

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **019138**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.01.30

(21) Номер заявки
201001820

(22) Дата подачи заявки
2009.06.23

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)
C07K 14/255 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ИММУНОАДЬЮВАНТНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ФЛАГЕЛЛИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 08305327.2

(32) 2008.06.25

(33) EP

(43) 2011.08.30

(86) PCT/EP2009/057836

(87) WO 2009/156405 2009.12.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНСЭРМ (ИНСТИТУТ
НАСИОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЭ Э
ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ);
ИНСТИТУТ ПАСТЕР ДЕ ЛИЛЛЬ
(FR)**

(72) Изобретатель:
Сирар Жан-Клод (FR)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Борисова Е.Н. (RU)

(56) WO-A-2004022092
WO-A-2005107381

A. N. HONKO ET AL.: "Fl age! lin is effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with Yersinia pestis" INFECTION AND IMMUNITY., vol. 74, no. 2, February 2006 (2006-02), pages 1113-1120, XP002504685 US AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON. the whole document

C. NEMPONT ETAL.: "Deletion of flagel Tin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity" JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol. 181, no. 3, August 2008 (2008-08), pages 2036-2043, XP002504697 US THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE. the whole document

(57) Изобретение относится к новым пептидным соединениям, являющимся производными флагеллина, имеющего происхождение из Salmonelle enterica, которые проявляют иммуноадьювантную активность in vivo.

B1

019138

019138 B1

Область изобретения

Изобретение относится к индукции и/или стимуляции иммунного ответа у индивидуума или животного. Оно касается, в частности, новых иммуноадъювантных соединений, полезных для иммуногенных и вакцинных композиций.

Предшествующий уровень техники

Разработка безопасных и эффективных вакцин остается основной целью в мировом здравоохранении.

В частности, появились вакцины, называемые "мукозальными", в качестве привлекательной потенциальной альтернативы инъекционным вакцинам.

Мукозальное введение обладает многими потенциально желательными свойствами. Возможно, наиболее обоснованным доводом для разработки методов доставки мукозальных вакцин является развитие первой линии иммунологической защиты путем создания местного иммунитета в сайте внедрения многих инвазивных агентов в слизистую оболочку.

Кроме того, некоторые исследователи сообщили, что существует общая мукозальная иммунная система, где мукозальный иммунитет, индуцированный в одном сайте, может привести к иммунитету в дистальном мукозальном сайте (McGhee, J. R. et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992, 10:75-88).

Кроме того, доставка антигена через мукозальный сайт также обладает потенциалом генерирования системного иммунного ответа.

Это позволяет предположить, что значительные преимущества могут быть достигнуты благодаря доставке вакцин неинвазивным путем, например интраназальным или другим мукозальным путем, чтобы вызвать иммунитет к широкому ряду патогенов, которые могут внедряться в различные сайты слизистой оболочки.

Большинство современных вакцин (мукозальных или других вакцин) состоит из двух основных компонентов: (1) антигена-мишени, представляющего терапевтический интерес, и (2) иммуноадъювантного соединения(й), которое стимулирует и/или индуцирует иммуногенность против указанного антигена.

Природа известных иммуноадъювантов широко варьирует, но включает, в частности, минеральные масла, бактериальные экстракты, живые и аттенуированные организмы и суспензии алюмогидроксидов металлов.

Даже если адъюванты обеспечивают усиленные иммунные ответы, их применение может также вызвать вредные побочные эффекты, зависящие исключительно от пути их введения. Поэтому число адъювантов, которые одобрены и эффективны у людей, остается относительно ограниченным.

Успехи в области наследственного иммунитета привели к лучшему пониманию как клеточных, так и молекулярных механизмов, управляющих регуляцией иммунного ответа хозяина.

Это лучшее знание иммунной системы дало возможность исследования и разработки новых потенциально полезных иммуноадъювантов.

В частности, toll-подобные рецепторы (TLR) являются инструментами в координированной индукции наследственного и адаптивного иммунитета у млекопитающих. Поскольку TLR экспрессируются широким рядом типов клеток, они способны запускать иммунитет во всем организме.

После инфицирования патогенными микроорганизмами TLR распознают консервативные мотивы, называемые микроорганизм-ассоциированными молекулярными паттернами (MAMP). Вовлеченность TLR индуцирует программу генной экспрессии, направленной как на наследственно-обусловленный клиренс патогенных микроорганизмов, так и на приобретенный иммунитет к ним. Например, TLR индуцируют продуцирование хемокинов, которые, в свою очередь, специфично привлекают полиморфноядерные нейтрофилы (ПМН), непосредственно вовлеченные в наследственно-обусловленный клиренс микроорганизмов. Кроме того, TLR стимулируют секрецию плейотропных иммунных медиаторов (таких как TNF α) и функциональное созревание дендритных клеток (ДК), которые специализированы на презентацию антигенов лимфоцитам.

Следовательно, агонисты TLR не только стимулируют провоспалительные иммунные ответы "широкой специфичности", но также усиливают адаптивный иммунный ответ на определенные антигены, и поэтому их считают иммуноадъювантами.

Несмотря на эти потенциально полезные эффекты, системная токсичность MAMP вызвала попытки разработать производные, которые сдвигают активность MAMP в направлении адъювантной способности. Действительно, конструирование молекул с уникальными свойствами является основным направлением в манипуляции иммунными ответами.

Бактериальные флагеллины (основные компоненты жгутиков во многих бактериальных патогенах) являются специфичными уникальными агонистами для активации TLR5.

Флагеллин FNC из *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) является парадигмой для исследований по структуре и функции флагеллинов, иммунитету и передаче сигнала TLR5.

Он представляет собой 494-аминокислотный белок с двумя отдельными доменами. Амино- и карбоксиконцевые "консервативные" области образуют домен, который существует для активации TLR5.

Средний домен флагеллина FNC содержит аминокислоты, не обязательные для передачи сигнала TLR5. Он предназначен в качестве "гипервариабельной" области, поскольку первичные последовательности значительно варьируют по составу и размеру от одного вида бактерий к другому. Напротив, известно, что гипервариабельная область существенна для антигенности флагеллина.

Показано, что внутривенная (в.в.) инъекция флагеллинов стимулирует системный ответ, характеризующийся продуцированием провоспалительных медиаторов (таких как TNF α или IL-6) и активацией ДК.

Кроме того, флагеллины запускают специфичные для слизистой оболочки наследственно-обусловленные и адаптивные защитные механизмы. Например, эпителиальные клеточные линии и слизистая оболочка легкого осуществляют позитивную регуляцию продуцирования хемокинов, таких как CXCL8 (IL-8) и CCL20, которые, в свою очередь, рекрутируют ПМН и ДК слизистой оболочки соответственно.

Разные авторы также сообщали, что флагеллины являются сильными системными и мукозальными иммуноадьювантами, которые вызывают (1) ответы сывороточных и/или секреторных антител и (2) клеточные ответы Th1 и Th2 как на сами флагеллины, так и на совместно введенные антигены.

Вследствие своих сильных системных и мукозальных иммуноадьювантных активностей флагеллины могут представлять особый интерес для разработки вакцины и, в частности, вакцины мукозального типа.

Однако большинство указанных адьювантов флагеллинового типа не полностью подходит для применения в таких вакцинах, и, в частности, для стратегии указанных мукозальных вакцин.

Действительно, известные флагеллиновые адьюванты проявляют значительные побочные эффекты, и, в частности, собственную антигенную активность и системные провоспалительные свойства при введении *in vivo*.

Кроме того, большинство известных флагеллиновых иммуноадьювантов необходимо физически сшивать с антигеном-мишенью, чтобы вызвать сильный иммунный ответ при введении *in vivo*. Это требование обязывает к дополнительным сложным манипуляциям для получения подходящей связи флагеллин-антиген и конечного полезного иммуногенного вещества.

Таким образом, существует необходимость в новых соединениях, которые можно было бы использовать в качестве иммунологических адьювантов, в частности, для индукции и/или для усиления мукозального иммунного ответа против антигена, исключительно без запуска какого-либо значительного системного воспалительного побочного эффекта.

Эти новые соединения также предпочтительно должны обладать способностью к запуску иммунного ответа посредством простого смешения с антигеном-мишенью.

В настоящем изобретении, таким образом, предложены новые иммуноадьювантные соединения, которые удовлетворяют эту потребность, и которые могут быть особенно полезны для получения иммуногенных композиций и вакцины (в частности, мукозального типа).

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно данному изобретению обнаружены новые пептидные соединения, являющиеся производными флагеллина, имеющего происхождение из *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, типа SEQ ID NO:1, которые проявляют иммуноадьювантную активность *in vivo*, как проиллюстрировано в примерах, приведенных в данной заявке.

Согласно настоящему изобретению также показано, что эти новые адьювантные соединения проявляют, в частности, свойства мукозальных адьювантов, не оказывающих значительных системных провоспалительных эффектов.

Указанные новые соединения по изобретению, являющиеся производными флагеллина, следовательно, особенно полезны в качестве иммуноадьювантных веществ, преимущественно для индукции и/или для усиления мукозального иммунного ответа.

Таким образом, настоящее изобретение относится к иммуноадьювантному соединению, включающему:

а) N-концевой пептид, обладающий по меньшей мере 90% аминокислотной идентичностью с аминокислотной последовательностью, начинающейся с аминокислотного остатка, локализованного в положении 1 SEQ ID NO:1, и оканчивающейся аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из любого из аминокислотных остатков, локализованных в положениях 99-173 SEQ ID NO:1; и

б) С-концевой пептид, обладающий по меньшей мере 90% аминокислотной идентичностью с аминокислотной последовательностью, начинающейся с аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из любого из аминокислотных остатков, локализованных в положениях 401-406 SEQ ID NO:1, и оканчивающейся аминокислотным остатком, локализованным в положении 494 SEQ ID NO:1,

где указанные N-концевой и С-концевой пептиды непосредственно связаны друг с другом или указанные N-концевой и С-концевой пептиды связаны друг с другом опосредованно через спейсерную цепь.

Предпочтительные воплощения иммуноадьювантного соединения по изобретению определены в описании ниже.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей иммуноадьювантное

соединение, как оно определено выше (или в последующем описании), вместе с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым эксципиентом.

Фармацевтическая композиция по изобретению содержит иммуноадьювантное соединение, как оно определено выше, вместе с одним или более чем одним антигеном.

Указанная фармацевтическая композиция, таким образом, преимущественно является иммуногенной композицией (то есть композицией, которая направлена на индукцию иммунного ответа против антигена, например, для выработки антител) или вакцинной композицией (то есть композицией, которая направлена на индукцию иммунного ответа у субъекта или животного с целью лечения или предупреждения заболевания).

В соответствии с предпочтительным воплощением указанная иммуногенная композиция или указанная вакцина преимущественно содержит указанное иммуноадьювантное соединение по изобретению, которое нековалентно связано с одним или более чем одним указанным антигеном.

Настоящее изобретение также относится к иммуноадьювантному соединению, как оно определено выше, для применения в качестве лекарственного средства (в частности, для индукции и/или для усиления мукозальной адьювантной активности).

Данное изобретение также относится к применению иммуноадьювантного соединения в соответствии с изобретением для изготовления фармацевтической композиции, в частности, для индукции и/или для усиления иммунного ответа против одного или более чем одного антигена, отличного от белка флагеллина (в частности, в мукозальном компартменте после введения мукозальным путем).

Данное изобретение также относится к (1) нуклеиновой кислоте, кодирующей иммуноадьювантное пептидное соединение, как раскрыто выше, (2) рекомбинантному вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, встроенную в него, (3) клетке-хозяину, трансфицированной или трансформированной указанной нуклеиновой кислотой или указанным рекомбинантным вектором.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Характеристики и перекрестная реактивность флагеллинов с делетированной гипервариабельной областью.

(А) Схематическое 3D изображение рекомбинантных флагеллинов.

Структура флагеллина FliC дикого типа представлена на левой панели с использованием Pymol (<http://www.pymol.org>). В мономере концевые области (1-170 и 400-494) плотно уложены в виде оспиралей и образуют структурный домен, вовлеченный в функцию жгутика. Мотив 89-96 (показан черным цветом) является существенным для передачи сигнала TLR5. "Гипервариабельный" домен FliC в основном состоит из β -структур и β -витков. С использованием программы Swiss-Model (<http://www.expasy.org/spdbv/>) общая структура была предсказана для FliC _{Δ 204-292} и FliC _{Δ 174-400}, показывая частичную и полную делецию гипервариабельной области соответственно. Для FliC _{Δ 191-352} положения аминокислот, очерчивающих делецию, показаны на левой панели. FliC _{Δ 174-400} и FliC _{Δ 191-352} содержат линкеры GAAG и LELE на стыке делеции соответственно.

(В, С) Перекрестная реактивность FliC-специфичных сывороток.

Гипериммунные сыворотки были получены после подкожного (п.к.) введения флагеллина, включенного в препарат с CFA для примирования с последующими бустер-инъекциями IFA. Сыворотку титровали в ELISA (твердофазном иммуоферментном анализе) на FliC, FliC _{Δ 204-292}, FliC _{Δ 191-352} и FliC _{Δ 174-400}. Результаты являются репрезентативными для 2 экспериментов. (В) Перекрестная реактивность сыворотки анти-FliC. (С) Перекрестная реактивность сыворотки анти-FliC _{Δ 174-400}.

Статистическая значимость ($p > 0,05$ в критерии Манна-Уитни) указана звездочкой.

Фиг. 2. Эпителиальная и мукозальная провоспалительная активность флагеллинов с делетированной гипервариабельной областью.

(А, В) Активация эпителиальных клеток рекомбинантными флагеллинами.

Эпителиальные клетки человека активировали флагеллинами FliC, FliC _{Δ 204-292}, FliC _{Δ 191-352}, FliC _{Δ 174-400} или FliC _{Δ 174-400/89-96*} в указанных концентрациях. Клетки Caco-Rumbo, несущие репортерный слитый ген CCL20-luc, активировали в течение 6 ч и активность люциферазы нормализовали по максимальной активности, измеренной с насыщающими уровнями FliC (А). Бронхиальные эпителиальные клетки BEAS-2B стимулировали в течение 16 ч, после чего измеряли уровни IL-8 в надосадочной жидкости. Результаты являются репрезентативными для 1 из 2 независимых экспериментов (В).

(С, D) Стимуляция мукозального наследственно-обусловленного ответа делетированными флагеллинами.

Рекомбинантные флагеллины или препараты, обработанные трипсином (1 мкг-эквивалент), вводили интраназально (и.н.) анестезированным мышам ($n=3-5$). Через 2 ч определяли уровни CCL20-специфичной мРНК в целых легких, используя количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (кОТ-ПЦР) в реальном времени (С). Через шесть часов после инстилляций брали образцы бронхоальвеолярных лаважей (BAL) (черные столбики) и легких (незакрашенные столбики) для измерения концентрации CCL20 (D).

Статистическую значимость ($p > 0,05$) определяли по критерию Манна-Уитни.

Фиг. 3. Адьювантный эффект флагеллинов с делецией гипервариабельной области.

Мышей (n=8) иммунизировали и.н. овальбумином (OVA) ± флагеллины или холерный токсин (СТ) на сутки 1 и 21. На сутки 35 измеряли титры OVA-специфичного IgG в сыворотке (А) и BAL (В). Определяли концентрацию OVA-специфичного IgA в BAL (С). Результаты являются репрезентативными для 1 из 2 независимых экспериментов. Статистическую значимость (p>0,05) определяли по критерию Манна-Уитни.

Фиг. 4. Собственные антигенные свойства флагеллинов без гипервариабельной области.

Мышей (n=8) иммунизировали и.н. овальбумином (OVA) ± флагеллины или холерный токсин (СТ) или липополисахаридами (LPS) на сутки 1 и 21. На сутки 35 измеряли титры FliC-специфичного IgG в сыворотке (А) и BAL (В). Результаты являются репрезентативными для 1 из 2 независимых экспериментов.

Статистическую значимость (p>0,05) определяли по критерию Манна-Уитни.

Фиг. 5. Нейтрализация передачи сигнала TLR5 флагеллин-специфичными антителами.

Мышей NMRI иммунизировали п.к. в первую неделю 1 мкг флагеллина FliC и CFA с последующими бустер-инъекциями FNC и IFA в недели 3, 5, 7. В контрольных условиях животных подобным образом обрабатывали овальбумином и адьювантами или одними адьювантами. Эксперименты проводили в неделю 9.

(А) TLR5-нейтрализующая активность флагеллин-специфичной иммунной сыворотки *in vitro*.

Эпителиальные клетки Caco-Rumbo, несущие репортерную конструкцию CCL20-luc, активировали в течение 6 ч флагеллином FliC, инкубировали с 50% об./об. FliC гипериммунными (незакрашенные кружки) или контрольными (черные кружки). Активность люциферазы определяли и нормализовали по активности, полученной с 100 нг/мл FliC. Результаты являются репрезентативными для 1 из 3 независимых экспериментов.

(В,С) TLR5-нейтрализующая активность флагеллин-специфичной иммунной сыворотки *in vivo*.

Иммунизированным животным (n=3) инъецировали в.в. забуференный фосфатом солевой раствор (PBS) (черные столбики) либо 0,1 мкг (серые столбики) или 1 мкг флагеллина FliC (незакрашенные столбики). Сыворотки собирали через 2 ч и определяли концентрации CCL20 (В) и CXCL2 (С) путем ELISA.

(D) Нейтрализующая активность иммунной сыворотки.

Животным (n=3 на дозу) пассивно переносили в.в. различные количества флагеллин-специфичной или контрольной сыворотки и через 1 ч их обрабатывали в.в. рекомбинантными флагеллинами, как указано. Продуцирование хемокинов в сыворотке через 2 ч после провокации измеряли путем ELISA.

Статистическую значимость (p>0,05) определяли, используя критерий Манна-Уитни.

Фиг. 6. Интраназальная активность доза-ответ флагеллинов FliC и FliC_{Δ174-400}.

Мышам (n=3-5) вливали и.н. различные количества флагеллинов FliC (черные квадраты) или FliC_{Δ174-400} (незакрашенные квадраты). Концентрации CCL20 (А) и CXCL2 (В) определяли через 6 ч в BAL, используя ELISA.

Статистическую значимость (p>0,05) определяли по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 7. Изменение способности к системной активации флагеллина FliC_{Δ174-400} с делегированной гипервариабельной областью.

