

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034352**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.30

(21) Номер заявки
201691611

(22) Дата подачи заявки
2015.02.20

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 14/21 (2006.01)

(54) КОНСТРУКЦИИ БЕЛКА USPA2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/943,909; 61/946,932; 61/946,937**

(32) **2014.02.24; 2014.03.03; 2014.03.03**

(33) **US**

(43) **2016.12.30**

(86) **PCT/IB2015/051308**

(87) **WO 2015/125118 2015.08.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛЭКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛЗ СА (BE)**

(72) Изобретатель:
**Бле Норман (СА), Кастадо Синди,
Шоме Патрик, Девершен Марьяни
(BE)**

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

(56) **WO-A2-2007018463**

YU-CHING SU ET AL.: "Impact of sequence diversity in the Moraxella catarrhalis UspA2/UspA2H head domain on vitronectin binding and antigenic variation", MICROBES AND INFECTION, vol. 15, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 375-387, XP055187583, ISSN: 1286-4579, DOI: 10.1016/j.micinf.2013.02.004, abstract; figures 1A, B; sequence Uniprot: Q9XD55 -& DATABASE UniProt [Online], 1 November 1999 (1999-11-01), "SubName: Full=Ubiquitous surface protein A2 {ECO:0000313, EMBL:AGH27427.1}; SubName: Full=UspA2 {ECO:0000313, EMBL:AAD43466.1};", XP002739304, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9XD55, Database accession no. Q9XD55, sequence

WO-A2-9828333

MCMICHAEL JOHN C. ET AL.: "Isolation and characterization of two proteins from Moraxella catarrhalis that bear a common epitope", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 66, no. 9, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 4374-4381, XP002291595, ISSN: 0019-9567, abstract, page 4380, right-hand column

WO-A1-2007084053

WO-A2-02083710

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим убиквитарный поверхностный белок A2 (UspA2) Moraxella catarrhalis (M. catarrhalis). Более конкретно, настоящее изобретение относится к белковым конструкциям UspA2 и иммуногенным композициям, содержащим конструкции, к вакцинам, содержащим такие иммуногенные композиции, и к их терапевтическим применениям. Кроме того, изобретение относится к композициям, содержащим UspA2 в комбинации по меньшей мере с одним антигеном из Haemophilus influenzae, иммуногенным композициям, содержащим антигены, вакцинам, содержащим такие иммуногенные композиции, и к их терапевтическим применениям.

B1**034352****034352****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим убиквитарный поверхностный белок A2 (UspA2) *Moraxella catarrhalis* (M. catarrhalis, M. cat.). Более конкретно, настоящая заявка относится к конструкциям белка UspA2 и иммуногенным композициям, содержащим конструкции, вакцинам, содержащим такие иммуногенные композиции, и к их терапевтическим применениям.

Уровень техники, предшествующий изобретению

Убиквитарный поверхностный белок A2 (UspA2) представляет собой тримерный аутотранспортёр, который выглядит как структура в форме леденца на электронных микрофотографиях (Hoiczuk et al. EMBO J. 19: 5989-5999 (2000)). Он состоит из N-концевой головки, за которой следует ножка, оканчивающаяся амфипатической спиралью и C-концевым мембранным доменом. (Hoiczuk et al. EMBO J. 19: 5989-5999 (2000)). UspA2 содержит очень консервативный домен (Aebi et al., Infection & Immunity 65(11) 4367-4377 (1997)), узнаваемый моноклональным антителом, как показано, являющимся защитным при пассивном переносе в модели заражения *Moraxella catarrhalis* на мышах (Helminen et al. J Infect Dis. 170(4): 867-72 (1994)).

Показано, что UspA2 взаимодействует с структурами и белками внеклеточного матрикса хозяина, подобными фибронектину (Tan et al., J Infect Dis. 192(6): 1029-38 (2005)) и ламинину (Tan et al., J Infect Dis. 194(4): 493-7 (2006)), что позволяет предполагать, что он может играть роль на ранней стадии инфекции *Moraxella catarrhalis*.

UspA2 также, по-видимому, вовлечен в способность *Moraxella catarrhalis* к устойчивости против бактерицидной активности нормальной сыворотки человека. (Attia AS et al. Infect Immun 73(4): 2400-2410 (2005)). Он (i) связывается с ингибитором комплемента C4bp, позволяя *Moraxella catarrhalis* ингибировать классическую систему комплемента, (ii) предотвращает активацию альтернативного пути комплемента посредством абсорбции C3 из сыворотки и (iii) создает помехи для системы комплемента на терминальных стадиях, мембраноатакующего комплекса (MAC), посредством связывания регуляторного белка для комплемента витронектина. (de Vries et al., Microbiol Mol Biol Rev. 73(3): 389-406 (2009)).

Moraxella catarrhalis является важным и общераспространенным патогеном дыхательных путей, ассоциированным с повышенным риском обострений при хроническом обструктивном заболевании легких (COPD) у взрослых. (Sateesh et al., Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 3: 109-115 (2006)).

Существует необходимость в вакцинах против *Moraxella catarrhalis*.

Краткая сущность изобретения

В первом аспекте, настоящее изобретение относится к белкам формулы (I).

$$A - (R_1)_m - (B)_n \text{ (формула I)},$$

где A представляет собой UspA2 из *Moraxella catarrhalis* или его иммуногенный фрагмент;

R₁ представляет собой аминокислоту;

m представляет собой 0, 1 или 2;

B представляет собой гистидин и

n представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим белки формулы (I) и белки по изобретению. Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант. Композиция может содержать эксципиент.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики состояния или заболевания, вызванного полностью или частично *Moraxella catarrhalis*. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики отита среднего уха. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики обострений при хроническом обструктивном заболевании легких. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики пневмонии. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, для применения в лечении или профилактике состояния или заболевания, вызванного, полностью или частично, *Moraxella catarrhalis*. Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим белки по изобретению.

В девятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения нуклеиновых кислот по изобретению.

В десятом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере один антиген из *Moraxella catarrhalis* и по меньшей мере один антиген из *Haemophilus influenzae*. Композиция

зияция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант. Композиция может содержать эксципиент.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики состояния или заболевания, вызванного, полностью или частично, *Moraxella catarrhalis* и/или *Haemophilus influenzae*. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению.

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики обострений при хроническом обструктивном заболевании легких. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению и терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антигена из *Haemophilus influenzae*.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению для применения в лечении или профилактике состояния или заболевания, вызванного полностью или частично *Moraxella catarrhalis* в комбинации с по меньшей мере одним антигеном из *Haemophilus influenzae*. Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения описаны в следующем подробном описании конкретных вариантов осуществления, примерах и формуле изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - типичный профиль ферментации для способов с индукцией при высокой плотности клеток (HCDI) и параметры, мониторируемые в ходе периодической ферментации с подпиткой в масштабе 20 л.

