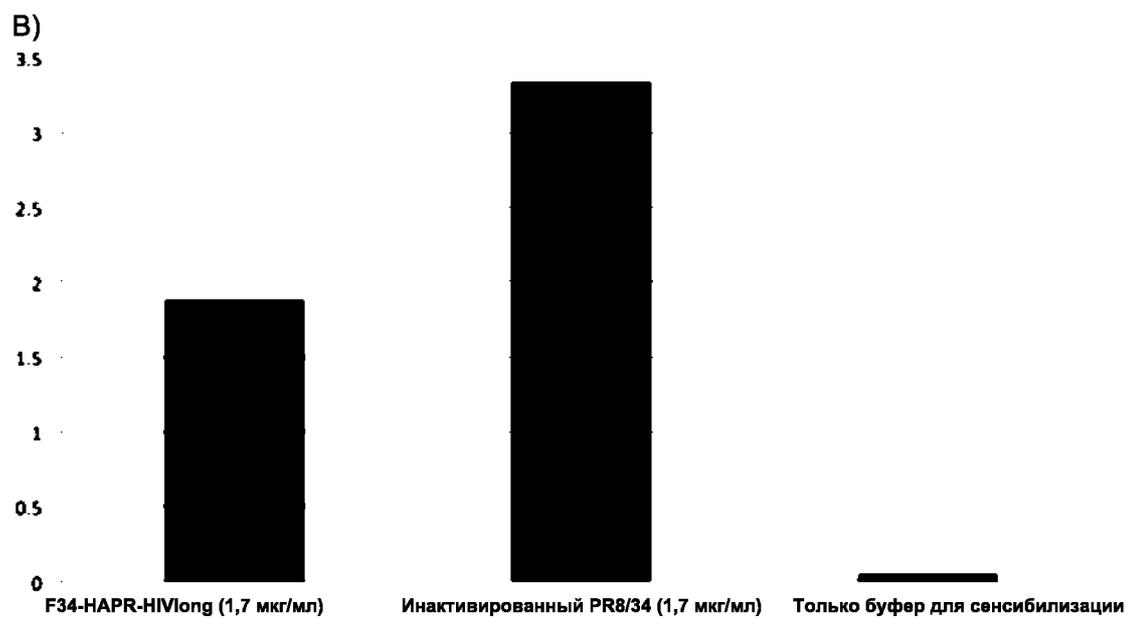
Фигура 8



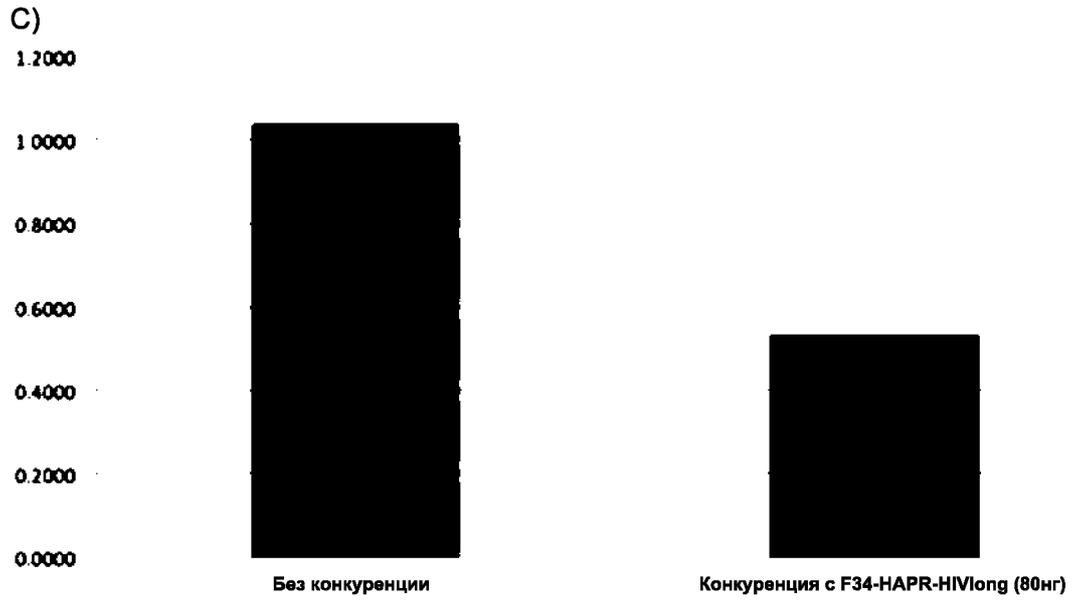