Различные количества флагеллина FliC (черные квадраты) или FliC_{Δ174-400} (незакрашенные квадраты) вводили в.в. Концентрации CCL20 (А) и CXCL2 (В) определяли через 2 ч в сыворотке, используя ELISA.

Статистическую значимость (p>0,05) определяли по критерию Манна-Уитни.

Фиг. 8. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) на различных рекомбинантных флагеллинах с делегированной гипервариабельной областью.

Фиг. 8 состоит из фотографии электрофореза в ДСН-ПААГ продуцируемых рекомбинантным путем FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, FliC_{Δ138-405} и FliC_{Δ100-405} после окрашивания Кумасси синим.

Фиг. 9. Иммуноблоттинг различных рекомбинантных флагеллинов с делегированной гипервариабельной областью.

Фиг. 9 состоит из фотографии Вестерн-блот электрофореза продуцируемых рекомбинантным путем FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, FliC_{Δ138-405} и FliC_{Δ100-405} после окрашивания антителами анти-FliC.

Фиг. 10. Индукция продуцирования хемокина CCL20 различными рекомбинантными флагеллинами с делегированной гипервариабельной областью.

Стимуляция системного наследственно-обусловленного ответа делегированными флагеллинами.

Рекомбинантные флагеллины или препараты, обработанные трипсином (10 мкг-эквивалентов), вводили внутрибрюшинно (в.б.) мышам (n=2). Через два часа после инъекции брали образцы сыворотки для измерения концентрации CCL20.

Фиг. 11. Индукция продуцирования хемокина CXCL2 различными рекомбинантными флагеллинами с делегированной гипервариабельной областью.

Стимуляция системного наследственно-обусловленного ответа делегированными флагеллинами.

Рекомбинантные флагеллины или препараты, обработанные трипсином (10 мкг-эквивалентов), вво-

дили в.б. мышам (n=2). Через два часа после инъекции брали образцы сыворотки для измерения концентрации CXCL2.

Фиг. 12. Адъювантный эффект рекомбинантного FliC_{Δ174-400} для иммунизации против антигена gp140 из вируса ВИЧ.

Мышей (n=6) иммунизировали и.н. gp140 (5 мкг) ± флагеллины (1 мкг) на сутки 1 и 21.

На сутки 35 титры gpP140-специфичного IgG измеряли в сыворотке (закрашенные символы) и BAL (незакрашенные символы). Результаты являются репрезентативными для 1 из 2 независимых экспериментов.

Фиг. 13. Хроматографическая характеристика при 280 нм цикла очистки FliC на иммуноаффинном субстрате, на котором иммобилизованы мышинные моноклональные антитела анти-FliC_{Δ174-400}.

Фиг. 14. Электрофоретический анализ различных хроматографических фракций, собранных во время цикла очистки FliC на иммуноаффинном субстрате, на котором иммобилизованы мышинные моноклональные антитела анти-FliC_{Δ174-400}.

Фиг. 14 состоит из фотографии электрофореза в ДСН-ПААГ фракций, собранных, как изображено на фиг. 13, после окрашивания Кумасси синим.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению показано, что новые соединения индуцируют *in vivo* мукозальную иммуноадъювантную активность, дающую возможность индукции иммунного ответа против антигена-мишени, когда указанные новые соединения вводят с подходящим соответствующим антигеном(ами).

Конкретно в данной заявке показано, что новые адъювантные соединения по изобретению проявляют свои иммуноадъювантные свойства также после интраназального введения мышам. Указанные иммуноадъювантные соединения по изобретению, таким образом, способны потенцировать системный и мукозальный иммунный ответ.

Также продемонстрировано, что указанное иммуноадъювантное соединение по изобретению, являющееся производным флагеллина, обладает TLR5-опосредованными свойствами мукозального адъюванта с провоспалительным эффектом *in vivo* в слизистой оболочке, но не проявляет никакого значительного системного провоспалительного побочного эффекта после системной инъекции.

Кроме того, результаты, содержащиеся в приведенных в данной заявке примерах, показывают, что указанное иммуноадъювантное соединение, являющееся производным флагеллина, не проявляет значительного собственного антигенного эффекта, то есть интересующая молекула предотвращает или ослабляет эффективность запуска флагеллин-специфичных антител, а именно в сыворотке или бронхоальвеолярном лаваже (BAL) при введении интраназальным путем.

Вышеописанные результаты показывают, что указанное иммуноадъювантное соединение по изобретению, являющееся производным флагеллина, можно применять в качестве эффективного адъюванта иммунного ответа, в частности, для индукции мукозальных иммунных ответов.

Указанное пептидное соединение, таким образом, может быть полезно, в частности, когда оно содержится в (1) мукозальных вакцинных композициях для предупреждения или для лечения заболеваний посредством индукции мукозального иммунного ответа в организме субъекта или (2) иммуногенной композиции для усиления или запуска иммунного ответа против желаемого антигена.

В частности, как показано в приведенных здесь примерах, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что передача сигнала TLR5 компартиментализована, поскольку новый конкретный флагеллин FliC_{Δ174-400} (то есть пептид, являющийся производным флагеллина, где пептидная последовательность SEQ ID NO:1 флагеллина FliC Salmonella enterica серовар. Typhimurium ATCC14028 делегирована от положения 174 до положения 400) стимулирует иммунитет в слизистой оболочке, но лишен какого-либо значительного системного провоспалительного эффекта.

Авторы изобретения также установили, что флагеллин FliC_{Δ174-400} обладает выраженными полезными свойствами вследствие его слабой способности генерировать нейтрализующие FliC-специфичные антитела.

Кроме того, в данном изобретении обнаружено, что флагеллин FliC_{Δ174-400} сильно аттенуирован для системной передачи сигнала по сравнению с флагеллином дикого типа, тогда как мукозальная активность остается неизменной.

В данном изобретении также показано, что другие флагеллины с делетированной гипервариабельной областью, включая FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405}, наделены иммуноадъювантными свойствами.

Имуноадъювантные пептиды по изобретению

Эти обнаружения позволили авторам изобретения сконструировать семейство пептидов, которые должны обладать такими же свойствами и преимуществами, что и флагеллины FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405}.

Указанное семейство пептидов определено, исходя из флагеллинов FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405}, исследованных в приведенных здесь примерах, и основываясь на пептидной последовательности флагеллина SEQ ID NO:1 и на кристаллографической структуре пептида, чтобы предсказать укорочен-

ные варианты, которые могут обладать TLR5-стимулирующей активностью.

Настоящее изобретение, таким образом, преимущественно относится к иммуноадьювантному соединению, включающему:

а) N-концевой пептид, имеющий аминокислотную последовательность, начинающуюся с аминокислотного остатка, локализованного в положении 1 SEQ ID NO:1, и оканчивающуюся аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из любого из аминокислотных остатков, локализованных в положениях 99-173 SEQ ID NO:1; и

б) С-концевой пептид, имеющий аминокислотную последовательность, начинающуюся с аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из любого из аминокислотных остатков, локализованных в положениях 401-406 SEQ ID NO:1, и оканчивающуюся аминокислотным остатком, локализованным в положении 494 SEQ ID NO:1, где

указанный С-концевой пептид непосредственно связан с N-концевым пептидом или

указанные N-концевой пептид и С-концевой пептид связаны друг с другом опосредованно через промежуточную спейсерную цепь.

"Включает/включающий" и их грамматические варианты при использовании в данном описании следует считать указывающими на присутствие установленных признаков, целых чисел, стадий или компонентов или их групп, но не исключающим присутствие или добавление одного или более чем одного другого признака, целого числа, стадии или компонента или их групп.

Соединение по изобретению может быть взаимозаменяемо названо здесь "иммуноадьювантным соединением" или "пептидным производным флагеллина".

Под "иммуноадьювантным соединением" понимают, что пептидное производное флагеллина по изобретению может индуцировать и/или усиливать иммунный ответ против антигена при введении субъекту или животному.

Под ним также подразумевают вещество, которое действует в целом на ускорение, пролонгирование или усиление качества специфичных иммунных ответов на специфичный антиген.

Как описано здесь, указанное иммуноадьювантное соединение можно применять в вакцинной или иммуногенной композиции вместе с одним или более чем одним антигеном и фармацевтически приемлемым эксципиентом.

Вышеупомянутая пептидная последовательность SEQ ID NO:1 имеет происхождение из *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* ATCC14028 флагеллин FliC (номер доступа AAL20871).

Нумерация полипептида начинается с первой аминокислоты после возможного N-концевого метионина (не показанного в SEQ ID NO:1), который типично отсекается метионинаминопептидазой в бактериальных клетках-хозяевах, как упомянуто ниже.

N-концевой и С-концевой пептиды указанного пептидного производного флагеллина по изобретению предпочтительно обладают аминокислотной идентичностью по меньшей мере 90% и даже более с соответствующим участком аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1.

Описание идентичности и того, как это можно определить, хорошо известно специалистам в данной области техники.

Как подразумевается здесь, данная представляющая интерес аминокислотная последовательность обладает идентичностью 90% или более с референсной аминокислотной последовательностью, когда указанная представляющая интерес аминокислотная последовательность обладает аминокислотной идентичностью по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5% с указанной референсной аминокислотной последовательностью.

Для определения процента идентичности между двумя аминокислотными последовательностями в целях оптимального сравнения аминокислотные последовательности выравнивают. Например, для оптимального выравнивания бреши можно вводить в одну или в обе из первой и второй аминокислотных последовательностей, и в целях сравнения негомологичные последовательности можно не рассматривать.

В целях оптимального сравнения процент идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть получен с помощью программы CLUSTAL W (версия 1.82) с приведенными ниже параметрами: (1) CPU MODE = ClustalW mp; (2) ALIGNMENT = "full"; (3) OUTPUT FORMAT = "aln w/numbers"; (4) OUTPUT ORDER = "aligned"; (5) COLOR ALIGNMENT = "no"; (6) KTUP (word size) = "default"; (7) WINDOW LENGTH = "default"; (8) SCORE TYPE = "percent"; (9) TOPDIAG = "default"; (10) PAIRGAP = "default"; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE = "none"; (12) MATRIX = "default"; (13) GAP OPEN = "default"; (14) END GAPS = "default"; (15) GAP EXTENSION = "default"; (16) GAP DISTANCES = "default"; (17) TREE TYPE = "cladogram" и (18) TREE GRAP DISTANCES = "hide".

В частности, понятно, что могут быть проведены минорные модификации без нарушения преимуществ и активности пептидного производного флагеллина по изобретению.

Такие модификации включены в значение терминов "иммуноадьювантное соединение" или "пептидное производное флагеллина" по изобретению до той степени, пока сохранена конкретная иммунная активность, в частности TLR6-опосредованные свойства мукозального адьюванта без какого-либо значительного системного провоспалительного ответа.

Кроме того, различные молекулы могут быть ковалентно или нековалентно присоединены к пеп-

тидному производному флагеллина по изобретению, включая, например, другие полипептиды, углеводы, нуклеиновые кислоты или липиды.

Эти присоединенные молекулы возможно состоят из антигена, против которого подразумевается данный иммунный ответ. Такие модификации включены в определение изобретения.

Минорные модификации могут также касаться, например, консервативных замен встречающихся в природе аминокислот, а также структурные изменения, которые включают неприродные аминокислоты, аминокислотные аналоги и функциональные миметики. Например, аминокислотный остаток лизина считают консервативной заменой для аминокислотного остатка аргинина.

Таким образом, как подразумевают здесь, первый полипептид, обладающий по меньшей мере 90% аминокислотной идентичностью со вторым референсным полипептидом, охватывает первые полипептиды, содержащие одно или более чем одно аминокислотное различие по сравнению со вторым референсным полипептидом, и где указанные аминокислотные различия выбраны из группы, состоящей из (1) замены одной или более чем одной аминокислоты, (2) делеции одной или более чем одной аминокислоты и (3) добавления одной или более чем одной аминокислоты, или любой комбинации (1), (2) и (3).

В целом изобретение, таким образом, охватывает варианты полипептидов, имеющих одну или более чем одну аминокислотную замену, делецию или добавление по сравнению с референсным полипептидом, предпочтительно замену 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот и/или делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот и/или добавление 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот по сравнению с референсным полипептидом.

Специалисты в данной области техники знают или могут определить, какая структура составляет функционально эквивалентные аминокислотные аналоги и аминокислотные миметики.

Как упомянуто выше, С-концевой и N-концевой пептиды пептидного производного флагеллина по изобретению могут быть связаны непосредственно, предпочтительно ковалентно, пептидной связью.

В альтернативном воплощении указанные N-концевой и С-концевой пептиды пептидного производного флагеллина по изобретению связаны друг с другом опосредованно через спейсерную цепь.

Спейсерная цепь должна быть выбрана так, чтобы не препятствовать биологической активности конечного соединения, а также так, чтобы иммуногенность конечного соединения значительно не повышалась.

Спейсерная цепь предпочтительно состоит из аминокислот, связанных вместе пептидными связями, и присоединена ковалентно между N-концевой и С-концевой последовательностью пептидного производного флагеллина по изобретению. Таким образом, в предпочтительных воплощениях спейсерная цепь содержит от 1 до 20 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 природных аминокислот. В более предпочтительном воплощении указанные от 1 до 20 аминокислот выбраны из Gly, Ala, Pro, Asn, Gln, Cys, Lys. Даже более предпочтительно спейсерная цепь состоит из последовательности NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH.

Непептидные линкеры также возможны: например, алкильные линкеры. Эти алкильные линкеры могут быть дополнительно замещены любой стерически не затрудненной группой, низшим ацилом, галогеном, CN, NH₂, фенилом и так далее. Другим типом непептидного линкера является полиэтиленгликолевая группа.

Специалисту в данной области техники хорошо известны эти спейсерные цепи, и он может выбрать подходящую спейсерную цепь, конкретно зависящую от последовательностей N-концевого пептида и С-концевого пептида, которые ему нужно связать друг с другом.

Кроме того, аспарагиновый аминокислотный остаток С-концевой последовательности, локализованный в положении аминокислоты 488 SEQ ID NO:1, предпочтительно заменен сериновым остатком.

Эта замена введена для специфичного мечения пептидного производного флагеллина по изобретению. Такая замена встречается в природе в флагеллинах других видов бактерий, таких как *Legionella pneumophila*, без изменения TLR5-стимулирующей активности. Другие замены могут быть введены в положениях, которые не изменяют адьювантную TLR5-стимулирующую активность, для дополнительного мечения пептидного производного флагеллина по изобретению.

Предпочтительные воплощения пептидного производного флагеллина по изобретению

В соответствии с предпочтительными воплощениями, в свете пептидной последовательности флагеллина SEQ ID NO:1 и кристаллографической структуры, N-концевой пептид иммуоадьювантного соединения по изобретению предпочтительно выбран из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей 1-99, 1-137, 1-160 и 1-173 SEQ ID NO:1.

В частности, трехмерная (3D) структура флагеллина FliC показывает, что N-концевой домен организован в виде 3 альфа-спиралей, разделенных бета-витками, за которыми следуют бета-складчатые слои и бета-витки. Остальная(ые) часть(и) этих вторичных структур на N-конце может(гут) быть достаточной(ыми) для сохранения TLR5-стимулирующей активности (и, в частности, мукозальной TLR5-стимулирующей активности), то есть аминокислотные последовательности 1-99 SEQ ID NO:1 содержат первые 2 альфа-спирали, аминокислотные последовательности 1-137 SEQ ID NO:1 содержат первые 3 альфа-спирали, и аминокислотные последовательности 1-173 SEQ ID NO:1 содержат N-концевые структуры, обнаруженные в флагеллине FliC_{Δ174-400}.

В следующих предпочтительных воплощениях указанный С-концевой пептид иммуноадьювантно-го соединения выбран из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей 401-494 и 406-494 SEQ ID NO:1.

В частности, 3D структура флагеллина FliC показывает, что С-концевой домен организован в виде 2 альфа-спиралей, разделенных бета-витками. Остальная(ые) часть(и) этих вторичных структур на N-конце может(гут) быть достаточной(ыми) для сохранения TLR5-стимулирующей активности (и, в частности, мукозальной TLR5-стимулирующей активности): аминокислотные последовательности 401-494 SEQ ID NO:1 представляют собой последовательности, обнаруженные в флагеллине FliC_{Δ174-400}, тогда как аминокислотные последовательности 406-494 SEQ ID NO:1 содержат только две вторичные С-концевые альфа-спиралю.

В некоторых предпочтительных воплощениях N-концевой пептид иммуноадьювантного соединения по изобретению состоит из аминокислотной последовательности, начинающейся с остатка аланина, локализованного в положении 1 SEQ ID NO:1, и оканчивающейся аминокислотным остатком, локализованным в положении SEQ ID NO:1, выбранным из группы, состоящей из аминокислотных остатков, локализованных в положениях 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172 и 173.

В некоторых предпочтительных воплощениях С-концевой пептид иммуноадьювантного соединения по изобретению состоит из аминокислотной последовательности, начинающейся с аминокислотного остатка, локализованного в положении SEQ ID NO:1, выбранном из группы, состоящей из аминокислотных остатков, локализованных в положениях 401, 402, 403, 404, 405 и 406, и оканчивающейся остатком аргинина, локализованным в положении 494 SEQ ID NO:1.

В конкретном аспекте этих предпочтительных воплощений указанный N-концевой пептид и указанный С-концевой пептид иммуноадьювантного соединения по изобретению предпочтительно связаны друг с другом посредством вышеупомянутой спейсерной цепи NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (то есть при замене делетированной последовательности 174-400); аспарагиновый аминокислотный остаток, локализованный в положении 488 SEQ ID NO:1, также предпочтительно заменен сериновым остатком.

Иллюстративные воплощения таких иммуноадьювантных соединений, описанных выше, охватывают FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405}, которые показаны в приведенных здесь примерах; и которые также более подробно описаны ниже.

Еще в одном следующем воплощении указанные N-концевой и С-концевой пептиды интересующего иммуноадьювантного соединения состоят из аминокислотных последовательностей 1-173 и 401-494 SEQ ID NO:1 соответственно.

В еще одном воплощении указанные N-концевой и С-концевой пептиды интересующего иммуноадьювантного соединения состоят из аминокислотных последовательностей 1-160 и 406-494 SEQ ID NO:1 соответственно.