Фиг. 2 - типичный профиль ферментации для способов с индукцией при низкой плотности клеток А (LCDI) и параметры, мониторируемые в ходе периодической ферментации с подпиткой в масштабе 20 л.

Фиг. 3 - выход UspA2 для белковых конструкций MC-001, MC-002, MC-004, MC-005, MC-006, MC-007, MC-008 и MC-010, оцененный в ферментере; данные из табл. 4.

Фиг. 4 - распределение молекулярной массы очищенного MC-005, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. Большая часть белка обнаружена в форме тримера, с небольшой долей олигомера более высокой молекулярной массы, которая может соответствовать олигомеру от димера до тримера. MW=молекулярная масса. кДа=килодальтон.

Фиг. 5 - распределение молекулярной массы очищенного MC-001, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. Большая часть белка обнаружена в форме тримера.

Фиг. 6 - распределение молекулярной массы очищенного MC-001, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. В образце представлено множество молекул, и он обладает высокой полидисперсностью. Коэффициент седиментации основных детектированных молекул не соответствует ни одному из тримеров, в норме детектированных в других партиях.

Фиг. 7 - распределение молекулярной массы очищенного MC-001, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. Большая часть белка обнаружена в форме тримера.

Фиг. 8 - распределение молекулярной массы очищенного MC-007, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. Большая часть белка обнаружена в форме тримера.

Фиг. 9 - спектры кругового дихроизма (CD) в дальнем УФ для конструкций UspA2, дающие указания на вторичные структуры белков.

Фиг. 10 - мониторинг вторичных структур посредством кругового дихроизма (CD) в ходе термического разворачивания MC-005 (UspA2 с Δ спирали+6His). Визуальный анализ спектров ясно показывает, что белок теряет большую часть своей вторичной структуры при 33°C.

Фиг. 11 - мониторинг вторичных структур посредством кругового дихроизма (CD) в ходе термического разворачивания MC-007 (UspA2 с полной спиралью+6His). Визуальный анализ спектров показывает, что потеря вторичной структуры является более медленной по сравнению с конструкцией без спирали. Структурные изменения поддаются детекции при нагревании до 33°C, однако, по-видимому, полное разворачивание происходит между 35 и 37°C.

Фиг. 12 - спектр MALDI MC-001 партии opt-01. Наблюдаемая масса 57427 Да может соответствовать деметионированному белку, в то время как пик 57620 Да может соответствовать полноразмерному белку.

Фиг. 13 - спектр MALDI MC-011 партии BMP37. Наблюдаемая масса может соответствовать деметионированному белку. Два других пика +186 Да и +366 Да не идентифицированы.

Фиг. 14 - защитная эффективность MC-001 и MC-007 в модели колонизации легких на мышах.

Фиг. 15 - ответ антител, направленный против UspA2, индуцированный после внутримышечного введения у мышей, где PII и PIII обозначают, соответственно, уровни антител против IgG в сыворотке, собранной на сутки 28 (точка II) и сутки 42 (точка III).

Фиг. 16 - бактерицидные титры против гомологичного штамма, индуцированные UspA2, составленным с различными адъювантами (AS01_E, AS04_C и AlPO₄).

Фиг. 17 - ответ антител, направленный против UspA2, индуцированный после внутримышечного введения у мышей, с использованием различных составов антигенов и адъювантов.

Фиг. 18 - бактерицидные титры против гомологичного штамма, индуцированные UspA2 с использованием различных составов антигенов и адъювантов.

Фиг. 19 - ответ IgG, индуцированный против PD у мышей посредством вакцины PD-PEP*i*LA-UspA2 (трехвалентной вакцины NTHi-M. cat.), составленной с различными адъювантами.

Фиг. 20 - ответ IgG, индуцированный против PE у мышей посредством вакцины PD-PEP*i*LA-UspA2 (трехвалентной вакцины NTHi-M. cat.), составленной с различными адъювантами.

Фиг. 21 - ответ IgG, индуцированный против P*i*LA у мышей посредством вакцины PD-PEP*i*LA-UspA2 (трехвалентной вакцины NTHi-M. cat.), составленной с различными адъювантами.

Фиг. 22 - иммуногенность PE в двухвалентном PD-PEP*i*LA и трехвалентном PD-PEP*i*LA-UspA2 составах с AS01E.

Фиг. 23 - иммуногенность P*i*LA в двухвалентном PD-PEP*i*LA и трехвалентном PE-P*i*LA-UspA2 составах с AS01E.

Фиг. 24 - иммуногенность PD в двухвалентном PD-PEP*i*LA и трехвалентном PE-P*i*LA-UspA2 составах с AS01E.

Фиг. 25 - эффект тетравалентного вакцинного состава PD/PEP*i*LA/UspA2/AS01E на легкие мыши, предварительно сенсибилизированные инактивированным нагреванием M. cat. - периваскулит и перибронхиолит у иммунизированных PBS мышей.

Фиг. 26 - эффект тетравалентного вакцинного состава PD/PEP*i*LA/UspA2/AS01E на легкие мыши, предварительно сенсибилизированные инактивированным нагреванием M. cat. - Сутки 2 после иммунизации.

Фиг. 27 - эффект тетравалентного вакцинного состава PD/PEP*i*LA/UspA2/AS01E на легкие мыши, предварительно сенсибилизированные инактивированным нагреванием M. cat. - Сутки 7 после иммунизации.

Фиг. 28 - эффект тетравалентного вакцинного состава PD/PEP*i*LA/UspA2/AS01E на легкие мыши, предварительно сенсибилизированные инактивированным нагреванием M. cat. - Сутки 14 после иммунизации.

Фиг. 29 - эффект тетравалентного вакцинного состава PD/PEP*i*LA/UspA2/AS01E на легкие мыши, предварительно сенсибилизированные инактивированным нагреванием M. cat. (подробные результаты).

Фиг. 30 - ответы CD4 Т-клеток легких после вакцинации после повторной стимуляции WC M. cat. Клетки CD4 легких, экспрессирующие IL17. Повторно стимулированы инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat или средой.

Фиг. 31 - ответы CD4 Т-клеток легких после вакцинации после повторной стимуляции WC M. cat. Клетки CD4 легких, экспрессирующие TNFα. Повторно стимулированы инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat. или средой.

Фиг. 32 - ответы CD4 Т-клеток легких после вакцинации после повторной стимуляции WC M. cat. Клетки CD4 легких, экспрессирующие IFNγ. Повторно стимулированы инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat. или средой.