Фигура 9



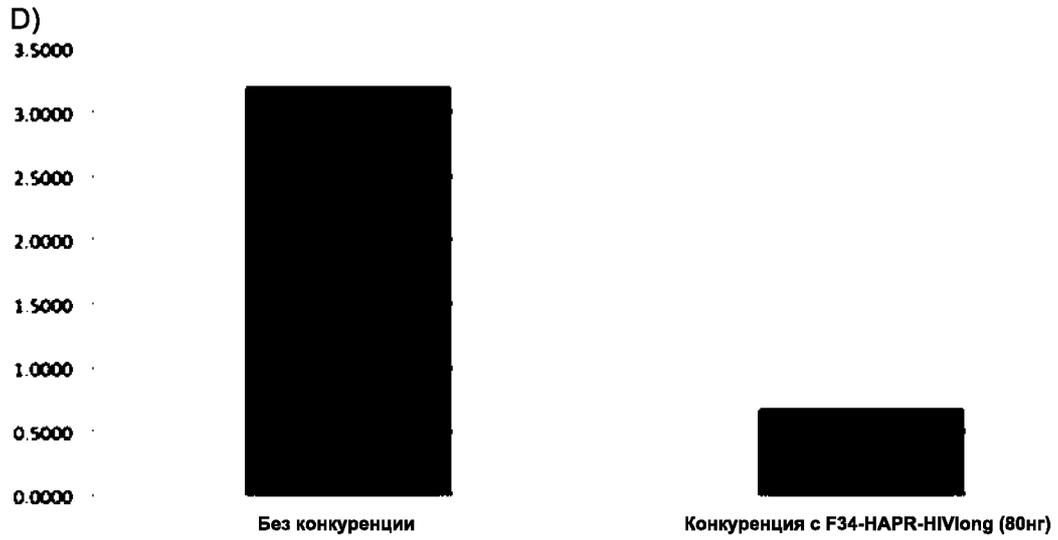
Фигура 9