В еще одном воплощении указанные N-концевой и С-концевой пептиды интересующего иммуноадьювантного соединения состоят из аминокислотных последовательностей 1-137 и 406-494 SEQ ID NO:1 соответственно.

В некоторых воплощениях иммуноадьювантные соединения в соответствии с изобретением содержат дополнительный остаток метионина на их N-конце, в частности, когда эти соединения продуцируют в виде рекомбинантных белков в бактериальных клетках.

В воплощении, где указанные N-концевой и С-концевой пептиды интересующего иммуноадьювантного соединения состоят из аминокислотных последовательностей 1-173 и 401-494 SEQ ID NO:1, пептидное производное флагеллина по изобретению состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, из которой делетирована аминокислотная последовательность, продолжающаяся от положения аминокислоты 174 до положения аминокислоты 400. Эту пептидную последовательность флагеллина по изобретению также называют в настоящем описании "FliC_{Δ174-400}" или "флагеллин FliC_{Δ174-400}".

В соответствии с предпочтительным воплощением указанный N-концевой пептид и указанный С-концевой пептид иммуноадьювантного соединения по изобретению предпочтительно связаны друг с другом посредством вышеупомянутой спейсерной цепи NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (то есть при замене делетированной последовательности 174-400); аспарагиновый аминокислотный остаток, локализованный в положении 488 SEQ ID NO:1, также предпочтительно заменен сериновым остатком.

Пептидное производное флагеллина по изобретению, полученное таким образом, представляет собой последовательность из 271 аминокислот, где пептидная последовательность состоит из SEQ ID NO:2.

Нумерация полипептида начинается с первой аминокислоты после возможного N-концевого метионина (не показанного в SEQ ID NO:2), который типично отсекается метионинаминопептидазой в бактериальных клетках-хозяевах, как раскрыто ниже.

В воплощении, где указанные N-концевой и С-концевой пептиды интересующего иммуноадьювантного соединения состоят из аминокислотных последовательностей 1-160 и 406-494 SEQ ID NO 1, пептидное производное флагеллина по изобретению состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO 1, из которой делетирована аминокислотная последовательность, продолжающаяся от поло-

жения аминокислоты 161 до положения аминокислоты 405. Эту пептидную последовательность флагеллина по изобретению также называют в настоящем описании "FliC_{Δ161-405}" или "флагеллин FliC_{Δ161-405}".

В соответствии с предпочтительным воплощением указанный N-концевой пептид и указанный C-концевой пептид иммуноадьювантного соединения по изобретению предпочтительно связаны друг с другом посредством вышеупомянутой спейсерной цепи NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (то есть при замене делетированной последовательности 161-405), аспарагиновый аминокислотный остаток, локализованный в положении 488 SEQ ID NO 1, также предпочтительно заменен сериновым остатком.

Пептидное производное флагеллина по изобретению, полученное таким образом, представляет собой последовательность из 253 аминокислот, где пептидная последовательность состоит из SEQ ID NO 25.

Нумерация полипептида начинается с первой аминокислоты после возможного N-концевого метионина (не показанного в SEQ ID NO 25), который типично отсекается метионинаминопептидазой в бактериальных клетках-хозяевах, как раскрыто ниже.

В воплощении, где указанные N-концевой и C-концевой пептиды интересующего иммуноадьювантного соединения состоят из аминокислотных последовательностей 1-137 и 406-494 SEQ ID NO 1, пептидное производное флагеллина по изобретению состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO 1, из которой делетирована аминокислотная последовательность, продолжающаяся от положения аминокислоты 138 до положения аминокислоты 405. Эту пептидную последовательность флагеллина по изобретению также называют в настоящем описании "FliC_{Δ138-405}" или "флагеллин FliC_{Δ138-405}".

В соответствии с предпочтительным воплощением указанный N-концевой пептид и указанный C-концевой пептид иммуноадьювантного соединения по изобретению предпочтительно связаны друг с другом посредством вышеупомянутой спейсерной цепи NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (то есть при замене делетированной последовательности 138-405); аспарагиновый аминокислотный остаток, локализованный в положении 488 SEQ NO:1, также предпочтительно заменен сериновым остатком.

Пептидное производное флагеллина по изобретению, полученное таким образом, представляет собой последовательность из 230 аминокислот, где пептидная последовательность состоит из SEQ ID NO:26.

Нумерация полипептида начинается с первой аминокислоты после возможного N-концевого метионина (не показанного в SEQ ID NO:26), который типично отсекается метионинаминопептидазой в бактериальных клетках-хозяевах, как раскрыто ниже.

В воплощении, где указанные N-концевой и C-концевой пептиды интересующего иммуноадьювантного соединения состоят из аминокислотных последовательностей 1-99 и 406-494 SEQ ID NO:1, пептидное производное флагеллина по изобретению состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, из которой делетирована аминокислотная последовательность, продолжающаяся от положения аминокислоты 100 до положения аминокислоты 405. Эту пептидную последовательность флагеллина по изобретению также называют в настоящем описании "FliC_{Δ100-405}" или "флагеллин FliC_{Δ100-405}".

В соответствии с предпочтительным воплощением указанный N-концевой пептид и указанный C-концевой пептид иммуноадьювантного соединения по изобретению предпочтительно связаны друг с другом посредством вышеупомянутой спейсерной цепи NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (то есть при замене делетированной последовательности 100-405); аспарагиновый аминокислотный остаток, локализованный в положении 488 SEQ ID NO:1, также предпочтительно заменен сериновым остатком.

Пептидное производное флагеллина по изобретению, полученное таким образом, представляет собой последовательность из 192 аминокислот, где пептидная последовательность состоит из SEQ ID NO:27.

Нумерация полипептида начинается с первой аминокислоты после возможного N-концевого метионина (не показанного в SEQ ID NO:27), который типично отсекается метионинаминопептидазой в бактериальных клетках-хозяевах, как раскрыто ниже.

Синтез иммуноадьювантного пептида по изобретению

Пептидное производное флагеллина по изобретению может быть синтезировано рекомбинантными клетками, полученными с помощью генной инженерии, или любым из способов химического или ферментативного пептидного синтеза, которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

1. Синтез рекомбинантными клетками.

Пептидное производное флагеллина согласно изобретению можно продуцировать рекомбинантным путем посредством рекомбинантных клеток, которые трансфицированы нуклеиновой кислотой, которая кодирует его аминокислотную последовательность и дает возможность его эффективного продуцирования внутри трансфицированных клеток.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептидное производное флагеллина по изобретению

Модификации указанной пептидной последовательности флагеллина могут быть получены с использованием методик мутагенеза рекомбинантной ДНК.

Различные способы конструирования и модификации последовательности ДНК известны специали-

стам в данной области техники, и выбор указанных рекомбинантных методов известен специалистам в данной области техники.

Методики "рекомбинантного мутагенеза" включают, например, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-мутагенез (см., в частности, Current Protocols in Molecular Biology, 2007 by John Wiley and Sons, Inc., Chapter 8 and 15).

Указанная полимеразная цепная реакция (ПЦР) особенно полезна для широкого ряда мутационных методик и применений. Методики ПЦР-мутагенеза дают возможность модифицировать и конструировать любую целевую ДНК легко и эффективно. Они включают, например, введение точечных мутаций, делеций или инсерций.

Эти методы применяют, например, на гене дикого типа *fliC* SEQ ID NO:3, выделенном из штаммов *S. Typhimurium* ATCC14028, который кодирует пептид флагеллин, идентифицированный в SEQ ID NO:1.

В предпочтительном воплощении вышеупомянутый ген *fliC* делетируют по центральному участку его длины путем ПЦР-мутагенеза (см., в частности, Current Protocols in Molecular Biology, 2007 by John Wiley and Sons, Inc., Chapter 8 and 15), используя подходящие пары праймеров, выбранных в зависимости от желаемых N-концевой и C-концевой последовательностей, которые найдены для пептида по изобретению.

Например, на основе плазмиды, имеющей происхождение от pBR322, несущей указанный ген *fliC* дикого типа SEQ ID NO:3 под контролем его собственного промотора, в методике ПЦР-мутагенеза можно использовать приведенные ниже пары праймеров:

SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5 для N-концевого и C-концевого пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей 1-99 и 401-494 SEQ ID NO:1 соответственно;

SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6 для N-концевого и C-концевого пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей 1-99 и 406-494 SEQ ID NO:1 соответственно;

SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:5 для N-концевого и C-концевого пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей 1-137 и 401-494 SEQ ID NO:1 соответственно;

SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:6 для N-концевого и C-концевого пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей 1-137 и 406-494 SEQ ID NO:1 соответственно;

SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:5 для N-концевого и C-концевого пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей 1-160 и 401-494 SEQ ID NO:1 соответственно;

SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:6 для N-концевого и C-концевого пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей 1-160 и 406-494 SEQ ID NO:1 соответственно;

SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:5 для N-концевого и C-концевого пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей 1-173 и 401-494 SEQ ID NO:1 соответственно;

SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:6 для N-концевого и C-концевого пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей 1-173 и 406-494 SEQ ID NO:1 соответственно.

Чтобы заменить аспарагин в положении 488 SEQ ID NO:1 на серин, например, можно использовать сайт-направленный мутагенез с приведенными ниже праймерами SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11.

Чтобы ввести линкер NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH в точке соединения 1-99, 1-137, 1-160 или 1-173 с 401-494 или 406-494 рекомбинантных пептидов флагеллина, следующую последовательность ДНК: GGTGCAGCTGGA можно присоединить к 5'-концу последовательностей праймеров SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 с образованием праймеров, названных, соответственно, "F-линкер-401" последовательности SEQ ID NO:12 и "F-линкер-406" последовательности SEQ ID NO:13.

Последовательностью ДНК, подходящей для продуцирования пептидного производного флагеллина по изобретению *FliC*_{Δ174-400}, является, например, последовательность SEQ ID NO:14.

Нуклеиновая кислота, подходящая для продуцирования пептидного производного флагеллина по изобретению *FliC*_{Δ161-405}, имеет, например, последовательность SEQ ID NO:28.

Нуклеиновая кислота, подходящая для продуцирования пептидного производного флагеллина по изобретению *FliC*_{Δ138-405}, имеет, например, последовательность SEQ ID NO:29.

Нуклеиновая кислота, подходящая для продуцирования пептидного производного флагеллина по изобретению *FliC*_{Δ100-405}, имеет, например, последовательность SEQ ID NO:30.

Выбор и использование реплицируемого вектора

Последовательность нуклеиновой кислоты, раскрытую в данной заявке, кодирующую интересующее пептидное производное флагеллина, можно встраивать в реплицируемый вектор для клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии.

Различные векторы широко доступны. Вектор может находиться, например, в форме плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага. Соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты можно встраивать в вектор с помощью ряда методик. Как правило, ДНК встраивают в соответствующий сайт(ы) рестрикционной эндонуклеазы, используя методики, известные в данной области техники.

Компоненты вектора обычно включают, но не ограничены ими, одно или более чем одно из следующего: сигнальная последовательность, если последовательность нужно секретировать, точка начала репликации, один или более чем один маркерный ген, энхансерный элемент, промотор и последователь-

ность терминации транскрипции.

При конструировании подходящих векторов, содержащих один или более чем один из этих компонентов, используют стандартные методики лигирования, которые известны специалистам в данной области техники.

Интересующее пептидное производное флагеллина можно продуцировать рекомбинантным путем не только непосредственно, но также в виде слитого полипептида с гетерологичным полипептидом, который может представлять собой сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфичный сайт расщепления на N-конце зрелого белка или пептида. Как правило, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора, либо она может составлять часть ДНК, кодирующей интересующий полипептид, который встроен в вектор. Сигнальная последовательность может представлять собой прокариотическую сигнальную последовательность, выбранную, например, из группы лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II. Для дрожжевой секреции сигнальная последовательность может представлять собой, например, лидерную последовательность инвертазы дрожжей, лидерную последовательность альфа-фактора (включая лидерные последовательности альфа-фактора *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*; последняя описана в патенте США 5010182) или лидерную последовательность кислой фосфатазы, лидерную последовательность глюкоамилазы *C. albicans* (EP 362179, опубликованный 4 апреля 1990) или сигнальную последовательность, раскрытую в WO 90/13646, опубликованной 15 ноября 1990). При экспрессии в клетках млекопитающих можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, чтобы направлять секрецию белка, такие как сигнальные последовательности из секретируемых полипептидов того же или родственного вида, а также вирусные секреторные лидерные последовательности.

Как экспрессионные, так и клонирующие векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая дает возможность вектору реплицироваться в одной или более чем одной из выбранных клеток-хозяев. Такие последовательности хорошо известны для ряда бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, точка начала репликации 2-микронной плазмиды подходит для дрожжей, а различные вирусные точки начала репликации (SV40, полиомы, аденовируса, VSV или BPV) полезны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих.

Экспрессионные и клонирующие векторы типично содержат ген селекции, также называемый селективным маркером. Типичные гены селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например к ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) восполняют ауксотрофные дефициты или (в) обеспечивают важные питательные вещества, недоступные из комплексных сред, например ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

Примерами подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих являются те, которые обеспечивают идентификацию клеток, компетентных к поглощению нуклеиновой кислоты, кодирующей интересующее пептидное производное флагеллина, такие как дигидрофолатредуктаза (DHFR) или тимидинкиназа. Подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является клеточная линия CHO с дефицитом по активности DHFR, которую получают и размножают как описано Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Подходящим селективным геном для использования в дрожжах является ген *trp 1*, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7. Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper et al, Gene, 10: 157 (1980). Ген *trp1* обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей в отсутствие способности роста при триптофане, например, ATCC No. 44076 или PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977).

Экспрессионные и клонирующие векторы обычно содержат промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей пептидное производное флагеллина, для направления синтеза мРНК. Промоторы, распознаваемые рядом потенциальных клеток-хозяев, хорошо известны. Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промоторные системы бета-лактамазы и лактозы (Chang et al., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281: 544 (1979)), щелочной фосфатазы, промоторную систему триптофана (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36776) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)). Промоторы для использования в бактериальных системах также содержат последовательность Шайна-Далгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей интересующее пептидное производное флагеллина.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для использования с дрожжевыми хозяевами включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы (Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)) или других гликолитических ферментов (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)), таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Другие дрожжевые промоторы, которые являются индуцибельными промоторами, обладающими дополнительным преимуществом транскрипции, контролируемой условиями роста, представляют собой промоторные области алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, ферментов расщеп-

ления, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для использования при дрожжевой экспрессии дополнительно описаны в EP 73657.

Транскрипцию интересующей нуклеиновой кислоты в клетках-хозяевах млекопитающих контролируют, например, промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур (UK 2211504, опубликован 5 июля 1989), аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус бычьей папилломы, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вакуолизирующий вирус обезьян 40 (SV40); гетерологичные промоторы млекопитающих, например промотор актина или промотор иммуноглобулина; и промоторы теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

Транскрипцию ДНК, кодирующей интересующее пептидное производное флагеллина, высшими эукариотами можно повысить путем инсерции энхансерной последовательности в вектор. Энхансеры представляют собой цис-активные элементы ДНК, обычно примерно от 10 до 300 пар оснований (п.о.), которые действуют на промотор с повышением его транскрипции. В настоящее время известны многие энхансерные последовательности из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротейна и инсулина). Однако типично используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне точки начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы на поздней стороне точки начала репликации и аденовирусные энхансеры. Энхансер может быть сплайсирован в векторе в положении 5' или 3' к последовательности, кодирующей интересующие полипептиды, но предпочтительно локализован с 5'-стороны от промотора.

Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или нуклеированных клетках из других многоклеточных организмов), также содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и иногда 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемом участке мРНК, кодирующей интересующее пептидное производное флагеллина.

Другие способы, векторы и клетки-хозяева, подходящие для адаптации к синтезу интересующего пептидного производного флагеллина в культуре рекомбинантных клеток позвоночных, описаны в Gething et al., *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281: 40-46 (1979); EP 117060 и EP 117058.

Выбор и трансформация клеток-хозяев

Клетки-хозяева трансфицируют или трансформируют экспрессионными или клонирующими векторами, описанными в данной заявке, для продуцирования пептидного производного флагеллина и культивирования в традиционной питательной среде, соответствующим образом модифицированной для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Условия культивирования, такие как среды, температура, pH и тому подобное, могут быть выбраны специалистом в данной области техники без излишнего экспериментирования. В целом принципы, протоколы и практические методики для максимизации продуктивности клеточных культур можно найти в *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

Способы трансфекции известны обычным специалистам в данной области техники, например обработка CaPO₄ и электропорация. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию осуществляют, используя стандартные методики, пригодные для таких клеток. Кальциевую обработку с использованием хлорида кальция, как описано в Sambrook et al., см. выше, или электропорацию используют, как правило, для прокариот или других клеток, которые содержат существенные барьеры клеточной стенки. Инфицирование *Agrobacterium tumefaciens* используют для трансформации определенных растительных клеток, как описано Shaw et al., *Gene* 23: 315 (1983) и WO 89/05859, опубликованной 29 июня 1989 года. Для клеток млекопитающих без клеточных стенок можно использовать метод кальций-фосфатной преципитации Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Общие аспекты трансформации системы клеток-хозяев млекопитающих описаны в патенте США № 4399216. Трансформации в дрожжи типично осуществляют в соответствии со способом Van Solingen et al., *J. Vact.*, 130: 946 (1977) и Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Однако можно также использовать другие способы введения ДНК в клетки, как, например, путем микроинъекции в ядро, электропорации, слияния бактериальных протопластов с интактными клетками или поликатионами, например, полибренном или полиорнитинном. Для различных методик трансформации клеток млекопитающих см. Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) и Mansouret et al., *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в данной заявке включают клетки прокариот, дрожжей или высушенных эукариот.

Подходящие прокариоты включают, но не ограничены ими, эубактерии, такие как грамтрицательные или грамположительные организмы, например *Enterobacteriaceae*, такие как *E. coli*. Различные штаммы *E. coli* находятся в открытом доступе, такие как штамм *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31446); *E. coli*

X1776 (ATCC 31537); штамм *E. coli* W3110 (ATCC 27325); и K5772 (ATCC 53635). Другие подходящие прокариотические клетки-хозяева включают Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например *Serratia marcescens*, и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например *B. licheniformis* 41P, раскрытый в DD 266710, опубликованной 12 апреля 1989), *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*. Эти примеры скорее являются иллюстративными, чем ограничивающими.