Фиг. 33 - ответы CD4 Т-клеток легких после вакцинации при повторной стимуляции WC M. cat. Клетки CD4 легких, экспрессирующие IL13. Повторно стимулированы инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat. или средой.

Фиг. 34 - ответы CD4 Т-клеток легких после заражения при повторной стимуляции WC M. cat. Клетки CD4 легких, экспрессирующие IL17. Повторно стимулированы инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat. или средой.

Фиг. 35 - ответы CD4 Т-клеток легких после заражения при повторной стимуляции WC M. cat. Клетки CD4 легких, экспрессирующие TNFα. Повторно стимулированы инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat. или средой.

Фиг. 36 - ответы CD4 Т-клеток легких после заражения при повторной стимуляции WC M. cat. Клетки CD4 легких, экспрессирующие IFNγ. Повторно стимулированы инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat. или средой.

Фиг. 37 - ответы CD4 Т-клеток легких после заражения при повторной стимуляции WC M. cat. Клетки CD4 легких, экспрессирующие IL13. Повторно стимулированы инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat. или средой.

Подробное описание изобретения

Если в настоящем описании не объяснено или не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится это описание. Например, определения общепринятых в молекулярной биологии терминов можно найти в Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) и Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology

and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Термины единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Подобным образом, слово "или" предназначено, чтобы включать "и", если контекст явно не указывает иное. Кроме того, следует понимать, что все размеры в парах оснований или размеры в аминокислотах и все значения молекулярного веса или молекулярной массы, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными, и представлены для описания. Дополнительно, числовые пределы, данные в отношении концентраций или уровней вещества, такого как антиген, могут являться приблизительными. Таким образом, когда указано, что концентрация составляет (например) приблизительно 200 пг, следует понимать, что концентрация включает значения, немного большие или немного меньшие, чем ("приблизительно" или "~") 200 пг.

Хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные описываемым в настоящем описании, можно использовать в практическом осуществлении или тестировании этого описания, пригодные способы и материалы описаны ниже.

Термин "содержит" означает "включает". Таким образом, если контекст не требует иного, слово "содержит" и варианты, такие как "содержать" и "содержащий", следует понимать как предполагающие включение указанного соединения или композиции (например, нуклеиновой кислоты, полипептида, антигена) или стадии, или группы соединений или стадий, но не исключение любых других соединений, композиции, стадий или их групп. Сокращение "e.g." происходит от латинского *exempli gratia*, и его используют в настоящем описании для обозначения неограничивающего примера. Таким образом, сокращение "e.g." является синонимом термина "например".

Для упрощения обзора различных вариантов осуществления этого описания, представлено следующее объяснение терминов. Дополнительные термины и объяснения представлены в контексте этого описания.

"Пациент" в рамках изобретения представляет собой млекопитающее, включая человека, не являющихся человеком приматов и не являющихся приматами млекопитающих, таких как члены отряда грызунов (включая в качестве неограничивающих примеров мышей и крыс) и членов рода *Lagomorpha* (включая в качестве неограничивающих примеров кроликов).

В рамках изобретения "UspA2" обозначает убиквитарный поверхностный белок A2 из *Moraxella catarrhalis*. UspA2 может состоять из аминокислотной последовательности или содержать аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1 из ATCC 25238.

```
MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDIT
ALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELDEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGE
AIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYD
FGHEVAESIGEIHANNEAQNETLKLITNSIENTNNITKNKADIALENVVEELFNLSG
RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQA
NIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDA
LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIANKQADIANNINN
IYELAQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKHDKL
ITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVTALDTK
VNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPSYVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRV
NPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (SEQ ID NO: 1),
```

а также последовательности с по меньшей мере или точно 63, 66, 70, 72, 74, 75, 77, 80, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности, на протяжении полной длины, с SEQ ID NO: 1. Сравнение 38 последовательностей UspA2 из *Moraxella catarrhalis* (табл. 1, SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38) показало от приблизительно 63 до приблизительно 100% идентичности с UspA2, как указано в SEQ ID NO: 1.

UspA2, как описано в SEQ ID NO: 1, содержит сигнальный пептид (например, аминокислоты 1-29 из SEQ ID NO: 1), связывающий ламинин домен (например, аминокислоты 30-177 из SEQ ID NO: 1), связывающий фибронектин домен (например, аминокислоты 165-318 из SEQ ID NO: 1) (Tan et al. JID 192: 1029-38 (2005)), связывающий C3 домен (например, аминокислоты 30-539 из SEQ ID NO: 1 (WO2007/018463)), или фрагмент из аминокислот 30-539 из SEQ ID NO: 1, например, аминокислоты 165-318 из SEQ ID NO: 1 (Hallström T et al. J. Immunol. 186: 3120-3129 (2011)), амфипатическую спираль (например, аминокислоты 519-564 из SEQ ID NO: 1 или аминокислоты 520-559 из SEQ ID NO: 1, идентифицированные с использованием различных прогностических способов) и C-концевой якорный домен (например, аминокислоты 576-630 из SEQ ID NO: 1 (Brooks et al., Infection & Immunity, 76 (11), 5330-5340 (2008))).

Описаны различия аминокислот UspA2 для различных видов *Moraxella catarrhalis*. См., например, J Bacteriology 181 (13): 4026-34 (1999), Infection and Immunity 76(11): 5330-40 (2008) и PLoS One 7(9):e45452 (2012).

UspA2 может состоять из аминокислотной последовательности или содержать аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO. 1 любой одной или несколькими аминокислотами, вы-

бранными из группы, состоящей из: ак (аминокислот) 30-298, ак 299-302, ак 303-333, ак 334-339, ак 349, ак 352-354, ак 368-403, ак 441, ак 451-471, ак 472, ак 474-483, ак 487, ак 490, ак 493, ак 529, ак 532 или ак 543. UspA2 может состоять из аминокислотной последовательности или содержать аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 1 тем, что она содержит по меньшей мере одну вставку аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO. 1. UspA2 может состоять из аминокислотной последовательности или содержать аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO. 1 любым из отличий аминокислот в SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 38. Например, SEQ ID NO. 1 может содержать К вместо Q в положении аминокислоты 70, Q вместо G в положении аминокислоты 135 и/или D вместо N в положении аминокислоты 216.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности UspA2 из 38 штаммов *Moraxella catarrhalis* (SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38)