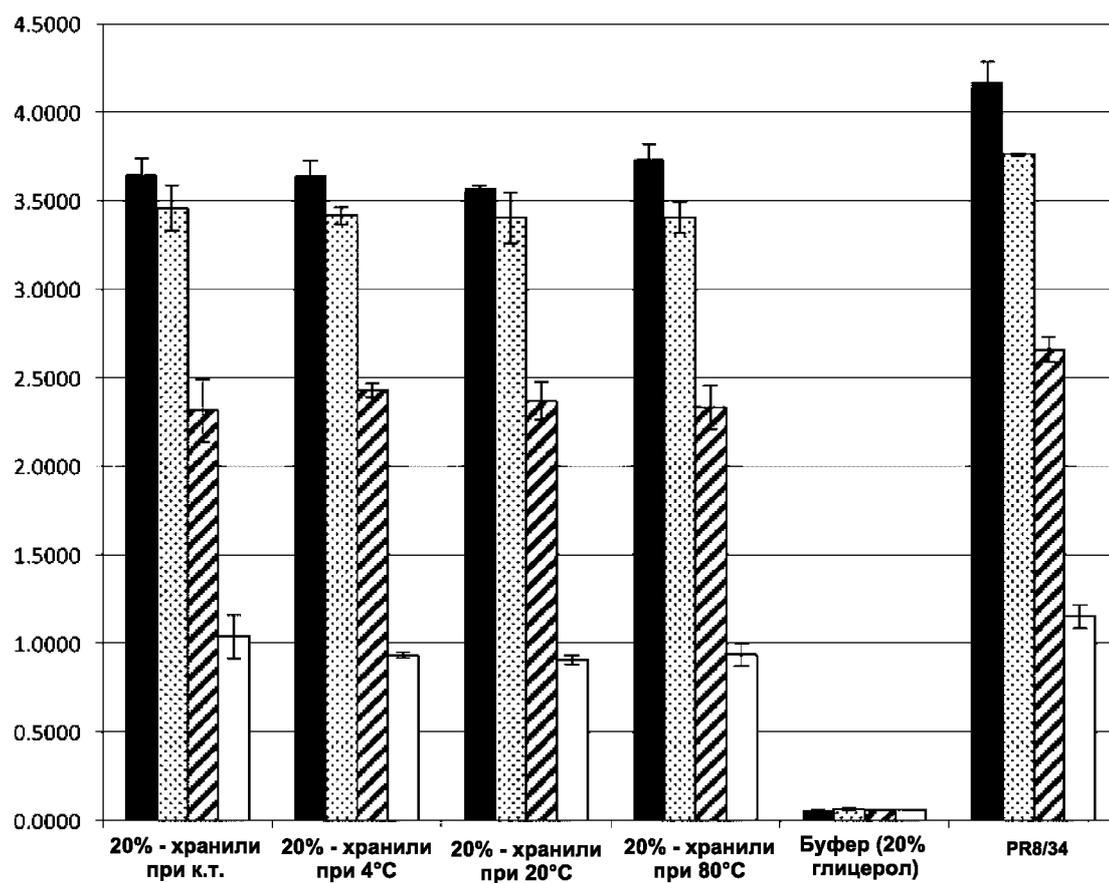
Фигура 9



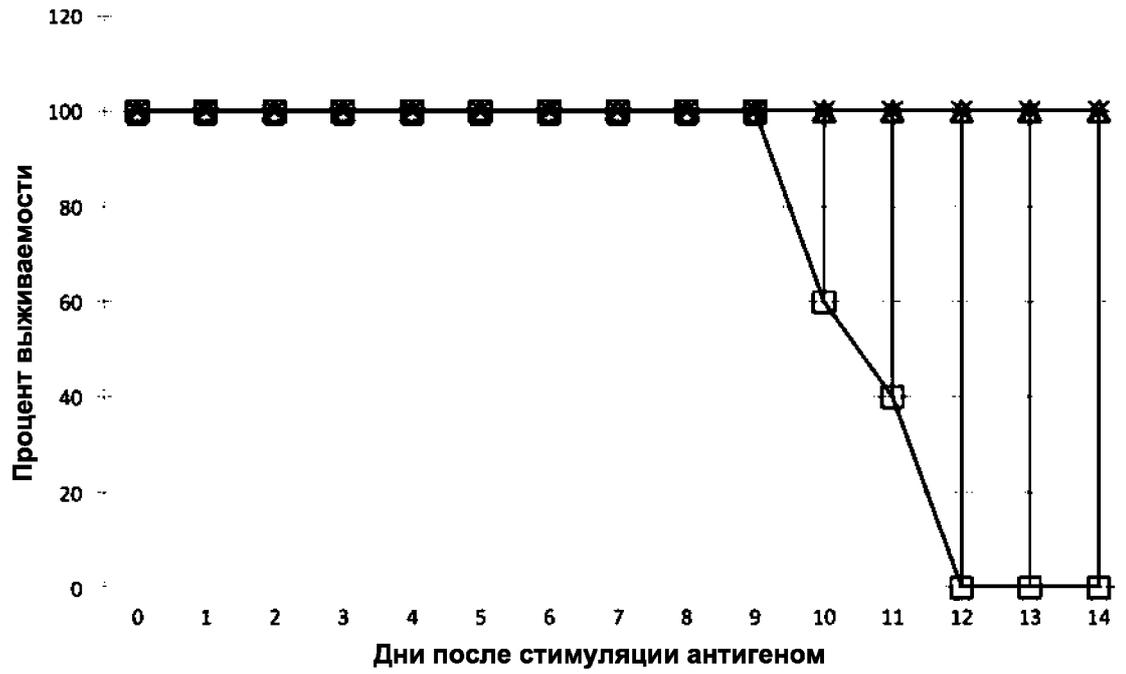
Фигура 9