Штамм SIN41 *Salmonella typhimurium* (fliC fliB) представляет особый интерес для продуцирования пептидного производного флагеллина, поскольку эти прокариотические клетки-хозяева не секретируют никаких флагеллинов (Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:13722-7). Однако флагеллины секретируются посредством специализированной системы секреции: так называемой "системы секреции типа III". Интересно, что штамм SIN41 продуцирует все компоненты системы секреции типа III, необходимой для оптимальной секреции флагеллина. Клонирование последовательности, кодирующей новые пептиды флагеллина под промотором fliC, обеспечивает секрецию в больших количествах интересующих пептидных производных флагеллина в штамме SIN41.

Штамм W3110 также представляет интерес, поскольку он является распространенным штаммом-хозяином для промышленных ферментации рекомбинантных ДНК. Предпочтительно клетка-хозяин секретирует минимальные количества протеолитических ферментов. Например, штамм W3110 можно модифицировать путем осуществления генетической мутации в генах, кодирующих белки, эндогенные для хозяина, где примеры таких хозяев включают штамм *E. coli* W3110 1A2, который имеет полный генотип tonA; штамм *E. coli* W3110 9E4, который имеет полный генотип tonA ptr3; штамм *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55244), который имеет полный генотип tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan.sup.r; штамм *E. coli* W3110 37D6, который имеет полный генотип tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan.sup.r; штамм *E. coli* W3110 40B4, который представляет собой штамм 37D6 с неустойчивой к канамицину делеционной мутацией degP; и штамм *E. coli*, имеющий мутантную периплазматическую протеазу, раскрытый в патенте США № 4946783, опубликованном 7 августа 1990 года. Штаммы *E. coli* MG1655, MG1655 ΔfimA-H или MKS12, fliD- и -fimA-H-делетированный штамм MG1655 также являются интересными кандидатами для продуцирования рекомбинантных флагеллинов в виде секретируемых белков (Nat Biotechnol. 2005; (4):475-81). Альтернативно подходят способы клонирования in vitro, например ПЦР или другие полимеразные реакции нуклеиновых кислот.

Кроме прокариот, эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих пептидное производное флагеллина.

Saccharomyces cerevisiae являются общепринято используемым низшим эукариотическим микроорганизмом-хозяином. Другие включают *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139383, опубликованный 2 мая 1985 года); хозяева *Kluuyveromyces* (патент США № 4943529; Fleer et al., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)), такие как, например, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226), *Pichia pastoris* (EP 183070, Sreekrishna et al, J Basic Microbiol, 28 265-278 [1988]), *Candida*, *Tnchoderma reesia* (EP 244234), *Neurospora crassa* (Case et al, Proc Natl Acad Sci USA, 76 5259-5263 [1979]), *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394538, опубликованный 31 октября 1990 года), и мицелиальные грибы, такие как, например, хозяева *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* (WO 91/00357, опубликованная 10 января 1991 года) и *Aspergillus*, такие как *A nidulans* (Ballance et al., Biochem Biophys Res Commun, 112 284-289 [1983], Tilburn et al., Gene, 26 205-221 [1983], Yelton et al., Proc Natl Acad Sci USA, 81 1470-1474 [1984]) и *A niger* (Kelly and Hynes, EMBO J, 4 475-479 [1985]) Метилотрофные дрожжи являются подходящими в данном изобретении и включают, но не ограничены ими, дрожжи, способные к росту на метаноле, выбранные из родов, состоящих из *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и *Rhodotorula* Перечень конкретных видов, которые являются примерами данного класса дрожжей, можно найти в C Anthony, The Biochemistry of Methylotrrophs, 269 (1982).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей интересующее пептидное производное флагеллина, имеют происхождение от многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки насекомых, такие как *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9, а также клетки растений. Примеры полезных линий клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO) и клетки африканской зеленой мартовшки (COS) Более конкретные примеры включают линию почек обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), линию эмбриональных почек человека (клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Grahain et al., J Gen Virol, 36 59 (1977)), клетки яичника китайского хомячка - DHFR (CHO, Urlaub and Chasm, Proc Natl Acad Sci USA, 77 4216 (1980)), клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol Reprod, 23 243-251 (1980)), клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), и опухолевые клетки молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51) Выбор подходящей клетки-хозяина находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

Общие способы очистки интересующего пептидного производного флагеллина

Формы интересующего пептидного производного флагеллина могут быть выделены из культуральной среды или из лизатов клеток-хозяев.

Если эти производные связаны с мембраной, их можно освободить от мембраны, используя подходящий раствор детергента (например, ТРИТОН-X.TM. 100), или путем ферментативного расщепления.

Клетки, используемые в экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей интересующее пептидное производное флагеллина, можно разрушить различными физическими или химическими способами, такими как цикл замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком, механическое разрушение или агенты, лизирующие клетки.

Может быть желательным очистить интересующий полипептид от рекомбинантных клеточных белков или полипептидов. Приведенные ниже методики являются примерами подходящих методик очистки: фракционирование на ионообменной колонке; осаждение этанолом; ВЭЖХ с обращенной фазой; хроматография на силикагеле или на катионообменной смоле, такой как диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE); хроматографическое фокусирование; электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ); осаждение сульфатом аммония; гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75; колонки сефарозы с белком А для удаления загрязнителей, таких как IgG; и колонки, хелатирующие металлы, для связывания форм интересующего пептидного производного флагеллина с эпитопной меткой.

Можно использовать различные способы очистки белка, и такие способы известны в данной области техники и описаны, например, в Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (Springer-Verlag: New York, 1982). Выбранная стадия(и) очистки зависит, например, от природы используемого способа продуцирования и от конкретного продуцируемого пептидного производного флагеллина.

В предпочтительном воплощении пептидное производное флагеллина очищают из надосадочной жидкости рекомбинантного *S. Typhimurium* SIN41 (fliC fljB), как раскрыто в примерах.

В частности, *Salmonella* выращивали в среде Лурия-Бертани (LB) в течение 6-18 ч при 37°C при встряхивании. Надосадочную жидкость фильтровали и насыщали 60% сульфатом аммония (Sigma Aldrich, USA). Осажденные вещества выделяли центрифугированием, солубилизацией в 20 мМ Трис/HCl pH 7,5, а затем диализом. Белки дополнительно очищали посредством последовательных раундов хроматографии на гидроксипатите, анионообменной и эксклюзионной хроматографии (Bio-Rad Laboratories, USA; GE Healthcare, Sweden). Наконец, белки истощали по липополисахариду (LPS), используя колонку с полимиксином В (Pierce, USA). Используя ЛАЛ-тест (анализ с использованием лизатов амебоцитов *Limulus*) (Associates of Cape Cod Inc., USA), определяли остаточную концентрацию LPS, так чтобы она была менее чем 30 пг LPS на мкг рекомбинантного флагеллина.

Очистка интересующего пептидного производного флагеллина с использованием иммуноаффинной хроматографии

В дополнительных воплощениях пептидное производное флагеллина согласно изобретению можно очищать путем разделения на иммуноаффинном хроматографическом субстрате.

Указанный иммуноаффинный хроматографический субстрат содержит антитела антифлагеллин, которые иммобилизованы на нем. Под антителами "антифлагеллин" в данном описании подразумевают антитела, которые связаны либо с нативным флагеллином, либо с флагеллином с делетированной гипервариабельной областью, включая те, которые охватываются настоящим изобретением.

Предпочтительно антитела анти-флагеллин состоят из моноклональных антител, включая мышинные антитела анти-флагеллин.

В соответствии с изобретением показано, что антитела анти-флагеллин, которые получены способом, включающим стадию иммунизации мышей флагеллином FliC_{Δ174-400} с делетированной гипервариабельной областью, который раскрыт в данном описании в других частях, распознают как нативный флагеллин, так и любой из флагеллинов с делетированной гипервариабельной областью, который раскрыт в данном описании.

Таким образом, в некоторых предпочтительных воплощениях иммуноаффинного хроматографического субстрата указанный субстрат содержит мышинные моноклональные антитела, направленные против FliC_{Δ174-400}.

Указанный предпочтительный иммуноаффинный хроматографический субстрат может быть получен, как описано ниже:

асцит мыши, содержащий моноклональные антитела анти-FliC_{Δ174-400}, очищали на колонках с белком А Econo-Pac (# 732-2022 Affi-gel; Bio-Rad);

полученные в результате очищенные моноклональные антитела анти-FliC_{Δ174-400} (которые могут быть также названы "B23C5") ковалентно связывали через первичные аминогруппы с активированной N-гидроксисукцинимидом высокоэффективной колонкой Sepharose™ (# 17-0716-01 Hitrap, NHS активированная HP от фирмы GE Healthcare), с образованием аффинной колонки, специфичной к флагеллину. Выход связывания составлял 98%.

Как показано в примерах, приведенных в данном описании, указанная выше аффинная колонка, специфичная к флагеллину, дает возможность высокоспецифичного отделения нативного флагеллина и, следовательно, также любого из флагеллинов с делетированной гипервариабельной областью, которые раскрыты в данном описании, от других белковых компонентов или небелковых компонентов, содержащихся в исходном образце.

Способ очистки флагеллина или любого из флагеллинов с делетированной гипервариабельной областью, которые раскрыты здесь, описан ниже:

надосадочные жидкости, содержащие флагеллин, из культуры рекомбинантного штамма *S. Typhimurium* SIN41 или *E. coli*, центрифугировали, фильтровали через 0,22 мкм мембрану, разбавляли один к одному связывающим буфером (75 mM Трис-НСl с pH 8) и наносили на аффинную колонку, специфичную к флагеллину, описанную выше;

затем эту аффинную колонку, специфичную к флагеллину, промывали 15-20 CV (объем колонки) связывающего буфера;

далее, белки элюировали 3 CV буфера элюции (100 mM глицин-НСl, 0,5 M NaCl, pH 2,7) и фракции немедленно нейтрализовали 500 мкл Трис 1,5 M pH 8,9 во избежание длительного воздействия кислого pH;

затем колонку регенерировали 10 CV связывающего буфера и хранили при 4°C с 0,02% азидом натрия.

Типичный хроматографический профиль представлен на фиг. 13, где изображены (1) кривая поглощения (OD) при 280 нм (линия с закрашенными квадратами), а также (2) кривая электропроводности. Номера со стрелками на фиг. 13 соответствуют периодам времени, когда фракции жидкости, вытекающей из колонки, успешно собраны с целью дальнейшего их анализа на содержание флагеллина (см. фиг. 14 и приведенный ниже параграф). Пронумерованные собранные фракции соответственно состоят из:

№ 1 - 5 мкл образца перед нанесением (3 мкг) равно суммарному внесенному количеству 900 мкг;

№ 2 - 20 мкл из нанесенного образца после прохождения колонки;

№ 3 - 20 мкл из промывки колонки;

№ 4 - 20 мкл из промывки колонки;

№ 5, 6 и 7 - 20 мкл из каждой из соответствующих фракций после буфера элюирования: суммарное количество примерно 900 мкг;

№8 - 20 мкл после повторного уравнивания колонки.

На фиг. 14 изображена фотография Вестерн-блот-анализа, который проведен с использованием фракций 1-8, относящихся к фиг. 13, в качестве соответствующего исходного вещества.

2. Химический синтез.

В некоторых воплощениях пептид по изобретению можно синтезировать посредством общепринятых методов химического пептидного синтеза.

Например, последовательность интересующего производного пептида флагеллина может быть получена путем прямого пептидного синтеза, используя твердофазные методы, подобные описанным Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis (W.H. Freeman Co.: San Francisco, Calif., (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc, 85: 2149-2154 (1963); Fields G.B., Noble R.L.; 1990; Int. J. Pept. Protein Res.; Vol. 35 : 161-214).

Синтез белка *in vitro* можно осуществить, используя ручные способы или с помощью автоматизации. Автоматизированный синтез можно выполнять, например, с помощью пептидного синтезатора фирмы Applied Biosystems (Foster City, Calif.), используя инструкции изготовителя.

Различные участки интересующего пептида могут быть химически синтезированы отдельно и объединены с использованием химических или ферментативных способов с получением полноразмерного интересующего пептида.

Композиции, содержащие пептидное производное флагеллина по изобретению

Следующий объект изобретения составляет композиция, в частности фармацевтическая композиция, содержащая адьювантное соединение, как оно определено в настоящем описании, в частности, в сочетании с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым эксципиентом.

Настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции, содержащей иммуноадьювантное соединение, как оно определено в настоящем описании, вместе с одним или более чем одним антигеном.

"Иммуногенная композиция", как только она введена субъекту или животному, вызывает защитный иммунный ответ против одного или более чем одного указанного антигена, который она содержит.

Настоящее изобретение также относится к вакцинной композиции, содержащей иммуноадьювантное соединение, как оно определено в настоящем описании, вместе с одним или более чем одним антигеном.

Как используют здесь, "вакцинная композиция", как только она введена субъекту или животному, вызывает защитный иммунный ответ против, например, микроорганизма, или чтобы эффективно защищать субъекта или животное против инфекции.

Вакцинная композиция полезна для предупреждения или ослабления патологического состояния, которое даст благоприятный ответ на модулирование иммунного ответа.

Иммуoadьювант

Как упомянуто выше, термин "иммуoadьювант" при использовании со ссылкой на иммуногенную композицию или вакцину предназначен для обозначения вещества, которое в целом действует на ускорение, пролонгирование или улучшение качества специфических иммунных ответов на антиген.

Иммуoadьювант может предпочтительно также уменьшать число иммунизации или количество антигена, необходимое для защитной иммунизации.

Антиген

Ряд веществ можно использовать в качестве антигенов в композиции или препарате иммуногенного или вакцинного типа. Например, аттенуированные и инактивированные вирусные и бактериальные патогены, очищенные макромолекулы, полисахариды, анатоксины, рекомбинантные антигены, организмы, содержащие чужеродный ген из патогена, синтетические пептиды, полинуклеиновые кислоты, антитела и опухолевые клетки можно использовать для получения (1) иммуногенной композиции, полезной для индукции иммунного ответа у индивидуума, или (2) вакцины, полезной для лечения патологического состояния.

Следовательно, пептидное производное флагеллина по изобретению можно объединять с широким рядом антигенов для получения иммуногенной композиции или вакцины, полезной для индукции иммунного ответа у индивидуума.

Специалисты в данной области техники способны выбрать антиген, подходящий для лечения конкретного патологического состояния, и знают, как определить, необработанный или выделенный антиген является лучшим в конкретном вакцинном препарате.

Специалисты в данной области техники также способны определить, связывать ли ковалентно или связывать нековалентно иммуoadьювант по изобретению с одним или более чем одним из указанных антигенов.

В настоящих тестах *in vivo* продемонстрировано, что для мукозальной адьювантной активности не требуется какой-либо связи между интересующим пептидным производным флагеллина и антиген-мишенью, когда их вводят совместно мукозальным путем и, в частности, интраназальным путем.

Выделенный антиген можно получить, используя ряд способов, хорошо известных в данной области техники. Ген, кодирующий любой иммуногенный полипептид, можно выделить и клонировать, например, в клетках бактерий, дрожжей, насекомых, рептилий или млекопитающих, используя рекомбинантные способы, хорошо известные в данной области техники и описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1992) и в Ansubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1998). Ряд генов, кодирующих поверхностные антигены из патогенов вирусов, бактерий и простейших, были успешно клонированы, экспрессированы и использованы в качестве антигенов для разработки вакцин. Например, основной поверхностный антиген вируса гепатита В, HbsAg, субъединица Р холерного токсина, энтеротоксин E. coli, белок циркумспорозита малярийного паразита и гликопротеиновый мембранный антиген из вируса Эпштейна-Барр, а также антигены опухолевых клеток экспрессированы в различных хорошо известных системах вектор/хозяин, очищены и использованы в вакцинах.

Пептидное производное флагеллина по изобретению индуцирует наследственно-обусловленный иммунный ответ посредством TLR5-опосредованной мукозальной системы, которая может полезно усиливать иммунный ответ на рекомбинантный антиген.

Патологически aberrантная клетка, которую нужно использовать в вакцине, может быть получена из любого источника, такого как один или более чем один индивидуум, страдающий патологическим состоянием, или клетки, культивируемые *ex vivo* или *in vitro*, полученные от одного или более чем одного такого индивидуума, включая конкретного индивидуума, подлежащего лечению полученной в результате вакциной.

Иммуномодуляторные молекулы

Ряд иммуномодуляторных молекул можно также использовать в комбинации с пептидным производным флагеллина по изобретению для изменения иммунного ответа у индивидуума. Тип желаемого изменения будет определять тип иммуномодуляторной молекулы, выбранной для комбинирования с указанным пептидным производным флагеллина по изобретению.

Например, для усиления наследственно-обусловленного иммунного ответа пептидное производное флагеллина по изобретению можно объединять с другой иммуномодуляторной молекулой, которая стимулирует наследственно-обусловленный иммунный ответ, такой как другие PAMP или консервативная область, известная или предполагаемая в отношении индукции наследственно-обусловленного иммунного ответа. Известно, что ряд PAMP стимулирует активности различных членов toll-подобного семейства рецепторов.

Такие PAMP можно объединять для стимулирования конкретной комбинации toll-подобных рецепторов, которые индуцируют благоприятный профиль цитокинов. Например, PAMP можно объединять для стимулирования профиля цитокинов, который индуцирует иммунный ответ Th1 или Th2.

Другие типы иммуномодуляторных молекул, которые стимулируют гуморальный или клеточно-опосредованный иммунные ответы, можно объединять с пептидным производным флагеллина по изо-

бретению. Например, можно вводить цитокины для изменения баланса иммунных ответов Th1 и Th2. Специалистам в данной области техники известно, как определить подходящие цитокины, полезные для получения благоприятного изменения в иммунном ответе на конкретное патологическое состояние.

Введение пептидного производного флагеллина по изобретению

Пептидное производное флагеллина по изобретению вводят в "иммуногенном количестве" с одной или более чем одной молекулой, которое предназначено для обозначения количества, необходимого для запуска иммунного ответа, например, антигеном или другой иммуномодуляторной молекулой.