Штамм	Последовательности UspA2
ATCC 25238 (SEQ ID NO: 1)	MKTMKLLPLKIAVTSAMI IGLGAASTANAQAKNDITLEDLPYLIKKIDQNEL EADIGDITALEKYLALESQYGNILALEELNKALEELDEDVGWNQNDIANLEDD VETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNQQRNLV NGFIEIKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIAHNEAQNETLKGILIT NSIENTNNITKNKADIALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELA QQQDQHSDDIKTLKKNVEEGLLESLGHLIDQKTDIAQNQANIQLATYNELQ DQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKA SSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIAN NINNIYELAQQQDQHSDDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQN TLIEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSI TDLGTVKVDGFSRVLTALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPY SVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNI GVNYEF (630 ак)
American 2933 (SEQ ID NO: 2)	MKTMKLLPLKIAVTSAMI IGLGAASTANAQSRDRSLEDIQDSISKLVQDDIN TLKQDQKMNKYLILLNQLANTLITDELNNVIKNTNSIEALGDEIGWLENDI ADLEEGVEELTKNQNTLIEKDEEHDRLIAQNQADIQTLENNVVEELFNLSGR LIDQEADIAKNNASIEELYDFDNEVAERIGEIHAYTEEVNKTLENLITNSVK NTDNIDKNKADIDNNINNIYELAQQQDQHSDDIKTLKKNVEEGLLESLGHLI DQKADLTDKIKALESNVEEGLLDLSGRLLDQKADLTDKIKALESNVEEGLLD LSGRLLDQKADIAQNQTDIQLAAYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQ NIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIY ELAQQQDQHSDDIKTLAKASAANTNRIATAELGIAENKKDAQIAKQANANK TAIDENKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSI TDLGTVKVDGFDGRVTAL DTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSGKFNATAALGGYGSK SAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNI GVNYEF (613 ак)

American 2912 (SEQ ID NO: 3)	MKTMKLLPLKIAVTSALII GLGAASTANAQQQLQTETFLPNFLSNDNYDLTD PFYHNMILGDTALLDKQDGSQPQLKFYSNDKDSVPDSLFLSKLLHEQQLNFG KKGDTIIPLDKDGKPVYQVDYKLDGKGKKQKRRQVYSVTTKTATDDDVNSAY SRGILGKVDDLDDEMFLNHDITS LYDVTANQQDAIKDLKKGVKGLNKELKE LDKEVGVLSRDIGSLNDDVAQNNE SIEDLYDFSQEVADSIGEIHAKNAQNE TLQDLITNSVENTNNTKNKADIALENNVVEELFNLSGRLIDQKADLTCKDI KTLESNVEEGLLELSGHLIDQKADIAKNQADIAQNQANIQDLAAYNELQDAY AKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSE NTQNIAKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKA DADASFETLTKNQNTLIEKDEHDKLITANKTAIDENKASADTKFAATADAI TKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVLTALDTKVNAFDGRITALDSKVENG MAAQAAALSGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGA AINTSGNKKGSYNIGVNYEF (644 ak)
American 2908 (SEQ ID NO: 4)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQLVERFFPNIFLDKPLAKQHYHN VVVGDTISIVSDLQSNSDQLKFYSDDGLVPDSLFLFNKMLHEQLLNGFKEGDT IIPLDENGKPVYKVDYKLDGKEPRKVYSVTTKIATAEDVATSSYANGIQKDI DDLDFDQVTERLTQHGKTIYRNGERILANEE SVQYLNKEVQNNIEHIYEL AQQQDQHSSDIKTLSENVEKGLLELSGHLIDQKADLTCKDIKTLSENVEEGLL DLSGRLIDQKADLTCKDIKTLSENVEEGLL DLSGRLIDQKADIAQNQANIQDL AAYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEA IDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAA NTNRIATAELGIAENKKDAQIAKQANANKTAIDENKASADTKFAATADAIT KNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVLTALDTKVNAFDGRITALDSKVENG MAAQAAALSGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAA INTSGNKKGSYNIGVNYEF (591 ak)
Finnish 307 (SEQ ID NO: 5)	MKTMKLLPLKIAVTSAMI IGLGAASTANAQQQQQQQQQSRTEIFFPNIFF NENHDELD DAYHNIILGDTALLDKQDGSQPQLKFYSNDKDSVPDSLFLSKLL HEQQLNFGFKGDTIIPLDKDGKPVYQVDYKLDGKGKKQKRRQVYSVTTKTAT DDDVNSAYS SRGILGKVDDLDDEMFLNHDITS LYDVTANQQDAIKGLKKGVK GLNKELKELDKKEVGVLSRDIGSLNDDVAQNNE SIEDLYDFSQEVADSIGEIH AHNAQNETLQDLITNSVENTNNTKNKADIALENNVVEELFNLSGRLIDQ KADLTCKDIKTLSENVEEGLLELSGHLIDQKADIAKNQADIAQNQANIQDLAA YNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAID ALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQ ADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETL TKNQNTLIEKDEHDKLITANKTAIDENKASADTKFAATADAITKNGNAITK NAKSITDLGTVKDAFDGRVTALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAALSG LFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKK GSYNIGVNYEF (687 ak)
Finnish 353 (SEQ ID NO: 6)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGMASTANAQQQKSPKTETFLPNIFFNEYADD LDTLYHNMILGDTAITHDDQYKFYADDATEVPDSLFFNKILHDQLLYGFKEG DKIIPLDENGKPVYKLDKRLENG VQKTVYSVTTKTATADDVNSAYS SRGIQGD IDDLYEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNREVQNNIENIHELAQQQDQ HSSDIKTLKKNVEKDL DLSGRLIAQKEDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYAK KQTEAIDALNKASSENTQNIAKNSNIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKADL TKDIALESNVEEGLL DLSGRLIDQKADIAQNQANIQDLAAYNELQDAYAKQ QTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQ NIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIY ELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEK DEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTV KVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAALSGLFQ PYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYN IGVNYEF (683 аминокислот)