Фигура 10

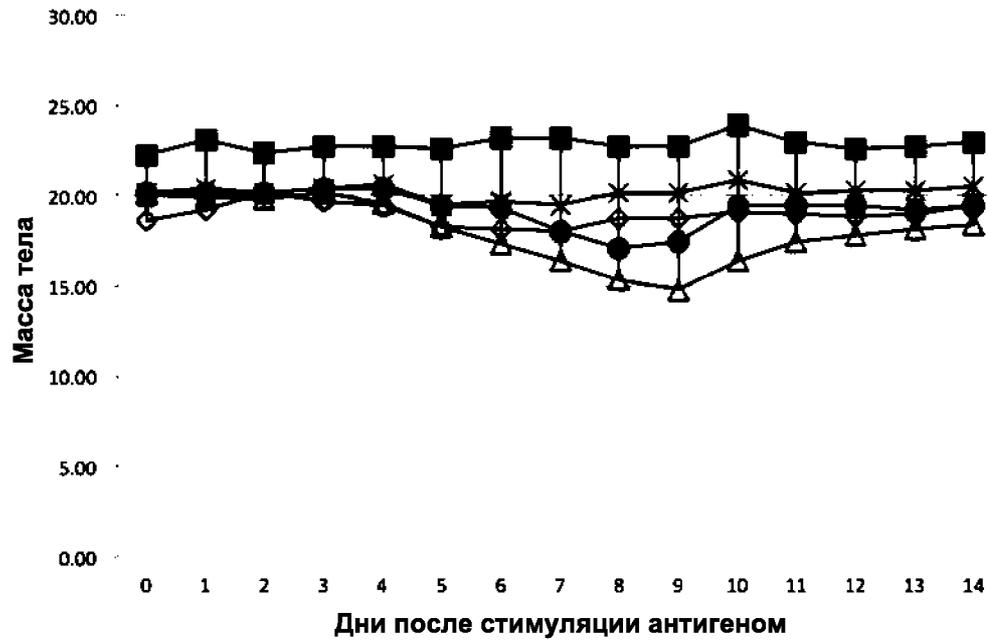


Фигура 11