Дозировка пептидного производного флагеллина по изобретению, независимо или в комбинации с одной или более чем одной молекулой, зависит, например, от патологического состояния, подлежащего лечению, от массы и состояния индивидуума и от предшествующих или сопутствующих терапий. Подходящее количество, которое считают иммуногенной дозой для конкретного применения способа, может быть определено специалистами в данной области техники. Специалистам в данной области техники понятно, что необходимо проводить мониторинг состояния пациента на протяжении всего курса терапии и что количество композиции, которое вводят, можно регулировать в соответствии с ответом пациента на терапию.

В качестве вакцинного иммуноадъюванта пептидные производные флагеллина по изобретению могут вносить вклад в эффективность вакцины посредством, например, усиления иммуногенности более слабых антигенов, таких как высокоочищенные или рекомбинантные антигены, уменьшения количества антигена, требующегося для иммунного ответа, снижения частоты иммунизации, требующейся для обеспечения защитного иммунитета, улучшают эффективность вакцин у индивидуумов со сниженными или ослабленными иммунными ответами, таких как новорожденные, пожилые индивидуумы и индивидуумы с иммунной недостаточностью, и усиливают иммунитет в ткани-мишени, такой как мукозальный иммунитет, или стимулируют клеточно-опосредованный или гуморальный иммунитет, вызывая конкретный профиль цитокинов.

Пептидное производное флагеллина по изобретению индуцирует наследственно-обусловленный иммунный ответ посредством активации системы TLR5, в частности, здесь TLR5-опосредованный мукозальный ответ при введении мукозальным путем.

В частности, в тестах *in vivo* показано, что пептидное производное флагеллина по изобретению проявляет мукозальную адъювантную активность, которая способна потенцировать системные и мукозальные ответы против антигена-мишени.

Наследственно-обусловленный иммунный ответ повышает иммунный ответ на антиген посредством стимуляции адаптивного иммунного ответа. Поэтому комбинация пептидного производного флагеллина по изобретению с одним или более чем одним антигеном обеспечивает эффективную иммуногенную композицию или вакцину для индукции иммунного ответа у индивидуума.

Комбинацию антигена и/или иммуномодуляторной молекулы с пептидным производным флагеллина по изобретению можно тестировать в ряде доклинических токсикологических исследований и исследований на безопасность, хорошо известных в данной области техники.

Например, такую комбинацию можно оценивать на животной модели, для которой обнаружено, что антиген является иммуногенным, и которую можно воспроизводимо иммунизировать тем же путем, который предложен для клинического испытания у людей.

Комбинацию антигена и/или иммуномодуляторной молекулы с пептидным производным флагеллина по изобретению можно тестировать, например, методом, описанным Center for Biologics Evaluation and Research/Food and Drug Administration and National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Goldenthal, K.L. et al. *AID Res Hum Retroviruses*, 9: S45-9 (1993)).

Специалистам в данной области техники известно, как определить конкретную комбинацию антигена и/или иммуномодуляторной молекулы с пептидным производным флагеллина по изобретению, подходящую полезную нагрузку антигена, путь введения, объем дозы, чистоту антигена и режим вакцинации, полезный для лечения конкретного патологического состояния у конкретного вида животного.

Иммуногенную композицию или вакцину по изобретению для индукции иммунного ответа можно вводить в виде раствора или суспензии вместе с фармацевтически приемлемой средой.

Такой фармацевтически приемлемой средой может быть, например, вода, фосфатно-солевой буферный раствор, нормальный физиологический раствор или другой физиологически забуференный солевой раствор, либо другой растворитель или носитель, такой как гликоль, глицерин и масло, такое как оливковое масло или инъекционный органический эфир. Фармацевтически приемлемая среда может также содержать липосомы или мицеллы и может содержать иммуностимулирующие комплексы, полученные путем смешивания полипептидных или пептидных антигенов с детергентом и гликозидом, таким как Quil A.

Дополнительные способы получения и введения пептидного производного флагеллина по изобретению в фармацевтически приемлемой среде представлены ниже, со ссылкой на соединения, которые индуцируют TLR5-опосредованный мукозальный ответ.

Иммуногенную композицию или вакцину по изобретению можно вводить разными путями для стимуляции иммунного ответа. Например, эти иммуномодуляторные молекулы могут быть доставлены

подкожно, внутривожно, внутриволимфатически, внутривомышечно, внутриво опухоли, интравезикально, внутриво брюшинно и интравесибрально.

Специалистам в данной области техники известно, как выбрать соответствующие пути доставки для конкретных препаратов пептидных производных флагеллина по изобретению.

В предпочтительном воплощении изобретения способы вакцинации для лечения или предупреждения инфекции у млекопитающего включают применение вакцины по изобретению, которую вводят, в частности, на поверхность слизистой оболочки (например, глазной, интраназальной, ротовой, желудочной, легочной, кишечной, ректальной, вагинальной или мочевых путей).

Назальные пути доставки могут быть полезны для индукции как мукозального, так и системного иммунного ответа. Возможен ряд устройств для удобной и эффективной доставки препаратов в носовую полость и легочные ткани.

Назальный путь доставки в данной заявке может представлять особый интерес, поскольку пептидное производное флагеллина по изобретению проявляет значительную адьювантную активность в компартменте слизистой оболочки, не обладая каким-либо значительным системным провоспалительным побочным эффектом.

В протоколе вакцинации вакцину можно предпочтительно вводить мукозальным путем в виде единственной дозы или предпочтительно несколько раз, например два, три или четыре раза, через недельные или месячные интервалы в соответствии с режимом первичной/бустерной вакцинации. Подходящая дозировка зависит от различных параметров.

Протокол вакцинации может представлять собой строго мукозальный протокол или смешанный протокол, при котором первичную дозу вакцины вводят мукозальным, например интраназальным путем, в бустерную дозу(ы) вводят парентерально, или наоборот.

Препарат

Способы получения фармацевтических препаратов или композиций включают стадию приведения активного ингредиента(ов) в контакт с носителем и, возможно, одним или более чем одним вспомогательным ингредиентом.

Как правило, препараты готовят путем однородного и тесного приведения активного ингредиента(ов) в контакт с жидкими носителями, либо с тонко измельченными твердыми носителями, либо с теми и с другими, а затем при необходимости формования продукта.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения активных ингредиентов включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту(ам) жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масло, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и эфиры жирных кислот и сорбитана, а также их смеси.

Кроме инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать адьюванты, такие как увлажняющие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, корригенты, красители, ароматизаторы и консерванты.

Суспензии, в дополнение к активному ингредиенту(ам), могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и эфиры сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также их смеси.

Препараты фармацевтических композиций по изобретению для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория, который можно готовить путем смешивания активного ингредиента(ов) с одним или более чем одним подходящим не раздражающим эксципиентом или носителем, включающим, например, масло какао, полиэтиленгликоль, воск для суппозитория или салицилат, и который является твердым при комнатной температуре, но жидким при температуре тела, и, следовательно, плавится в прямой кишке или в полости влагалища и высвобождает активный ингредиент(ы). Препараты по настоящему изобретению, которые подходят для вагинального введения, также включают препараты в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пенки или спреев, содержащие такие носители, которые известны в данной области техники как подходящие.

Фармацевтические композиции по данному изобретению, подходящие для парентерального введения, содержат активный ингредиент(ы) в комбинации с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым стерильным изотоническим водным или неводным раствором, дисперсией, суспензией или эмульсией, либо стерильными порошками, которые можно восстанавливать в стерильных инъекционных растворах или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, растворенные вещества, которые делают препарат изотоническим с кровью предназначенного реципиента, либо суспендирующие или загущающие агенты.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевти-

ческих композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использовании поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Может быть также желательно включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы можно вызвать за счет включения агентов, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Инъекционные депо-препараты готовят путем формирования микроинкапсулирующих матриц активного(ых) ингредиента(ов) в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от отношения активного(ых) ингредиента(ов) к полимеру и от природы конкретного используемого полимера можно регулировать скорость высвобождения активного(ых) ингредиента(ов). Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды).

Инъекционные депо-препараты также готовят путем включения активного(ых) ингредиента(ов) в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканью организма. Инъекционные материалы можно стерилизовать, например, фильтрованием через фильтр, задерживающий бактерии.

Препараты могут быть представлены в герметичных контейнерах, содержащих однократную дозу или многократные дозы, например, в ампулах и флаконах, и их можно хранить в лиофилизированном состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии можно готовить из стерильных порошков, гранул и таблеток вышеописанного типа.

Количество антигена и иммуноадъювантного соединения в вакцинной композиции в соответствии с изобретением, вводимые дозы определяют методами, хорошо известными специалистам в области фармацевтики, с учетом таких факторов, как конкретный антиген, возраст, пол, масса, вид и состояние конкретного животного или пациента, а также путь введения.

В предпочтительном воплощении вакцинная композиция в соответствии с изобретением дополнительно содержит один или более чем один компонент, выбранный из группы, состоящей из поверхностно-активных веществ, стимуляторов всасывания, полимеров, поглощающих воду, веществ, которые ингибируют ферментативное расщепление, спиртов, органических растворителей, масел, агентов, регулирующих pH, консервантов, агентов, регулирующих осмотическое давление, пропеллентов, воды и их смесей.

Вакцинная композиция в соответствии с изобретением может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Количество носителя будет зависеть от количества, выбранных для других ингредиентов, желаемой концентрации антигена, выбора пути введения, перорального или парентерального, и т.д. Носитель можно добавлять к вакцине в любое удобное время. В случае лиофилизированной вакцины носитель можно, например, добавлять непосредственно перед применением. Альтернативно, конечный продукт можно готовить с носителем.

Примеры подходящих носителей включают, но не ограничены ими, стерильную воду, физиологический раствор, буферы, фосфатно-солевой буферный раствор, забуференный хлорид натрия, растительные масла, минимальную эссенциальную среду (MEM), MEM с буфером HEPES и т.д.

Возможно, вакцинная композиция по изобретению может содержать традиционные вторичные адъюванты в варьирующих количествах в зависимости от адъюванта и от желаемого результата. Общепринятое количество находится в интервале от примерно 0,02 до примерно 20% мас./мас., в зависимости от других ингредиентов и от желаемого эффекта.

Примеры подходящих вторичных адъювантов включают, но не ограничены ими, стабилизаторы; эмульгаторы; гидроксид алюминия; фосфат алюминия; регуляторы pH, такие как гидроксид натрия, соляная кислота и т.д.; поверхностно-активные вещества, такие как Tween.RTM.80 (полисорбат 80, имеющийся в продаже от фирмы Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.); липосомы; иском-адъювант; синтетические гликопептиды, такие как мурамилдипептиды; разбавители, такие как декстран или комбинации декстрана, например, с фосфатом алюминия; карбоксиполиметилен; бактериальные клеточные стенки, такие как экстракт клеточной стенки микобактерий; их производные, такие как *Corynebacterium parvum*; *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis*, например, коровья бацилла Кальметта-Герена (БЦЖ); белки вируса осповакцины или поксвирусов животных; адъюванты субвирусных частиц, такие как орбивирус; холерный токсин; N,N-диоктадецил-N',N'-бис(2-гидроксиэтил)-пропандиамин (пиридин); монофосфориллипид А; диметилдиоктадециламмония бромид (DDA, имеющийся в продаже от фирмы Kodak, Rochester, N.Y.); синтетические адъюванты и их смеси. Желательно гидроксид алюминия смешивают с другими вторичными адъювантами или с иммуноадъювантом, таким как Quil А.

Примеры подходящих стабилизаторов включают, но не ограничены ими, сахарозу, желатин, пептон, переваренные белковые экстракты, такие как NZ-амин или NZ-амин AS. Примеры эмульгаторов

включают, но не ограничены ими, минеральное масло, растительное масло, арахисовое масло и другие стандартные метаболизируемые нетоксичные масла, полезные для инъекционных или интраназальных вакцинных композиций.

Для целей данного изобретения эти адъюванты идентифицированы в данной заявке как "вторичные", исключительно в противоположность вышеописанному иммуноадъювантному соединению, состоящему из активатора ГТФ-азы семейства Rho, который является существенным ингредиентом в вакцинной композиции для его эффекта в комбинации с антигенным веществом, чтобы значительно повысить гуморальный иммунный ответ на антигенное вещество. Вторичные адъюванты, в основном, включают в препарат вакцины в качестве технологических добавок, хотя некоторые адъюванты действительно обладают до некоторой степени иммунологическими усиливающими свойствами и имеют двойное назначение.

Традиционные консерванты можно добавлять в вакцинную композицию в эффективных количествах, находящихся в интервале от примерно 0,0001 до примерно 0,1% мас./мас. В зависимости от консерванта, используемого в препарате, могут быть полезны количества ниже или выше данного интервала. Типичные консерванты включают, например, сорбат калия, метабисульфит натрия, фенол, метилпарабен, пропилпарабен, тимеросал и т.д.

Выбор инактивированного, модифицированного или другого типа вакцинной композиции и способа получения усовершенствованного препарата вакцинной композиции по настоящему изобретению известен или может быть легко определен обычными специалистами в данной области техники.

Фармакологически эффективное количество иммуноадъювантного соединения в соответствии с изобретением можно давать, например, перорально, парентерально или иным путем, и предпочтительно мукозальным путем, одновременно, последовательно или через короткое время после введения антигенного вещества, чтобы потенцировать, ускорить или продлить иммуногенность антигена.

Хотя дозировка вакцинной композиции конкретно зависит от антигена, вида хозяина, вакцинированного или подлежащего вакцинации и т.д., дозировка фармакологически эффективного количества вакцинной композиции обычно будет находиться в диапазоне от примерно 0,01 до примерно 500 мкг (и, в частности, от 50 до примерно 500 мкг) иммуноадъювантного соединения по изобретению на дозу (в частности, на основании результатов, представленных на фиг. 6).

Хотя количество конкретного антигенного вещества в комбинации влияет на количество иммуноадъювантного соединения в соответствии с изобретением, необходимое для улучшения иммунного ответа, подразумевается, что практикующий врач сможет легко регулировать количество эффективной дозы иммуноадъювантного соединения посредством рутинных тестов для соответствия конкретным обстоятельствам.

Как общее правило, вакцинную композицию по настоящему изобретению удобно вводить перорально, парентерально (подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно или внутрибрюшинно), интрабуккально, интраназально или чрескожно. Путь введения, рассмотренный настоящим изобретением, будет зависеть от антигенного вещества и сопутствующих веществ препарата. Например, если вакцинная композиция содержит сапонины, хотя они нетоксичны перорально или интраназально, необходимо заботиться о том, чтобы не инъектировать сапогениновые гликозиды в кровоток, поскольку они действуют как сильные гемолитики. Также многие антигены не будут эффективны при пероральном приеме. Предпочтительно вакцинную композицию вводят подкожно, внутримышечно или интраназально.

Дозировка вакцинной композиции будет зависеть конкретно от выбранного антигена, от пути введения, от вида и от других стандартных факторов. Подразумевается, что обычный специалист в данной области техники может легко и быстро титровать соответствующую дозу для иммуногенного ответа на каждый антиген для достижения эффективного иммунизирующего количества и способа введения.

Как уже указано в настоящем описании в других частях, еще одним объектом изобретения является вакцинная композиция по изобретению для введения на поверхность слизистой оболочки.

Данный путь введения представляет огромный интерес. Действительно, слизистые оболочки содержат многочисленные дендритные клетки и клетки Лангерганса, которые являются превосходными антиген-обнаруживающими и антиген-представляющими клетками. Слизистые оболочки также связаны с лимфоидными органами, называемыми лимфоидной тканью, ассоциированной со слизистой, которые способны направлять иммунный ответ в другие области слизистой оболочки. Примером такого эпителия является носовая эпителиальная оболочка, которая состоит практически из одного слоя эпителиальных клеток (многорядного эпителия), и слизистая оболочка в верхних дыхательных путях соединена с двумя лимфоидными тканями, аденоидами и миндалинами. Обширная сеть кровеносных капилляров под слизистой оболочкой носа с высокой плотностью В- и Т-клеток особенно подходит для обеспечения быстрого распознавания антигена и обеспечивает быстрый иммунологический ответ.

Предпочтительно поверхность слизистой оболочки выбрана из группы, состоящей из поверхностей слизистой оболочки носа, легких, рта, глаза, уха, желудочно-кишечного тракта, половых путей, влагалища, прямой кишки и кожи.

Примеры

Пример 1. Иммуноадьювантный эффект флагеллинов с делегированной гипервариабельной областью.

Материалы и методы

Получение рекомбинантных флагеллинов.

Рекомбинантные флагеллины имели происхождение от флагеллина FliC *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ATCC14028 (номер доступа AAL20871).

Флагеллины FliC и FliC_{Δ205-293} либо выделяли из штаммов *S. typhimurium* SIN22 (fljB) и SJW46, как описано ранее (Yoshioka et al, 1995. Flagellar filament structure and cell motility of *Salmonella typhimurium* mutants lacking part of the outer domain of flagellin. *J. Bacteriol.* 177:1090-1093; Didierlaurent et al, 2004. Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response. *J. Immunol.* 172:6922-6930; Siervo et al, 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13722-13727), либо приобретали у Alexis Biochemicals (Switzerland).

Конструкции, кодирующие FliC_{Δ174-400} и FliC_{Δ191-352}, получали с помощью ПЦР на pBR322-производной плазмиде, несущей ген дикого типа fliC SEQ ID NO:3 под контролем его собственного промотора, и используя приведенные ниже пары праймеров: AGCACcattcagcgtatccagacc (SEQ ID NO:15) / GCTGGTgctacaaccsagaac (SEQ ID NO:16) и TCGAGatattctgtaacagttgcagcc (SEQ ID NO:17) / AC-TCGAGgacggtacatccaaaactgcac (SEQ ID NO:18) (основания, кодирующие линкер, выделены курсивом).

Сайт-направленный мутагенез также проводили на плазмиде, несущей FliC_{Δ174-400}, с целью замещения остатков 89-96 (QVRRELAV), вовлеченных в обнаружение TLR5, соответствующими последовательностями из не сигнального флагеллина (DTVKVKAT); полученный в результате белок, таким образом, представлял собой FliC_{Δ174-400/89-96*}.

В FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ191-352} и FliC_{Δ174-400/89-96*} аспарагин, локализованный за 6 остатков от конца, был заменен на серин.