Finnish 358 (SEQ ID NO: 7)	MKTMKLLPLKIAVTSAMMVGLGMASTANAQQQKSPKTEIFLPNLFNDNTELT TDPLYHNMILGNTALLTQENQYKFYADDGNGVPSLLENKILHDQLLHGFK GGTIIPLDENGKPVYKLDSEIVEQGKTKTVSVTTKTATADDVNSAYSRIQ DIDDLYEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNREVQNNIENIHELAAQQQ QHSSDIKTLKKNVEKDLLDLSGRLIAQKEDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYA OKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNSNHIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKAD LTKDIKALESNVEEGLDLGRLIDQKADIAQNQANIQLAAYNELQDAYAK QQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENT QNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNI YELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEK DKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGT KVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQ PYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSY NIGVNYEF (684 аминокислот)
Finnish 216 (SEQ ID NO: 8)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQQQKTKTEVFLPNLFDNDYYDL TDPLYHSMILGDTATLFDQQDNSKSQLKFYSNDKDSVPDLSLFSKLLHEQQ NGFKAGDTIIPLDKDGKPVYTQDTRTKDGKVEVTVSVTTKIATQDDVEQSAY SRGIQGDIDDLIDINREVNEYLKATHDYNERQTEAIDALNKASANTDRIDT AEERIDKNEYDIKALESNVGKDLDDLGSRLIAQKEDI DNNINHIYELAQQQD QHSSDIKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTKDIKTLENNIEEGLLELSGH LIDQKADLTKDIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKADIAQNQANIQLAAYNE LQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALN KASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADI ANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKADADASFETLTKN QNTLIEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAK SITDLGKTKVDGFDGRVTALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQ PYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSY NIGVNYEF (684 аминокислот)
Dutch H2 (SEQ ID NO: 9)	MKTMKLLPLKIAVTSAMMVGLGMASTANAQQQKSPKTEIFLPNLFNDNTELT TDPLYHNMILGNTALLTQENQYKFYADDGNGVPSLLENKILHDQLLHGFK GDTIIPLDENGKPVYKLDSEIVEQGKTKTVSVTTKTATADDVNSAYSRIQ DIDDLYEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNREVQNNIENIYELVQQQD QHSSDIKTLKKNVEKDLLDLSGRLIAQKEDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYA QKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNSNHIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKAD LTKDIKALESNVEEGLDLGRLIDQKADIAQNQANIQLAAYNELQDAYAK QQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENT QNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNI YELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEK DKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGT KVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQ PYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSY NIGVNYEF (684 аминокислот)
Dutch F10 (SEQ ID NO: 10)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQLAEQFFPNIFSNHAPVKQHYHN VVVGDTSEVENLQDSDDTQLKFYSNDEYSVPDLSLLENKMLHEQQLNGFKKGD TIIPLDENGKPVYKVDYKLDGQEPFRVSVTTKIATQDDVDNSPYSRIQGD IDDLYEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNKEVQNNIENIYELAQQQDQ HSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKADLTKDIKTLESNVEEGLLELSGHL IDQKADIAKNQADIAQNQANIQLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSEN TQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINN IYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIE KDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLG TKVDAFDGRVTALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQ PYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGV NYEF (574 аминокислот)

Norwegian 1 (SEQ ID NO: 11)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQQQPQTETFFPNIFFNENHDALD DVYHNMILGDTAITQDNQYKFYADAISEVPDSLFFNKILHDQQLNGFKEGDT IIPLDENGKPVYKLDEKVENGVKKS SVSVTTKTATRADVEQSAYS RGIQGD DDL YEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNKEVQNNIENIHELAAQQQDQ SSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKADLT KDIKTLESNVEEGLLDLSGRL DQKADIAQNQANIQDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLA AYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAI DALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDL AAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI AKNQADIANNINNIYELAQQ QDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDK LITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKDAFD GRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPPYVGK FNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNI GVN YEF (678 аминокислот)
Norwegian 13 (SEQ ID NO: 12)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQQQQPRTETFFPNIFFNENHDA LDDVYHNMILGDTAITQDNQYKFYADAISEVPDSLFFNKILHDQQLNGFKEG DTIIPLDENGKPVYKLDEKVENGVKKS SVSVTTKTATRADVEQSAYS RGIQ GDIDDL YEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNREVQNNIENIHELAAQQQD QHSSDIKTLKKNVEKDLLDLSGRLIAQKEDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYA QKQTEAIDALNKASSENTQNI AKNSNHIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKAD LTKDIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKADLT KDIKALESNVEEGLLDLSGRL LDQKADIAQNQANIQDLAAYNELQDQYAKQKQTEAIDALNKASSENTQNIEDL AAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI AKNQADIANNINNIYELAQQ QDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDK LITANKTAIDTNKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVGFD GRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPPYVGK FNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNI GVN YEF (678 аминокислот)
Norwegian 20 (SEQ ID NO: 13)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQLVERFFPNIFLDKPLAKQHYHN VVVGDTISIVSDLQSNSDQLKFYSDDEGLVPDSLFFNKMLHEQLNGFKEGDT IIPLDENGKPVYKVDYKLDGKEPRKVS SVTTKIATAEDVATSSYANGIQKDI DDL YDFDHQVTERLTQHGKTIYRNGERILANEESVQYLNKEVQNNIEHIYEL AQQQDQHSSDIKTLLESNVEKGLLELSGHLIDQKADLT KDIKTLENNVEEGLL DLSGRLIDQKADIAQNQANIQDLAAYNELQDQYAKQKQTEAIDALNKASSENT QNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI AKNQADIANNINNI YELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEK DKEHDKLITANKTAIDTNKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGT KVDGFD SRVTALDTKVNALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQA ALSGLFQPPYVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTS GNKKGSYNI GVN YEF (587 аминокислот)
Norwegian 25 (SEQ ID NO: 14)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQQQQPRTETFFPNIFFNENHDA LDDVYHNMILGDTAITQDNQYKFYADAISEVPDSLFFNKILHDQQLNGFKEG DTIIPLDENGKPVYKLDEKVENGVKKS SVSVTTKTATRADVEQSAYS RGIQ GDIDDL YEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNREVQNNIENIHELAAQQQD QHSSDIKTLKKNVEKDLLDLSGRLIAQKEDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYA QKQTEAIDALNKASSENTQNI AKNSNHIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKAD LTKDIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKADLT KDIKALESNVEEGLLDLSGRL LDQKADIAQNQANIQDLAAYNELQDQYAKQKQTEAIDALNKASSENTQNIEDL AAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI AKNQADIANNINNIYELAQQ QDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDK LITANKTAIDTNKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVGFD GRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPPYVGK FNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNI GVN YEF (678 аминокислот)