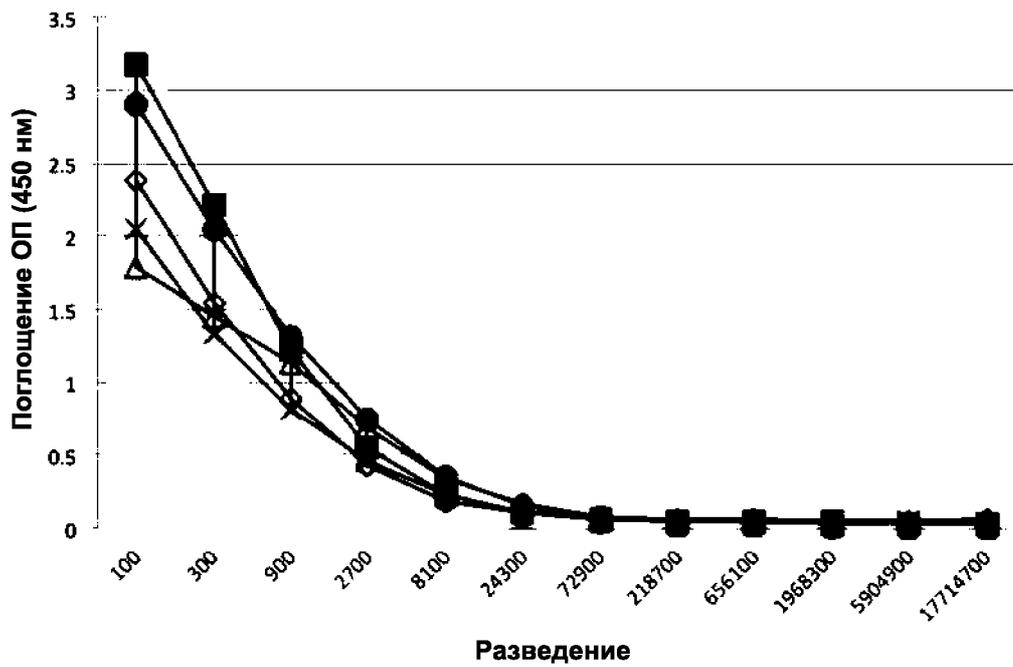


Фигура 12

А)

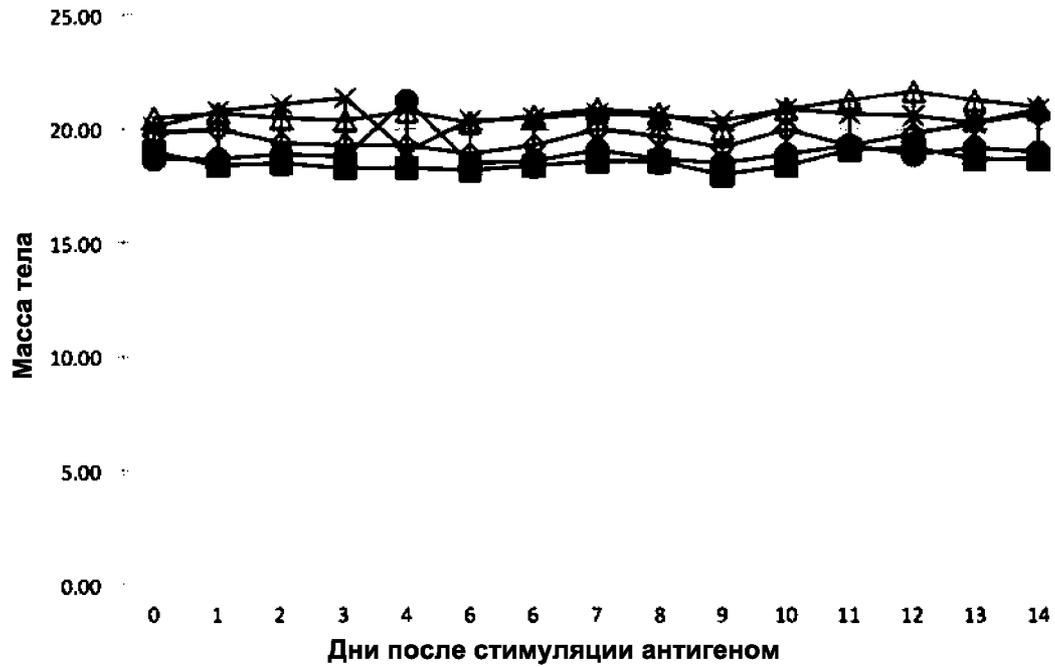


В)