Укороченные флагеллины очищали из надосадочной жидкости рекомбинантного *S. typhimurium* SIN41 (fliC fljB), как описано ниже. Сальмонеллу выращивали в среде Лурия-Бертани (LB) в течение 18 ч при 37°C при встряхивании. Надосадочную жидкость фильтровали и насыщали 60% сульфатом аммония (Sigma Aldrich, USA). Осажденные вещества выделяли центрифугированием, солубилизацией в 20 мМ Трис/HCl pH 7,5, а затем диализом. Белки дополнительно очищали путем последовательных раундов хроматографии на гидроксипатите и анионообменной хроматографии (Bio-Rad Laboratories, USA). Наконец, белки истощали по липополисахариду (LPS), используя колонку с полимиксином В (Pierce, USA). Используя анализ Limulus (Associates of Cape Cod Inc., USA), концентрацию остаточного LPS определили как менее чем 30 пг LPS на мкг рекомбинантного флагеллина.

Когда указано, флагеллины обрабатывали в течение 1 ч при 37°C 0,017% трипсином-ЭДТА (Invitrogen, USA) для полного гидролиза белков с последующим нагреванием при 70°C в течение 1 ч для инактивации трипсина. Белки анализировали, используя стандартный электрофорез ДСН-ПААГ и иммуноблоттинг с FliC-специфичными поликлональными антителами.

Эксперименты на животных

Самки мышей NMRI (6-8-недельного возраста) приобретали у Charles River Laboratories (France) и поддерживали в специальном виварии, свободном от патогенов, в зарегистрированной организации (#A59107; Institut Pasteur de Lille). Все эксперименты выполняли с соблюдением существующих национальных и ведомственных норм и руководств по этике.

Для гипериммунизации животных инъецировали подкожно (п.к.) флагеллином FliC (1 мкг на инъекцию), эмульгированным в 200 мкл полного адьюванта Фрейнда (CFA)/PBS на сутки 1 и неполного адьюванта Фрейнда (IFA)/PBS на сутки 21, 35 и 49. На сутки 63 мышам давали 200 мкл флагеллина/PBS внутривенно (в.в.) и умерщвляли их через 2 ч путем внутрибрюшинной (в.б.) инъекции 5 мг пентобарбитала натрия (CEVA Santé Animale, France) для отбора образцов и анализа сыворотки и тканей.

Для характеристики мукозального наследственно-обусловленного ответа и адьювантных свойств 20 мкл PBS с белками или без белков вводили интраназально (и.н.) мышам, анестезированным в.б. 1,5 мг кетамина (Merial, France) и 0,3 мг ксилазина (Bayer, Germany) на животное массой 25 г.

Для исследования провоспалительных ответов отбор образцов у мышей проводили либо через 2 ч (для анализов РНК и генной экспрессии), либо через 6 ч (для тестирования продуцирования цитокинов).

Для анализов иммунизации мышам вводили и.н. PBS с овальбумином (OVA), истощенным по LPS, или без него (20 мкг, Sigma, сорт VII, USA) с флагеллинами (1 мкг) или без флагеллинов на сутки 1 и 21. Образцы бронхоальвеолярных лаважей (BAL) и сыворотки отбирали на сутки 35.

Для оценки нейтрализации иммунную и контрольную сыворотки нагревали в течение 30 мин при 56°C, чтобы инактивировать комплемент. Серийные разведения сыворотки (в 200 мкл PBS) пассивно переносили животным в.в. путем за 1 ч до системной активации флагеллинами. В некоторых экспериментах сыворотки смешивали с флагеллинами, разведенными в PBS, и вводили и.н. для тестирования мукозальной нейтрализации.

BAL собирали после интратрахеальной инъекции 1 мл PBS с полной смесью ингибиторов протеаз (Roche, Switzerland) и осветляли центрифугированием.

Образцы крови собирали и подвергали свертыванию при комнатной температуре, после чего отделяли сыворотку путем центрифугирования.

Белковые экстракты легких получали путем гомогенизации ткани с 2 мл реагента для экстракции белков из тканей T-PER (Pierce, USA) с добавлением ингибиторов протеаз. Все образцы хранили при -80°C до анализа.

Анализ антиген-специфичных ответов антител

Уровни OVA- или флагеллин-специфичных антител в образцах сыворотки и BAL оценивали, используя твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA).

Кратко, OVA (20 мкг на лунку в фосфатном буфере 0,2 М pH 6,5) и флагеллин FLiC (100 нг на лунку в PBS) наносили на микропланшеты MaxiSorp (Nalge Nunc Int., USA) в течение ночи при 4°C . Все микропланшеты промывали смесью PBS/Твин 20 0,05%, а затем блокировали смесью PBS/сухое молоко 1% в течение 1 ч при комнатной температуре.

Серийные разведения образцов инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре до проявления. Биотинилированные антитела IgG или IgA против мыши (Southern Biotechnology Associates, USA), HRP-конъюгированный стрептавидин (GE Healthcare, USA) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Becton Dickinson Bioscience, USA) использовали в качестве реагентов для проявления. Реакцию останавливали добавлением H_2SO_4 и определяли OD при 450 нм.

Титр IgG определяли как соответствующий самому высокому разведению образца, дающему значение поглощения 0,15 OD для OVA и 0,5 OD для FLiC, и систематически сравнивали с референсной сывороткой. Титры приведены в виде геометрических средних титров от индивидуальных мышей.

Уровни суммарного IgA и OVA-специфичного IgA в BAL измеряли и нормализовали, используя калибровочную кривую с имеющимся в продаже IgA мыши (Sigma). Удельное отношение IgA (выраженное в нг OVA-специфичного IgA на мкг суммарного IgA) определяли для каждой мыши.

Цитокин-специфичный ELISA и генная экспрессия

Уровни CXCL2 и CCL20 мыши и IL-8 (CXCL8) человека измеряли в сыворотке, BAL, суммарной надосадочной жидкости легкого и/или культуры клеток, используя коммерческие наборы ELISA (R&D Systems, USA).

Суммарную РНК из легких мыши экстрагировали, используя набор Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Germany), и подвергали обратной транскрипции с помощью набора High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, USA). Полученную в результате кДНК амплифицировали, используя ПЦР в реальном времени SYBR Green-based real-time PCR (Applied Biosystems).

Специфичными праймерами являются CGTCATCCATGGCGAACTG (SEQ ID NO:19) / GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT (SEQ ID NO:20) (ACTB, кодирующая β -актин), TTTTGGGATGGAATTGGACAC (SEQ ID NO:21) / TGCAGGTGAAGCCTTCAACC (SEQ ID NO:22) (CCL20) и CCCTCAACGGAAGAACCAAA (SEQ ID NO:23) / CACATCAGGTACGATCCAGGC (SEQ ID NO:24) (CXCL2). Относительные уровни мРНК ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) определяли путем сравнения (а) порогов числа циклов ПЦР (Ct) для интересующего гена и ACTB (ΔCt) и (б) значений ΔCt для обработанных и контрольных групп ($\Delta\Delta\text{Ct}$), как описано ранее (Sierra et al, 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:13722-13727).

Анализы на клеточной основе

Линия клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 была стабильно трансфицирована плазмидой, несущей ген люциферазы под контролем промотора CCL20 человека (Rumbo et al, 2004, Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. Gastroenterol. 127:213-223) с получением линии Caco-Rumbo.

Эти эпителиальные клетки кишечника выращивали в модифицированной Дульбекко среде Игла с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка, 10 мМ HEPES, заменимых аминокислот 1X, пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 ед./мл) и (для селекции трансгена) 0,7 мг/мл G418 (Invitrogen).

Линию бронхиальных эпителиальных клеток человека BEAS-2B культивировали в питательной среде Kaigh's F12 с добавками, как для среды Caco-Rumbo плюс 1 мМ пируват натрия и смесь инсулина, трансферрина и селена (Invitrogen).

Клетки стимулировали рекомбинантными флагеллинами в течение 6 ч для анализов люциферазы или в течение 16 ч перед сбором надосадочной жидкости для ELISA.

Активность люциферазы в клеточных экстрактах измеряли, используя набор Bright Glo Luciferase Assay (Promega, USA). Относительную люминесценцию (RLU) нормализовали в виде процента максимальной активности с флагеллином дикого типа для теста на активацию рекомбинантными флагеллинами. Для теста нейтрализации *in vitro* RLU нормализовали в виде процента максимальной активности для каждого белка: $[(\text{RLU}_{\text{обработанный}}/\text{RLU}_{\text{необработанный}})/(\text{RLU}_{\text{макс}}/\text{RLU}_{\text{необработанный}})] \times 100$.

Статистический анализ

Статистические различия анализировали, используя критерий Манна-Уитни, и считали значимыми

для значений $p < 0,05$. Если не указано иное, результаты выражали в виде арифметических средних \pm стандартное отклонение.

Результаты

Делеция гипервариабельной области флагеллина придает антигенность, но не модифицирует TLR5-стимулирующую активность

Две новых молекулы флагеллина (FliC $_{\Delta 191-352}$ и FliC $_{\Delta 174-400}$, состоящие соответственно из 336 и 271 аминокислот) были сконструированы путем внутренней делеции (фиг. 1A).

В качестве контроля авторы изобретения использовали охарактеризованный ранее вариант FliC $_{\Delta 204-292}$, который имел частичную делецию в антигенном домене (Yoshioka et al, 1995, Flagellar filament structure and cell motility of Salmonella typhimurium mutants lacking part of the outer domain of flagellin. J. Bacteriol. 177:1090-1093) (фиг. 1A).

В качестве отрицательного контроля для экспериментов *in vitro* и *in vivo* мутации, которые придают передачу сигнала TLR5, вводили в FliC $_{\Delta 174-400}$ с получением рекомбинантного белка FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$.

Предсказанные структуры соответствующих флагеллинов показали, что мотив 89-96 и общая структура консервативных областей не были изменены (фиг. 1A).

За исключением FliC $_{\Delta 204-292}$, эти варианты были неспособны комплементировать подвижность бактерий с дефицитом по флагеллину и секретировались в культуральную среду.

Затем авторы изобретения оценивали собственную антигенность рекомбинантных флагеллинов. С этой целью насыщающие концентрации флагеллинов наносили на микропланшеты и тестировали с помощью ELISA, используя гипериммунную сыворотку, специфичную к FliC или FliC $_{\Delta 174-400}$.

Как проиллюстрировано на фиг. 1B, авторы наблюдали титры антител в 3-10-раз ниже, когда сыворотку анти-FliC титровали против вариантов FNC, чем против FliC дикого типа.

Напротив, реактивность гипериммунной сыворотки, специфичной к FliC $_{\Delta 174-400}$, была сходной независимо от флагеллина-мишени (фиг. 1C).

Эти результаты подтверждают, что центральная гипервариабельная область является основной мишенью для антител анти-флагеллин.

Наконец, авторы изобретения решили установить, сохраняют ли рекомбинантные молекулы какую-либо TLR5-стимулирующую активность.

Анализ доза-ответ проводили, используя репортерные клетки Caco-Rumbo и клеточную линию легочного эпителия BEAS-2B. Активацию оценивали путем измерения активности люциферазы в клетках Caco-Rumbo и секреции IL-8 клетками BEAS-2B (клеточные линии кишечного эпителия человека являются уникальными репортерами флагеллин/TLR5-стимуляторной активности на основании экспрессии хемокина CCL20, также известного как "хемокины, активируемые и регулируемые печенью" или LARC, и IL-8).

Как показано на фиг. 2A-B, FliC $_{\Delta 204-292}$, FliC $_{\Delta 191-352}$ и FliC $_{\Delta 174-400}$ все были сильными клеточными активаторами. Соответствующие значения EC50 флагеллинов слегка варьировали в зависимости от клеточного типа, но попадали в пределы описанного ранее интервала в нг/мл (Smith et al, 2003, Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin protofilament formation and bacterial motility. Nat. Immunol. 4:1247-1253).

Было обнаружено, что активность рекомбинантных флагеллинов полностью зависит от TLR5, поскольку FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ был неспособен активировать эпителиальные клетки.

Потребность в передаче сигнала TLR5 была дополнительно подтверждена путем использования макрофагов костного мозга, выделенных из TLR5-дефицитных мышей; клетки не синтезировали никакого IL-12 p40 при стимуляции рекомбинантными флагеллинами (данные не показаны).

Делетированные флагеллины стимулируют TLR5-зависимые мукозальные наследственно-обусловленные ответы

Стимуляция TLR5 рекомбинантными флагеллинами была затем исследована *in vivo* мукозальным путем.

С этой целью экспрессию CCL20 и CXCL2 в легких мышей, обработанных и.н. флагеллинами, количественно определяли, используя кОТ-ПЦР (фиг. 2C).

В течение 2 ч уровни мРНК CCL20 в легких были примерно в 30 раз выше у животных, обработанных флагеллином дикого типа или рекомбинантными флагеллинами, чем у мышей, обработанных контролем.

Кроме того, продуцирование хемокина CCL20 обнаруживали через 6 ч после инстилляций, и в гомогенатах легких, и в BAL (фиг. 2D). В контрольных экспериментах FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ и флагеллины, расщепленные трипсином, не индуцировали данный тип эффекта. Подобные открытия наблюдали для CXCL2 (данные не показаны).

Эти результаты подтвердили, что провоспалительный ответ *in vivo* исключительно был следствием рекомбинантных флагеллинов.

В целом флагеллины с делециями в гипервариабельной области проявляли мукозальные провоспалительные свойства, эквивалентные свойствам соответствующего FNC дикого типа.

Рекомбинантные флагеллины проявляют мукозальную адьювантную активность

С целью характеристики адьювантных свойств рекомбинантных молекул, полученных авторами изобретения, исследовали ответы антител в сыворотке и секретах после и.н. иммунизации.

В качестве модельного антигена использовали овальбумин (OVA), включенный в препарат с различными флагеллинами или без флагеллинов или с холерным токсином (СТ) в качестве эталонного мукозального адьюванта.

Совместное введение FliC с OVA значительно повышало ответ OVA-специфичного IgG (как в сыворотке, так и в BAL, примерно в 300 и в 100 раз, соответственно) по сравнению с животными, иммунизированными только OVA (фиг. 3A-B).

Кроме того, ответ OVA-специфичного IgA был усилен в BAL, подтверждая, что FliC стимулирует прототипичный ответ секреторных антител мукозального адьюванта (фиг. 3C). Интересно, что эффект FliC был сходным с таковым для СТ.

Подобно FliC, рекомбинантные флагеллины FliC_{Δ204-292}, FliC_{Δ191-352} и FliC_{Δ174-400} были, таким образом, способны потенцировать системный и мукозальный ответы.

Напротив, у FliC_{Δ174-400/89-96*} и флагеллинов, обработанных трипсином, отсутствовала эффективность (фиг. 3 и табл. 1).

Следовательно, делеция гипервариабельной области флагеллинов не оказывает значительного влияния на TLR5-опосредованные мукозальные адьювантные свойства. Данные авторов изобретения также показали, что соответствующие эффекты рекомбинантных молекул на наследственно-обусловленный и адаптивный иммунитет коррелируют.

Делеция гипервариабельной области придает способность продуцировать антитела антифлагеллин

Ожидают, что делеция антигенного домена снижает флагеллин-специфичный иммунный ответ и, следовательно, какую-либо нейтрализацию TLR5-опосредованного иммунитета, в частности, при повторном введении.

Поэтому авторы изобретения решили оценить эффективность и.н. иммунизации в отношении индукции FliC-специфичных антител.

Как показано, FliC вызывал сильный ответ IgG в сыворотке и BAL (табл. 1 и фиг. 4). Напротив, FliC_{Δ204-292} запускал в 10 раз более низкие уровни антител в обеих жидкостях, чем FliC, и более выраженный эффект наблюдали после иммунизации FliC_{Δ191-352} и FliC_{Δ174-400}.

В заключение, антигенный и иммуностимулирующий домены флагеллинов функционально разобщены. Поэтому FliC_{Δ191-352} и FliC_{Δ174-400} являются молекулами, представляющими интерес для предупреждения или аттенуации образования флагеллин-специфичных антител с нейтрализующей активностью.

Флагеллин-специфичные антитела нейтрализуют TLR5-опосредованную передачу сигнала

Известно, что бактериальные флагеллины вызывают сильные ответы антител, которые в основном направлены против гипервариабельной области. Авторы изобретения выдвинули гипотезу, что антитела анти-флагеллин должны нейтрализовать TLR5-стимулирующую активность флагеллинов.

Следовательно, мышей иммунизировали п.к. флагеллином FliC или контрольным препаратом (одним PBS или нерелевантным антигеном овальбумином (OVA), включенным в CFA) с последующими бустер-иммунизациями IFA. Анализы ELISA выявили, что сыворотки анти-FliC проявляли специфичные титры IgG более 10⁶, тогда как титры контрольных сывороток были ниже порога обнаружения анализа (10²).

Как упомянуто выше, клеточные линии кишечного эпителия человека полезны в качестве уникальных репортеров флагеллин/TLR5-стимулирующей активности, основанных на экспрессии хемокина CCL20 (также известного как "активируемый и регулируемый печенью хемокин", LARC).

Таким образом, используя клетки Caco-Rumbo, несущие ген люциферазы под контролем промотора CCL20, здесь продемонстрировано, что сыворотка анти-FliC способна полностью нейтрализовать агонистическую активность FliC в отношении TLR5 (фиг. 5A).

Нейтрализующий эффект FliC-специфичных антител на передачу сигнала TLR5, таким образом, непосредственно оценивали у иммунизированных животных. С этой целью исследовали системные провоспалительные ответы у мышей (продуцирование хемокинов CCL20 и CXCL2) после в.в. инъекции FliC (фиг. 5B-C).

У животных, иммунизированных контролем, провокация FliC запускала значительное повышение сывороточных уровней CCL20 и CXCL2 по сравнению с провокацией PBS.

Напротив, продуцирование хемокинов у FliC-иммунизированных животных не было усилено ни одной из провокаций. Используя пассивный перенос сыворотки у интактных животных, обнаружили близкую корреляцию между количеством инъецированного антитела и системным наследственно-обусловленным ответом, как показано на фиг. 5D.

В заключение, заранее существующий иммунитет к флагеллину может нейтрализовать последующую TLR5-стимулирующую активность как *in vitro*, так и *in vivo*.

Это не имеет места в случае FliC_{Δ174-400}, у которого сильно нарушена способность к стимуляции

продуцирования флагеллин-специфичных антител, включая нейтрализующие антитела, как раскрыто выше в соответствии с фиг. 4.