Norwegian 27 (SEQ ID NO: 15)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQVRDKSLEDIEALLGKIDISKLE KEKKQQTELQKYLLLSQYANVLTMEELNKNVEKNTNSIEALGYEIGWLENDI ADLEEGVEELTKNQNTLIEKDEEHDRLIAQNQADIKTLENNVVEELFNLSDR LIDQEADIAKNNASIEELYDFDNEVAERIGEIHAYTEEVNKTLEKLITNSVK NTDNIDKNKADIQALENNVEEGLELLESGHLIDQKADLTKDIIKALESNVEEGL LDLSGRLLDQKADIAKNQADIAQNQTDIQDLAAYNELQDQYAKQKTEAIDAL NKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQQQDQ HSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLIT ANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDGRV TALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFNATAALGGY GSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (616 аминокислот)
Norwegian 36 (SEQ ID NO: 16)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQATETFLPNLFDNDYTETTDPLY HGMILGNTAITQDTQYKFYAENGNEVPDSLFFNKILHDQQLNGFKEGDTIIP LDENGKPVYKLDIEITENGVRKVSVTTKTATREDVEQSAYSIRGIQGDIDDL YEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNKEVQNNIENIHELAAQQQDQHSSD IKTLKKNVEEGLELLESGHLIDQKADLTKDIIKALESNVEEGLLDLSGHLIDQK ADLTKDIIKALESNVEEGLLDLSGRLLDQKADIAKNQADIAQNQTDIQDLAAY NELQDQYAKQKTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDQYAKQKTEAIDA LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDQYAKQKTEAIDALNKASSENTQNIEDLAA YNELQDQYAKQKTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQQQD QHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLI TANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDGR VTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFN ATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (676 аминокислот)
BC5SV (SEQ ID NO: 17)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQNGTSTKLKNLKEYAQYLDNYAQ YLDDDDIDDLKEVGELSQNIAKNQANIKDLNKKLSRDIDSLREDVYDNQYEI VNNQADIEKNQDDIKELENNVKGELNLSGRLLDQKADIDNNINNIYELAQQ QDQHSSDIKTLKKNVEEGLELLESGHLIDQKSDIAQNQTDIQDLATYNELQDQ YAKQKTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASS ENTQNIQDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQD AYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKAS SENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANN INNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNT LIEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT DLGTVKVDGFDGRVTALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPY SVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIG VNYEF (629 аминокислот)
Norwegian 14 (SEQ ID NO: 18)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGMASTANAQQRSFKTETFLPNIFFNEYADD LDTLYHNMILGDTAITHDDQYKFYADDATEVPDSLFFNKILHDQLLYGFKEG DKIIPLDENGKPVYKLDKRLDNGVQKTIVSVTTKTATADDVNSAYSIRGIQGD IDDLYEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNKEVQNNIENIHELAAQQQDQ HSSDIKTLKKNVEEGLELLESGHLIDQKTDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYAK KQTEAIDALNKASSENTQNIAKNSNRKALENNIEEGLELLESGHLIDQKADL TKDIIKALESNVEEGLLDLSGRLIDQKADIAQNQANIQDLAAYNELQDAYAKQ QTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQ NIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIY ELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKD KEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVK VDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQP YSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYN IGVNYEF (683 аминокислот)

Norwegian 3 (SEQ ID NO: 19)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQAQSNRSLDQVQALLRGIDETKI KKEIQSQSQPELNKYLTFNQLANALNIEELNNNVQKNTQRLDSAATLYGDL KTVPKSIKENKESIKENKESIKENKESIKENKESIKENKESIKENKESITTL TRKSFQNQVDIVRNNASIEDLYAYGQEVAKSIGEIHAYTEEVNKTLENLITN SVENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQ QQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKADLTDKDIKTLESNVEEGLDDL SGRLLDQKADIAQNQANIQLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQN IEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQ QTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQ NIAKNQADIANNINNIYELAQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADAD ASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLITANKTVIDANKASADTKFAATADAITKN GNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSK VENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAF KAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (700 аминокислот)
Finnish 414 (SEQ ID NO: 20)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQATETFLPNLFDNDYIETTDPLY HGMILGNTAITQDTQYKFAENGNEVPDSLFFNKILHDQQLNGFKEGDTIIP LDENGKPVYKLEITENGVKRKVYSVTTKTATREDVEQSAYSRGIQGDIDDL YEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNKEVQNNIENIHELAAQQDQHSSD IKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKADLTDKDIKTLENNVEEGLLELSGHLIDQK ADLTDKDIKALESNVEEGLLDLSGRLLDQKADIAKNQADIAQNQTDIQDLAAY NELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDQYAKQTEAIDA LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAA YNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQQDQ QHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLI TANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDGR VTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFN ATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (676 аминокислот)
Japanese Z7476 (SEQ ID NO: 21)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQLAEQFFPNI FSNHAPVKQHYHN VVVGDT SIVENLQDSDDTQLKFYSNDEYSVPDSLFLFNKMLHEQQLNGFKKGD TIIPLDENGKPVYKVYKLDGQEPRRVYSVTTKIATQDDVDNSPYSGIQGD IDDLYEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNKEVQNNIENIYELAQQDQ HSSDIKTLKKNVEEGLLELSGRLIDQKADIAQNQANIQLAAYNELQDQYAK QTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENT QNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYA KQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSEN TQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINN IYELAQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIE KDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLG TKVDGFDGRVTALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGK FNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNY EF (678 аминокислот)
Belgian Z7530 (SEQ ID NO: 22)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQSRDRSLEDIQDSISKLVQDDIN TLKQDQKMNKYL LNLQ LANTLITDELNNNVIKNTNSIEALGDEIGWLENDI ADLEEGVEELTKNQNTLIEKDEEHDRLIAQNQADIQTLENNVVEELFNLSGR LIDQEADIAKNNASIEELYDFDNEVAERIGEIHAYTEEVNKTLENLITNSVK NTDNIDKNKADIDNNINNIYELAQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLI DQKADLTDKDIKALESNVEEGLLDLSGRLLDQKADLTDKDIKALESNVEEGLLD LSGRLLDQKADIAQNQTDIQDLAAYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQ NIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIY ELAQQDQHSSDIKTLAKASAANTNRIATAELGIAENKKDAQIAKAAQANANK TAIDENKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDGRVTAL DTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSK SAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (613 аминокислот)