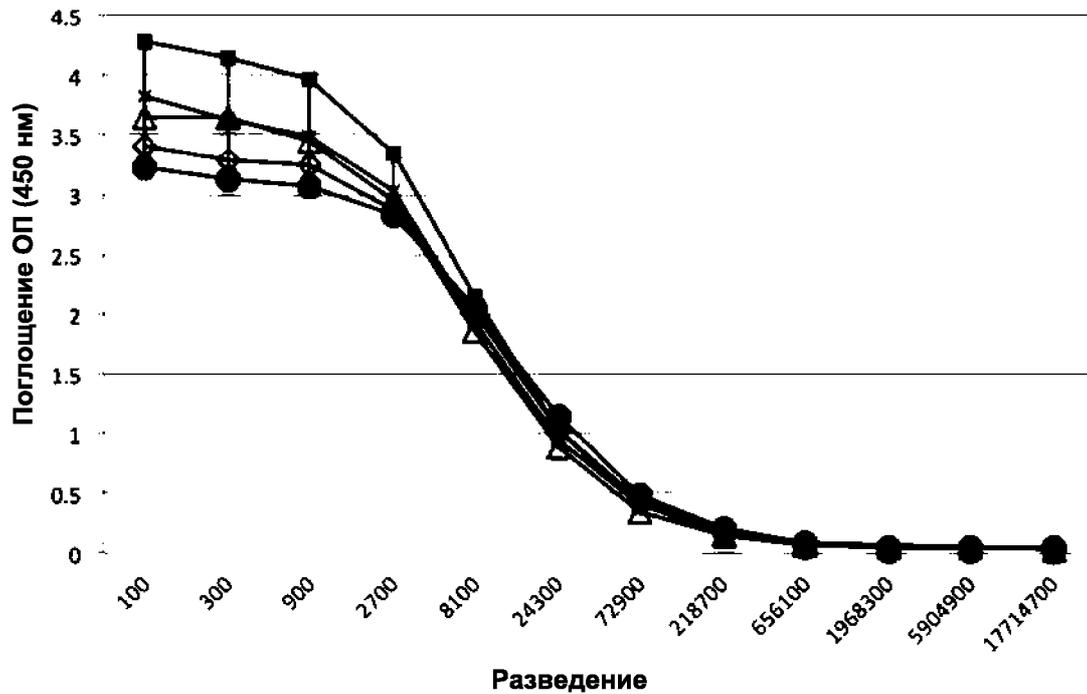


Фигура 13

А)

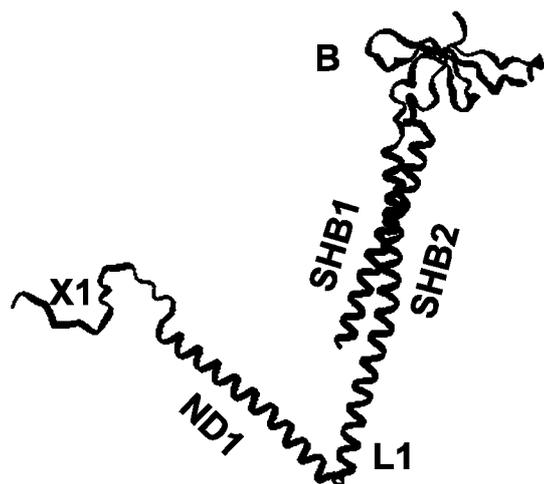


В)

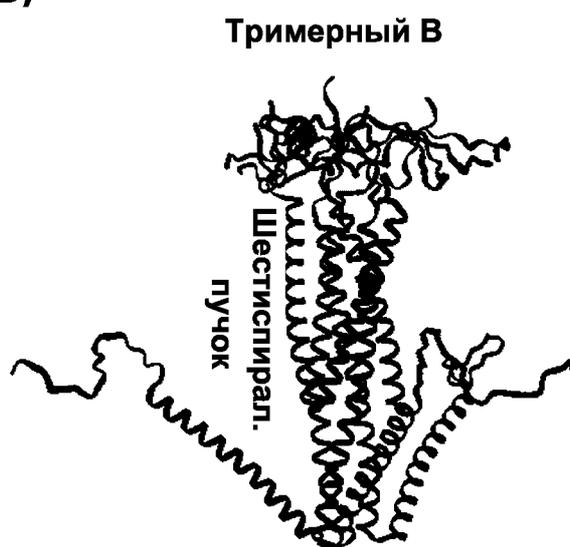


Фигура 14

A)



B)



C)