Были определены эффективные дозы, необходимые для инициации TLR5-опосредованных наследственно-обусловленных ответов и.н. путем. FliC и FliC_{Δ174-400} проявляли сходные кривые доза-ответ, и доза 0,1 мкг была выбрана для последующих анализов нейтрализации (фиг. 6).

С этой целью животных подвергали гипериммунизации и.н. FNC, чтобы вызвать сильные ответы FliC-специфичных IgG (средний титр примерно 45000), а затем подвергали провокации и.н. 0,1 мкг флагеллинов FNC или FliC_{Δ174-400}. Проводили мониторинг продуцирования провоспалительных хемокинов в BAL.

Провокация FliC или FliC_{Δ174-400} приводила к продуцированию CCL20 (4,28±1,98 по сравнению с 1,08±0,54 нг/мл и 2,48±1,22 по сравнению с 0,93±0,48 нг/мл у животных, иммунизированных контролем или FliC, соответственно), что наблюдали у интактных животных.

Мукозальный и системный TLR5-зависимые ответы в различной степени зависят от гипервариабельной области флагеллина

Авторы изобретения также хотели исследовать нейтрализацию флагеллин-специфичными антителами TLR5-зависимых ответов, индуцированных после в.в. инъекции рекомбинантных флагеллинов.

Для анализа системной активации наследственно-обусловленного иммунитета продуцирование в кровообращении провоспалительных хемокинов CCL20 и CXCL2 измеряли с помощью ELISA в сыворотке (фиг. 7).

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что у FliC_{Δ174-400} была примерно в 100 раз нарушена его способность к запуску системных провоспалительных иммунных ответов по сравнению с FliC дикого типа.

Если 10 мкг FliC_{Δ174-400} стимулировали небольшое продуцирование хемокинов, у варианта, мутированного внутри мотива TLR5 FliC_{Δ174-400/89-96*}, отсутствовала активность (0,85±0,27 по сравнению с 0,02±0,00 нг/мл для CCL20).

Это было противоположным FliC_{Δ204-292} и FliC_{Δ191-352}, которые оба были сильными активаторами, подобными FliC.

Следовательно, определенные молекулярные детерминанты на гипервариабельной области (или зависимые от последней) требуются для системной стимуляции TLR5, но не мукозальной стимуляции TLR5. Взятые вместе, результаты авторов изобретения показывают, что активация TLR5 в мукозальном и системном компартаментах регулируется разными механизмами.

Пример 2. Биологическая активность флагеллинов с делетированной гипервариабельной областью, выбранных из группы, состоящей из FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405}.

Получение рекомбинантных флагеллинов с делетированной гипервариабельной областью

Различные флагеллины с делетированной гипервариабельной областью продуцировали рекомбинантным путем, осуществляя тот же способ, который раскрыт выше в примере 1, а именно FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405} и FliC_{Δ100-405}.

На фиг. 8 и 9 изображены анализы указанных белков, полученных рекомбинантным путем.

На фиг. 8 показан результат электрофореза ДСН-ПААГ, который проведен на рекомбинантных белках, собранных из надосадочной жидкости культуры из соответствующих рекомбинантных бактериальных клеток *S. typhimurium* SIN41 после стадии осаждения белка трихлоруксусной кислотой (ТХУ).

На фиг. 9 показан результат Вестерн-блот-анализа с использованием поликлональных антител анти-FliC, который проведен на надосадочной жидкости культуры из соответствующих рекомбинантных бактериальных клеток *S. typhimurium* SIN41 после стадии осаждения белка ТХУ.

Биологическая активность флагеллинов с делетированной гипервариабельной областью FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405}

Эффект FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405} на индукцию CCL20 и CXCL2 анализировали путем проведения цитокин-специфичного анализа ELISA, который описан в примере 1.

Кратко, СЗН/НеJ (TLR4-дефицитные) инъецировали внутрибрюшинно 10 мкг различных рекомбинантных флагеллинов, делетированных от положений 174-400, 161-405 и 138-405.

Через 2 ч отбирали образцы сыворотки и обрабатывали для цитокин-специфичного ELISA (CCL20 и CXCL2).

Препарат флагеллина был получен из надосадочной жидкости рекомбинантных *Salmonella*, которую предварительно осаждали сульфатом аммония и подвергали диализу (фиг. 8 и 9). Поскольку этот неочищенный препарат может быть загрязнен эндотоксином, авторы изобретения использовали мышей с дефицитом по передаче сигнала TR4, так как LPS может быть основным загрязнителем в этом неочищенном препарате. Кроме того, авторы изобретения использовали обработку трипсином, чтобы продемонстрировать, что биологическая активность присутствует в белковой фракции неочищенных препаратов.

Результаты изображены на фиг. 10 (индукция CCL20) и 11 (индукция CXCL2).

Результаты фиг. 10 и 11 подтверждают, что рекомбинантные флагеллины FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405}

компетентны к передаче сигнала *in vivo*, как описано для FHC_{Δ174-400}.

Эти результаты подтверждают, что FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405} являются эффективными агонистами TLR5 и, следовательно, могут представлять собой эффективные адъювантные соединения.

Пример 3. Адъювантное действие FliC_{Δ174-400} на иммунные ответы против антигена gp140 из вируса HIV1.

Протоколы иммунизации и анализ ответов антиген-специфичных антител являются такими же, как описано в примере 1, за исключением конкретных признаков, которые могут быть указаны ниже.

Кратко, адъювантную активность нативного флагеллина FNC и рекомбинантного FliC_{Δ174-400} на антиген HIV1 gp140 осуществляли, как описано ниже: мышей NMRI (n=8) иммунизировали на сутки 1 и на сутки 21 интраназально 20 мкл PBS, содержащего gp140 (5 мкг на мышь), без флагеллинов, с FliC или с FliC_{Δ174-400} (1 мкг на мышь).

Образцы сыворотки и бронхоальвеолярных лаважей (BAL) отбирали на сутки 35 и определяли титр антител с помощью gp140-специфичного ELISA.

Результаты изображены на фиг. 12, где каждый символ представляет индивидуальную мышь, а полоса представляет геометрическое среднее.

Символы означают мышей, которым вводили интраназально, соответственно: (1) кружки: только HIV1 gp140; (2) ромбы: HIV1 gp140 и FliC_{Δ174-400}; (3) треугольники: gp140 и FliC.

Титры антител из образцов сыворотки представлены в виде закрашенных символов в левой части фиг. 12 (заштрихованные символы). Титры антител из образцов бронхоальвеолярного лаважа представлены в виде незакрашенных символов в правой части фиг. 12.

Результаты показывают, что различные флагеллины с deletированной гипервариабельной областью, как определено в настоящем описании, составляют эффективные иммуноадъювантные соединения.

Таблица 1. Чувствительные к протеазам иммунные ответы, индуцированные рекомбинантными флагеллинами*

Интраназальная иммунизация*	Анти-OVA IgG**				Анти-FliC IgG**			
	Сыворотка		BAL		Сыворотка		BAL	
	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO
PBS	НО***	0,0	НО	0,0	НО	0,0	НО	0,0
OVA	2,4	0,8	1,1	0,7	НО	0,0	НО	0,0
FliC + OVA	5,7	0,1	3,9	0,5	5,9	0,6	3,0	0,7
FliC _{Δ204-292} + OVA	5,5	0,9	3,4	0,8	3,3	0,8	1,0	0,5
FliC _{Δ191-352} + OVA	4,5	1,3	2,9	0,9	2,2	0,3	НО	0,0
FliC _{Δ174-400} + OVA	4,9	0,9	2,7	0,9	2,0	0,1	0,1	0,2
TRP + OVA	3,4	1,2	1,3	0,8	НО	0,0	НО	0,0
FliC/TRP + OVA	2,8	0,5	1,1	0,6	НО	0,0	0,3	0,3
FliC _{Δ204-292} /TRP + OVA	3,0	1,4	0,8	1,0	НО	0,0	НО	0,0
FliC _{Δ191-352} /TRP + OVA	2,6	0,7	0,8	0,9	НО	0,0	НО	0,0
FliC _{Δ174-400} /TRP + OVA	2,6	0,4	1,1	0,9	НО	0,0	НО	0,0

*Мышей (n=8) иммунизировали и.н. PBS, овальбумином (OVA), OVA + флагеллины/пептидные производные флагеллина или OVA + обработанные трипсином флагеллины (TRP) на сутки 1 и 21. На сутки 35 титры OVA- и FliC-специфичного IgG измеряли в сыворотке и BAL.

Статистическую значимость (p>0,05) определяли критерием Манна-Уитни.

**Значения выражены в виде Log 10 (реципрокные титры) ± стандартное отклонение (CO). В сыворотке и BAL предел обнаружения составляет 2 и 0,3 (разведение сыворотки 1/100 и разведение BAL 1/2) соответственно.

***"НО" обозначает "не определяли".

Таблица 2. Последовательности

SEQ ID NO:	Тип	Описание
1	пептид	Флагеллин (FliC)
2	пептид	FliC _{Δ174-400}
3	нуклеиновая кислота	Флагеллин (FliC)
4	нуклеиновая кислота	праймер

5	нуклеиновая кислота	праймер
6	нуклеиновая кислота	праймер
7	нуклеиновая кислота	праймер
8	нуклеиновая кислота	праймер
9	нуклеиновая кислота	праймер
10	нуклеиновая кислота	праймер
11	нуклеиновая кислота	праймер
12	нуклеиновая кислота	праймер
13	нуклеиновая кислота	праймер
14	нуклеиновая кислота	FliC _{Δ174-400}
15	нуклеиновая кислота	праймер
16	нуклеиновая кислота	праймер
17	нуклеиновая кислота	праймер
18	нуклеиновая кислота	праймер
19	нуклеиновая кислота	праймер
20	нуклеиновая кислота	праймер
21	нуклеиновая кислота	праймер
22	нуклеиновая кислота	праймер
23	нуклеиновая кислота	праймер
24	нуклеиновая кислота	праймер
25	пептид	FliC _{Δ161-405}
26	пептид	FliC _{Δ138-405}
27	пептид	FliC _{Δ100-405}
28	нуклеиновая кислота	FliC _{Δ161-405}
29	нуклеиновая кислота	FliC _{Δ138-405}
30	нуклеиновая кислота	FliC _{Δ100-405}

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноадьювантное соединение, содержащее:

а) N-концевой пептид, обладающий по меньшей мере 90% аминокислотной идентичностью с аминокислотной последовательностью, начинающейся с аминокислотного остатка, локализованного в положении 1 SEQ ID NO:1, и оканчивающейся аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из любого из аминокислотных остатков, локализованных в положениях 99-173 SEQ ID NO:1; и

б) С-концевой пептид, обладающий по меньшей мере 90% аминокислотной идентичностью с аминокислотной последовательностью, начинающейся с аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из любого из аминокислотных остатков, локализованных в положениях 401-406 SEQ ID NO:1, и оканчивающейся аминокислотным остатком, локализованным в положении 494 SEQ ID NO:1; где

указанный N-концевой пептид непосредственно связан с указанным С-концевым пептидом или указанный N-концевой пептид и указанный С-концевой пептид связаны друг с другом опосредованно через спейсерную цепь, где спейсерная цепь содержит от 1 до 20 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 природных аминокислот.

2. Иммуноадьювантное соединение по п.1, где указанный N-концевой пептид выбран из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей 1-99, 1-137, 1-160 и 1-173 SEQ ID NO:1.

3. Иммуноадьювантное соединение по любому из пп.1 или 2, где указанный С-концевой пептид выбран из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей 401-494 и 406-494 SEQ ID NO:1.

4. Иммуноадьювантное соединение по любому из пп.1-3, где указанные N-концевой и С-концевой пептиды состоят из аминокислотных последовательностей 1-173 и 401-494 SEQ ID NO:1 соответственно.

5. Иммуноадьювантное соединение по любому из пп.1-3, где указанные N-концевой и С-концевой пептиды состоят из аминокислотных последовательностей 1-160 и 406-494 SEQ ID NO:1 соответственно.

6. Иммуноадьювантное соединение по любому из пп.1-3, где указанные N-концевой и С-концевой пептиды состоят из аминокислотных последовательностей 1-137 и 406-494 SEQ ID NO:1 соответственно.

7. Иммуноадьювантное соединение по любому из пп.1-6, где указанный N-концевой пептид и указанный С-концевой пептид связаны друг с другом опосредованно через промежуточную спейсерную цепь, состоящую из пептидной последовательности NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH.

8. Иммуноадьювантное соединение по любому из пп.1-7, где аминокислотный остаток аспарагина, локализованный в положении 488 SEQ ID NO:1, заменен серином.

9. Иммуноадьювантное соединение по любому из пп.1-7, где указанное соединение содержит до-

полнительный остаток метионина на N-конце.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуoadъювантное соединение по любому из пп.1-9 вместе с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым эксципиентом.

11. Иммуногенная композиция, содержащая иммуoadъювантное соединение по любому из пп.1-9 вместе с одним или более чем одним антигеном.

12. Вакцинная композиция, содержащая иммуoadъювантное соединение по любому из пп.1-9 вместе с одним или более чем одним антигеном.

13. Иммуногенная композиция по п.11 или вакцинная композиция по п.12, где указанное иммуoadъювантное соединение нековалентно связано с одним или более чем одним указанным антигеном.

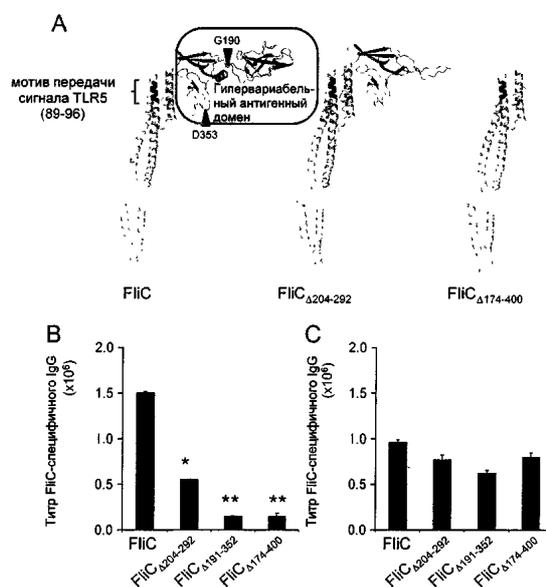
14. Применение иммуoadъювантного соединения по любому из пп.1-9 в качестве лекарственного средства.

15. Применение иммуoadъювантного соединения по любому из пп.1-9 для изготовления фармацевтической композиции.

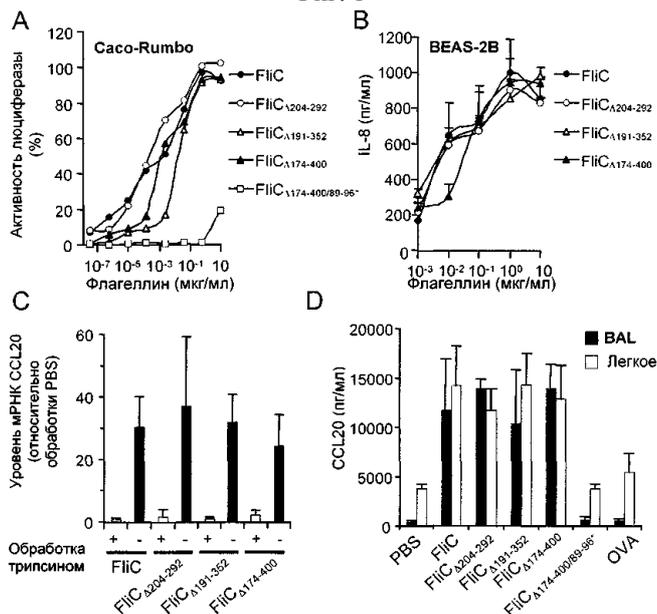
16. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуoadъювантное соединение по любому из пп.1-9.

17. Рекombинантный вектор, содержащий встроенную в него нуклеиновую кислоту по п.16.

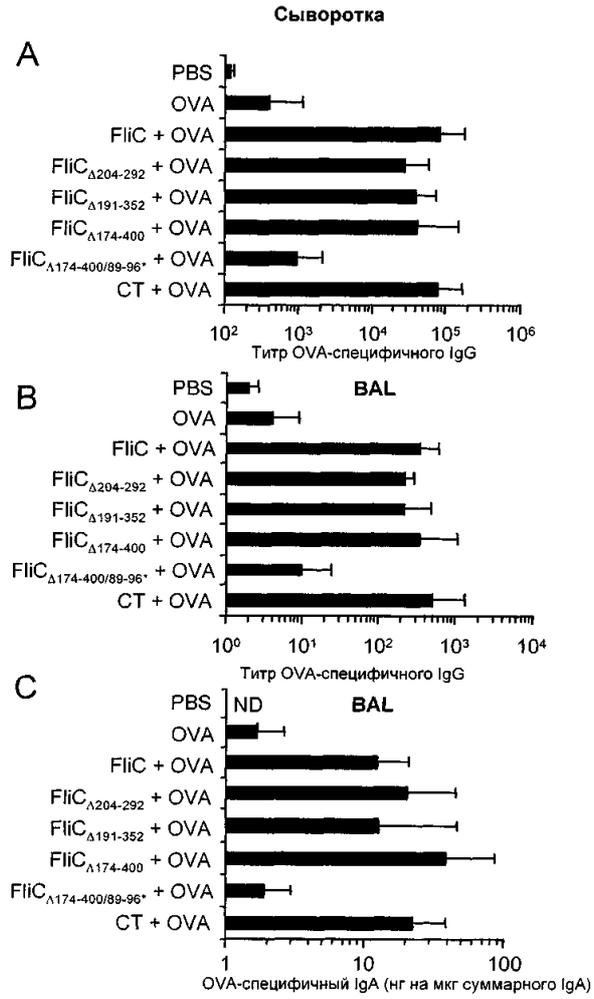
18. Клетка-хозяин, трансфицированная или трансформированная нуклеиновой кислотой по п.16 или рекombинантным вектором по п.17.