German Z8063 (SEQ ID NO: 23)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQATNKDITLEDVLKSIEEIDPYE LRDYIEYPTAIERFLLLSQYGNLTLEEFNDNIELLDQDVEDLEESVTELA NQNSLIEQGEAIKEDLQGLADFVERQEDKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIE KNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAKSIGEIAHNEAQNETLKDLITNSVKNT DNITKNKADIQALESNVEKGLELSGHLIDQKADIDNNINNIHELAQQQDQH SSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKSDIAQNQANIQDLATYNELQDQYQK QTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQ NIAKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADAD ASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKN GNAITKNAKSITDLGTVDFGDSRVLTALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAA QAALSGLFQPYSGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAIN TSGNKKGSYNIGVNYEF (589 аминокислот)
American O12E (SEQ ID NO: 24)	MKTMKLLPLKIAVTSAMMVGLGMASTANAQQQKSPKTEIFLPNLFNDNTEL TDPLYHNMILGNTALLTQENQYKFYADDGNGVPSLFLFNKILHDQLLHGFK GDTIIPLDENGKPVYKLDSEIVEQGGTKTVSVTTKTATADDVNSAYSRGIQ DIDDLYEANKENVNRLIEHGDKIFANESVQYLNREVQNNIENIHELAQQQD QHSSDIKTLKKNVEKDLDDLDSGRLIAQKEDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYA QKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNSNIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKAD LTKDIAKLESNVEEGLDLDSGRLIDQKADIAQNQANIQDLAAYNELQDAYAK QQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENT QNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIKNQADIANNINNI YELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEK DKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGT KVDGDFGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQ PYSGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSY NIGVNYEF (684 аминокислот)
Greek MC317 (SEQ ID NO: 25)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQQQKTKTEVFLPNLFYNDYIEE TDLLYHNMILGDTAALVDRQNYNSQLKFYSNDEESVPDLSLFSKMLNNQQ NGFKAGDIIIPVDANGQVIYQKDRVEGGKTRTVLSVTTKIATQQDVSAYS RGIQGVNDLDDENMFNLHDITSLYDVTANQQDDIKGLKKGVKDLKKGVKGL NKEKELDKVEGVLSRDIGSLNDDVAQNNESEDLYDFSQEVADSIGEIAH NKAQNETLQDLITNSVENTNNTKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKA DLTKDIKTLNVEEGLLELSGHLIDQKADIAKNQADIQNQANIQDLAAYN ELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDAL NKASSENTQNIKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDR IAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLITANKTAIDENKASADTKFA ATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVDFGDFGRVTALDTKVNAFDGRITALD SKVENGMAAQAALSGLFQPYSGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNL AFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (650 аминокислот)
American V1122 (SEQ ID NO: 26)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAVSTTNAQAQSRSLDQIQTKLADLAGKIAA GKNGGGQNNQNNQNDINKYLFLSQYANILTMEELNNNVKNSSSIEETLETFD GWLENDVADLEDGVEELTKNQNTLIEKDEEHDRLIAQNQADIQTLNENNVVE LFNLSDRIDQKADIAKNQADIAQNNESEELYDFDNEVAEKIGEIHAYTEE VNKTLQDLITNSVKNTDNIDKNKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKN NVEEGLLELSGHLIDQKADLTKDIKTLENNVEEGLDLDSGRLIDQKADIAKN QADIAQNQTDIQDLAAYNELQDQYQKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIKNQADIANNINNIYELAQQQDQ HSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLIT ANKTAIDENKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVDFGDFGRV TALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSGKFNATAALGGY GSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (616 аминокислот)

American P44 (SEQ ID NO: 27)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGTASTANAQVASPANQKIQQKIKKVRKELRQ DIKSLRNDIDSNTADIGSLNDDVADNQDDILDNQADIAKNQDDIEKNQADIK ELDKEVGVLSREIGSLNDDIADNYTDIIDNYTDIIDNQANIAKNQDDIEKNQ ADIKELDKKEVGVLSREIGSLNDDVADNQDDIAKNQADIQTLENNVEEGLLEL SGHLDDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLID QKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAEQTEAIDALNKASSENTQNIAKNSN RIKALESNVEEGLLELSGHLIDQKADLTDKIKALESNVEEGLLELSGHLIDQ KADIAQNQANIQDLAAYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIKNQADIANNINNIYELAQQQDQ HSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLIT ANKTAIDANKVSADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVDAFDSRV TALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFPYPSVGKFNATAALGGY GSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (668 аминокислот)
American V1171 (SEQ ID NO: 28)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGATSTVNAQVVEQFFPNIFFNENHDELDDAY HNMILGDTAIVSNSQDNSTQLKFYSNDEDSVPDSSLFSKLLHEQQNLGFKAG DTIIPLDKDGKPVYTKDTRTKDGKQVETVYSVTTKIATQDDVEQSAYSRIQG DIDDLIDINREVNEYLKATHDYNERQTEAIDALNKASSENTDRIDTAERID KNEYDIKALESNVEEGLLELSGHLIDQKADLTDKIKALESNVEEGLLELSGH LIDQKADLTDKIKALESNVEEGLDLSGRLIDQKADIAQNQANIQDLAAYNE LQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALN KASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYN ELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIKNQADIANNINNIYELAQQQDQH SSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLITA NKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVDFDGRVT ALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFPYPSVGKFNAT AALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (674 аминокислот)
American TTA24 (SEQ ID NO: 29)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQSRDRSLEDIQDSISKLVQDDID TLKQDQQKMNYLLLNQLANTLITDELNNNVIKNTNSIEALGDEIGWLENDI ADLEEGVEELTKNQNTLIEKDEEHDRLIAQNQADIQTLENNVVEELFNLGR LIDQEADIAKNNASIEELYDFDNEVAERIGEIHAYTEEVNKTLENLITNSVK NTDNIDKNKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLI DQKADLTDKIKALESNVEEGLDLSGRLDDQKADLTDKIKALESNVEEGLLD LSGRLDDQKADIAQNQTDIQLAAYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQ NIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIKNQADIANNINNIY ELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTNRIATAELGIAENKKDAQIAKQANANK TAIDENKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVDFDGRVTAL DTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFPYPSVGKFNATAALGGYGSK SAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (613 аминокислот)
American O35E (SEQ ID NO: 30)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGATSTVNAQVVEQFFPNIFFNENHDELDDAY HNMILGDTAIVSNSQDNSTQLKFYSNDEDSVPDSSLFSKLLHEQQNLGFKAG DTIIPLDKDGKPVYTKDTRTKDGKQVETVYSVTTKIATQDDVEQSAYSRIQG DIDDLIDINREVNEYLKATHDYNERQTEAIDALNKASSENTDRIDTAERID KNEYDIKALESNVEEGLLELSGHLIDQKADLTDKIKALESNVEEGLLELSGH LIDQKADLTDKIKALESNVEEGLDLSGRLDDQKADIAKNQADIAQNQTDIQ DLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIKNQADIANNINNIYELA QQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEH DKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVDFD FDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFPYPSV GKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGV NYEF (576 аминокислот)