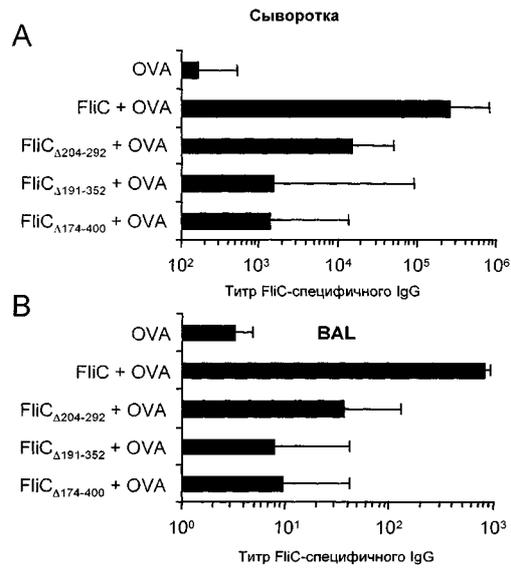
Фиг. 1



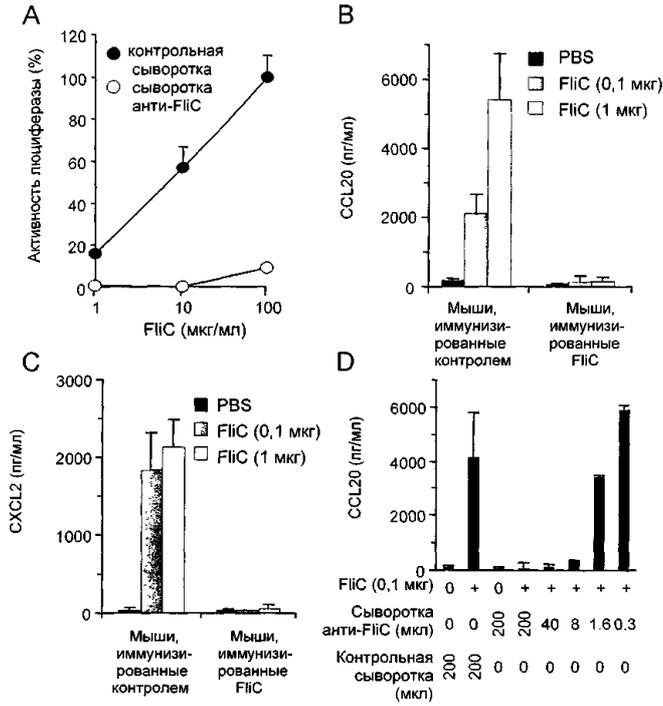
Фиг. 2



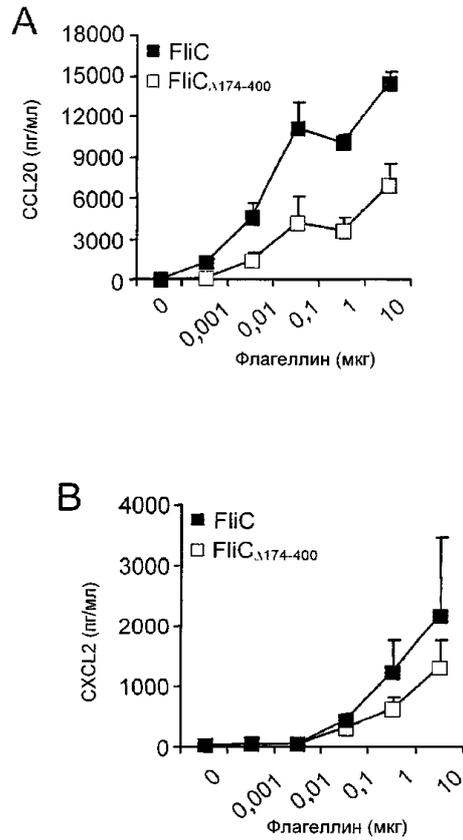
Фиг. 3



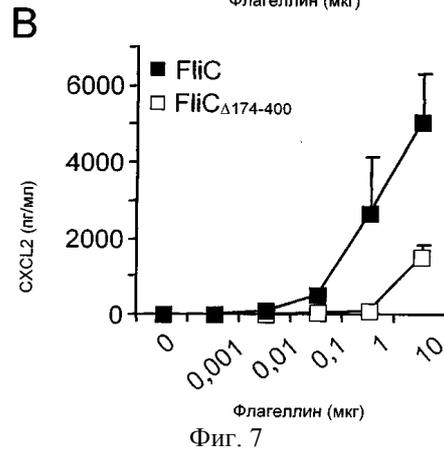
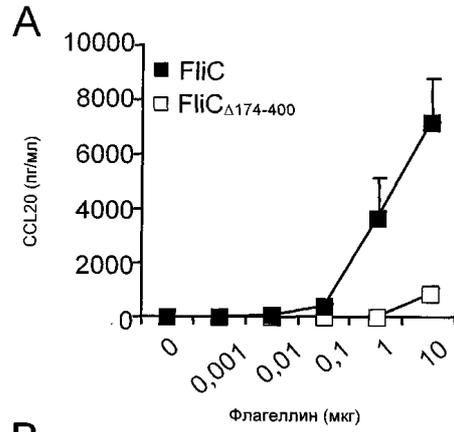
Фиг. 4



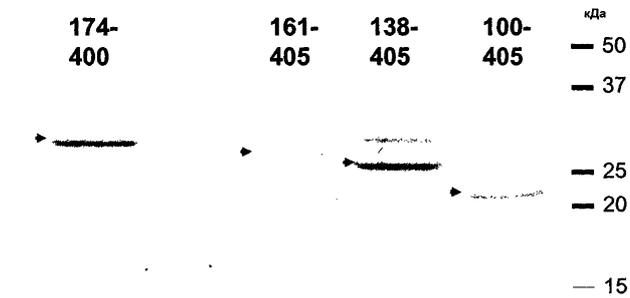
Фиг. 5



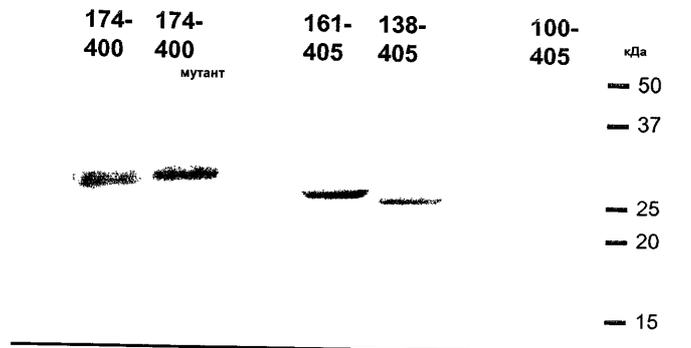
Фиг. 6



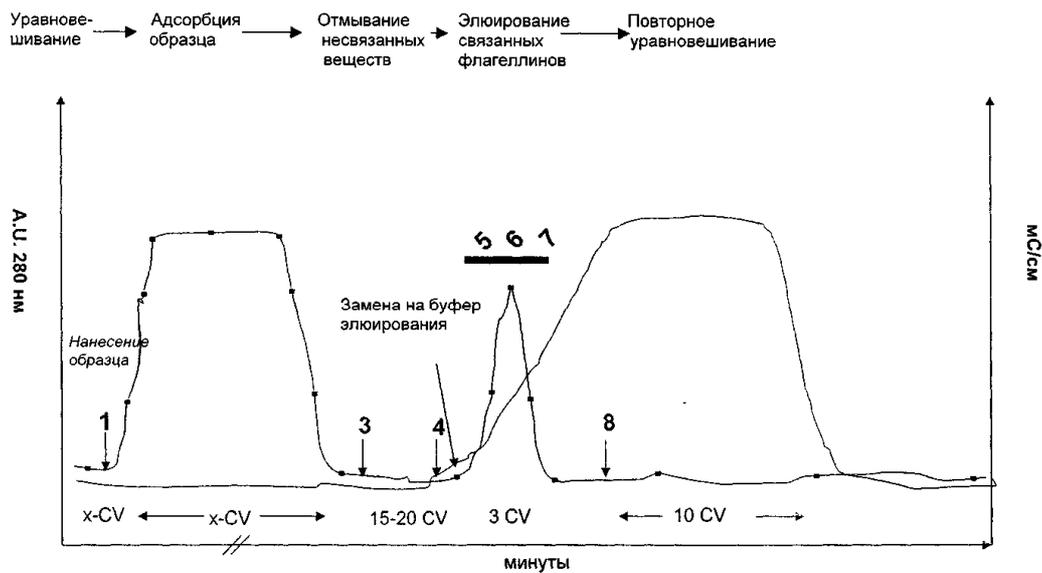
Фиг. 7



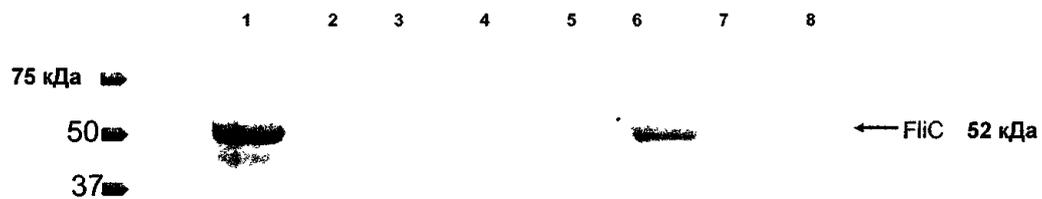
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 13



Фиг. 14

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Институт Националь де ля Санте э де ля Решерш Медикаль
(ИНСЭРМ)
- <120> Новые иммуноадъювантные соединения на основе флагеллина и их
применение
- <130> V882EU - ИНСЭРМ
- <160> 30
- <170> PatentIn версия 3.3
- <210> 1
- <211> 494
- <212> HPT
- <213> Salmonella enterica
- <400> 1

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
145 150 155 160

019138

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln Gln
 165 170 175

Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala Asp
 180 185 190

Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr Gly
 195 200 205

Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp Asp
 210 215 220

Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240

Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu Val
 245 250 255

Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro Ala
 260 265 270

Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp Leu
 275 280 285

Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr Ala
 290 295 300

Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile Asp
 305 310 315 320

Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr Gln
 325 330 335

Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala Asp
 340 345 350

Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp Gly
 355 360 365

Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser Lys
 370 375 380

Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala Ala
 385 390 395 400

Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala

019138

405 410 415
 Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe
 420 425 430
 Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser
 435 440 445
 Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn
 450 455 460
 Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala
 465 470 475 480
 Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
 485 490

 <210> 2
 <211> 271
 <212> HPT
 <213> Salmonella enterica

 <400> 2
 Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15
 Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30
 Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
 35 40 45
 Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80
 Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95
 Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110
 Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
 115 120 125

019138

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
 130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
 145 150 155 160

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Gly Ala Ala
 165 170 175

Gly Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu
 180 185 190

Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg
 195 200 205

Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr
 210 215 220

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser
 225 230 235 240

Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu
 245 250 255

Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 260 265 270

- <210> 3
- <211> 1488
- <212> ДНК
- <213> Salmonella enterica

<400> 3
 atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctggtga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtcog ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc 120
 gcgaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg ctccccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgocgagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgogtg aactggcggg tcagtctgct 300
 aacagacca actcccagtc tgacctcgac tocatocagg ctgaaatcac ccagcgcoctg 360
 aacqaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420
 gacaacaccc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacgggt aaactatcga tatcgatctg 480
 aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatagcgtga atgtgcaaca aaaatataag 540

gtcagcgata cggctgcaac tgttacagga tatgccgata ctacgattgc tttagacaat 600
 agtaacttta aagcctcggc tactgggtctt ggtggactg accagaaaat tgatggcgat 660
 ttaaaatttg atgatacagac tggaaaatat tacgccaaag ttaccgttac ggggggaact 720
 ggtaaagatg gctattatga agtttcggtt gataagacga acggtgaggt gactcttgct 780
 ggcggtgcga ctccccgct tacaggtgga ctacctgcga cagcaactga ggatgtgaaa 840
 aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag ccgcattgac agcagcaggt 900
 gttaccggca cagcatctgt tgtaagatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt 960
 gatgggtggt tagcagttaa ggtaggcgat gattactatt ctgcaactca aaataaagat 1020
 ggttccataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca 1080
 ctaaacaac tggttgccgc agacggcaaa accgaagttg tttctattgg tggtaaaact 1140
 tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac ttaaaagcac agcctgatct ggcggaagcg 1200
 gctgctacaa ccaaccgaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac 1260
 acgttacgtt ctgacctggg tgcggtacag aaccgttca actccgctat taccaacctg 1320
 ggcaacaccg taaacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagatc cgactacgcg 1380
 accgaagttt ccaacatgtc tcgcgcgag attctgcagc aggcgggtac ctccgttctg 1440
 gccgagcgga accaggttcc gcaaaacgtc ctctctttac tgcgttaa 1488

<210> 4
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 4
 agcagactga accgccaag 18

<210> 5
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 5
 gctacaacca ccgaaaacc 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

 <400> 6
 аасссгсгс агааааттг 19

<210> 7
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

 <400> 7
 таггастттс асгсггт 18

<210> 8
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

 <400> 8
 сттсгагсг агагагаг тттсас 26

<210> 9
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

 <400> 9
 аттсгсгта тсгагасс 18

<210> 10
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

 <400> 10
 гттсгсааа гсгсгсгсгс тттасг 27

<210> 11
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>		
<223>	праймер	
<400>	11	
	cagtaaagag aggacgcttt gcggaac	27
<210>	12	
<211>	31	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная последовательность	
<220>		
<223>	праймер	
<400>	12	
	qgtgcagctg gagctacaac caccgaaaac c	31
<210>	13	
<211>	31	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная последовательность	
<220>		
<223>	праймер	
<400>	13	
	ggtgcagctg gaaacccgct gcagaaaatt g	31
<210>	14	
<211>	819	
<212>	ДНК	
<213>	Salmonella enterica	
<400>	14	
	atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctggtga cccagaataa cctgaacaaa	60
	tcccagtcog ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc	120
	gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt	180
	ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc	240
	gcgctgaaag aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct	300
	aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgctg	360
	aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag	420
	gacaacacc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacggtg aaactatoga tatcgatctg	480
	aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacgtga atggtgctgc tgggtctaca	540
	accaccgaaa acccgctgca gaaaattgat gctgctttgg cacaggttga cacgttaagt	600
	tctgacctgg gtgcgggtaca gaaccgttcc aactccgcta ttaccaacct gggcaacacc	660
	gtaaacaacc tgacttctgc ccgtagccgt atcgaagatt ccgactacgc gaccgaagtt	720

tccaacatgt ctgcgcgca gattctgcag caggccggtta cctccgttct ggcgcaggcg 780

aaccaggttc cgcaaaagcgt cctctcttta ctgcggttaa 819

<210> 15
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 15
 agcaccattc agcgtatcca gacc 24

<210> 16
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 16
 gctggtgcta caaccaccga aaac 24

<210> 17
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 17
 tcgagatatc ctgtaacagt tgcagcc 27

<210> 18
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 18
 actcgaggac ggtacatcca aaactgcac 29

<210> 19
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 19
 cgtcatccat ggcgaactg 19

<210> 20
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 20
 gcttctttgc agtcctteg t 21

<210> 21
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 21
 ttttgggatg gaattggaca c 21

<210> 22
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 22
 tgcaggtgaa gccttcaacc 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 23
 ccctcaacgg aagaассааа 20

<210> 24
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер

<400> 24

cacatcaggt acgatccagg c

<210> 25
 <211> 253
 <212> HPT
 <213> Salmonella enterica

<400> 25

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
 35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
 115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
 130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
 145 150 155 160

Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln
 165 170 175

Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn
 180 185 190

Ser Fla Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Phe Ser Ala
 195 200 205

019138

Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met
 210 215 220

Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 245 250

<210> 26
 <211> 230
 <212> IPT
 <213> Salmonella enterica

<400> 26

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
 35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
 115 120 125

Ile Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu
 130 135 140

Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp
 145 150 155 160

Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly

019138

165

170

175

Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser
 180 185 190

Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln
 195 200 205

Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser
 210 215 220

Val Leu Ser Leu Leu Arg
 225 230

<210> 27
 <211> 192
 <212> IPT
 <213> Salmonella enterica

<400> 27

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
 35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala
 100 105 110

Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn
 115 120 125

Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu
 130 135 140

019138

Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val
 145 150 155 160

Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val
 165 170 175

Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 180 185 190

<210> 28
 <211> 765
 <212> ДНК
 <213> Salmonella enterica

<400> 28
 atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtcgc ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc 120
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagttctgt 300
 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420
 gacaacaccc tgaccatcca ggttgggtgc aacgacgggt aaactatcga tatcgatctg 480
 aagggtgcag ctggaaaccc gctgcagaaa attgatgctg ctttggcaca ggttgacacg 540
 ttacgttctg acctgggtgc ggtacagaac cgtttcaact ccgctattac caacctgggc 600
 aacaccgtaa acaacctgac ttctgcccgt agccgtatcg aagattccga ctacgcgacc 660
 gaagtttcca acatgtctcg cgcgcagatt ctgcagcagg ccggtaacct cgttctggcg 720
 caggogaacc aggttccgca aagcgtcttc tctttactgc gttaa 765

<210> 29
 <211> 696
 <212> ДНК
 <213> Salmonella enterica

<400> 29
 atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtcgc ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc 120
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagttctgt 300

aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgccctg 360
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctgggtgca 420
 yctggaaacc cgtgcagaa aattgatgct gctttggcac aggttgacac gttacgttct 480
 gacctgggtg cggtagagaa ccgtttcaac tccgctatta ccaacctggg caacaccgta 540
 aacaacctga cttctgcccg tagccgtatc gaagattccg actacgcgac cgaagtttcc 600
 âacatgtctc gcgcgcagat tctycagcag gccggtaoct ccgttctggc gcaggcgaac 660
 caggttccgc aaagcgtcct ctctttactg cgttaa 696

<210> 30
 <211> 582
 <212> ДНК
 <213> Salmonella enterica

<400> 30
 atggcacaag tcattaatac aaacagcctg togctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtcctg ctctggggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc 120
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggg tcagctctgct 300
 ggtgcagctg gaaacccgct gcagaaaatt gatgctgctt tggcacaggt tgacacgtta 360
 cgtctgacc tgggtgcggg acagaaccgt ttcaactccg ctattacca cctgggcaac 420
 accgtaaaca acctgacttc tgcccgtagc cgtatcgaag attccgacta cgcgaccgaa 480
 gtttccaaca tgtctcgcgc gcagattctg cagcaggccg gtacctccgt tctgggcgag 540
 gogaaccagg ttcogcaaag cgtcctctct ttaactgcgtt aa 582