American SP12-6 (SEQ ID NO: 31)	MKTMKLLPLKIAVTSAMMVGLGMASTANAQQQKSPKTEIFLPNLFNDNTELT TDPLYHNMILGNTALLTQENQYKFYADDGNGVPDSSLFNKILHDQLLHGFKFE GDTIIPLDENGKPVYKLDSEIVEQGKTKTVYSVTTKTATADDVNSAYSIRGIQG DIDDLYEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNREVQNNIENIHELAAQQQD QHSSDIKTLKKNVEKDLLDLSGRLIAQKEDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYA QKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNSNHIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKAD LTKDIKALESNVEEGLLDLSGRLLDQKADIAQNQANIQLAAYNELQDAYAK QQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENT QNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNI YELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEK DKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGT KVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQ PYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSY NIGVNYEF (684 аминокислот)
American SP12-5 (SEQ ID NO: 32)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQATETFLPNLFNDNYTETTDPLY HGMILGNTAITQDTQYKFAENGNEVPDSSLFFNKILHDQQLNGFKEGDIIIP LDENGKPVYKLDSEITENGVKRKVYSVTTKTATREDVEQSAYSIRGIQGDIDDL YEANKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNKEVQNNIENIHELAAQQQDQHSSD IKTLKKNVEEGLLELSGRLIAQKEDIAQNQTDIQDLATYNELQDQYAKQTE AIDALNKASSENTQNIAKNSNHIKTLENNIEEGLLELSGHLIDQKADLTKDI KALESNVEEGLLDLSGRLLDQKADIAKNQADIAQNQTDIQDLAAYNELQDQY AQKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSE NTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI EKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDL GTVKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGL FQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKG SYNIGVNYEF (686 аминокислот)
Swedish BC5 (SEQ ID NO: 33)	MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQAKNDITLEDLPYLKIDQNEL EADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELDEVDGWNQNDIANLEDD VETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNQQRNLV NGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIAHNEAQNETLKGGLIT NSIENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLLDQKADIDNNINNIYELA QQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQLATYNELQ DQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKAS SENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIAN NINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNT LIEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT DLGTVKVDGFDGRVTALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPY SVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNI GVNYEF (630 аминокислот)
American 7169 (SEQ ID NO: 34)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQAQDRSLEQIQDKLANLVEKIEQ AKSQNGQSQKDINQYLLLSQYANVLTMEELNNNVKNSSSIETLDNDIAWLN DDLIDLDKEVGVLSRDIGSLHDDVAQNQADIKTLKNNVVEELFNLSDRLLDQ EADIAQNNESEDLYDFGREVAESIGEIAHNEAQNETLKDITNSVKNTDN ITKNKADIQALENDVGKELNLSGRLLDQKADIDNNINHIEYELAQQQDQHSS DIKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTKDIKALESNVEEGLLDLSGRLLDQ KADIAQNQANIQLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQQQDQ HSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKLIT ANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDGRV TALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFNATAALGGY GSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (616 аминокислот)

Finnish FIN2344 (SEQ ID NO: 35)	MKTMKLLPLKIAVTSAMI IGLGATSTVNAQVVEQFFPNIFFNENHDELDAY HNMILGDTAIVSNSQDNSTQLKFYSNDEDSVPDSLFSKLLHEQQLNGFKAG DTIIPLDKDGKPVYTKDTRTKDGKVVTVSVTTKIATQDDVEQSAYSRIQGG DIDDLIDINREVNEYLKATHDYNERQTEAIDALNKASSANTDRIDTAERID KNEYDIKALESNVKGDLDDLSGRLIAQKEDIDNNINHIYELAQQQDQHSSDI KTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTDKIKLESNVEEGLLDLSGRLIDQKA DIAQNQANIQDLAAYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNE LQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQQQDQHS SDIKTLAKVSAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDEHDKLITAN KTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGDFGRVTA LDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFNATAALGGYGS KSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (614 аминокислот)
American V1118 (SEQ ID NO: 36)	MKTMKLLPLKIAVTSAMI IGLGAASTANAQTETFLPNLFDNDYTETTDPLY HGMILGDTAITQDTQYKFYAENGNEVPDSLFFNKILHDQLLNGFKAGDTIIP LDENGKPVYKLDERTENGVKRKVSVTTKTATQADVEQSAYSRIQGGDIDDL YEANKENVNRLIEHGDKI FANEESVQYLNREVQNNIENIHELAAQQDQHSSD IKTLKKNVEKDLDDLSGRLIAQKEDIAQNQTDIQLATYNELQDQYAKQTE AIDALNKASSENTQNIAKNSNHIKTLENNIEECLLELSGHLIDQKADLTDKI KALESNVEEGLLDLSGRLIDQKADIAQNQANIQDLAAYNELQDAYAKQTEA IDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIED LAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQ QQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDEHD KLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGF DGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVG KFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVN YEF (679 аминокислот)
American V1145 (SEQ ID NO: 37)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQETLEEVLESIKQINEQDLQDDI GYNSALDRYLVLVSQYGNLLIAKELNENVEKNSNSIAKNSNSIADLEADVGYL AENQNTLIEQNETINQELEGITHELESFIAYAHQDQKNLVNEFEIEKNKDA IAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHAYTEEVNKTLENLITNSVKNTDNITK NKADIQALESNVEKELNLSGRLIDQKADIDNNINHIYELAQQQDQHSSDIK TLKKNVEEGLLELSGHLIDQKSDIAQNQTDIQLATYNELQDQYAKQTEAI DALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDL AAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEA IDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIED LAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQ QQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDEHD KLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGF DSRV TALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFNATAA LGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (724 аминокислот)
American V1156 (SEQ ID NO: 38)	MKTMKLLPLKIAVTSALIVGLGAASTANAQAQARDRSLEDIQALIGNIDVDK IRSQKQKNPEIFQYLLNQLSNTLITDELNNNVIKNTNSIETLDNDIAWLND DLIDLKKEVGVLSRDIGSLHDDVAQNQADIKTLENNVVEELFNLSDRLIDQE AEIAQNNESIEDLYDFGREVAESIGEIHANEAQNETLKDITNSVKNTDNI DKNKADIQALENNVEEGLLELSGHLIDQKADLTDKIKALESNVEEGLLDLSG RLLDQKADIAKNQADIAQNQTDIQLAAYNELQDQYAKQTEAIDALNKASS ENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQD AYAKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDI KTLAKVSAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDEHDKLITANKTA IDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGDFSRVTALDT KVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSA VAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF (611 аминокислот)

UspA2 может представлять собой UspA2 из *M. catarrhalis* штамма ATCC (зарегистрированный в США товарный знак) 25238™, American 2933, American 2912, American 2908, Finnish 307, Finnish 353,

Finnish 358, Finnish 216, Dutch H2, Dutch F10, Norwegian 1, Norwegian 13, Norwegian 20, Norwegian 25, Norwegian 27, Norwegian 36, BC5SV, Norwegian 14, Norwegian 3, Finish 414, Japanese Z7476, Belgium Z7530, German Z8063, American O12E, Greek MC317, American V1122, American P44, American V1171, American TTA24, American O35E, American SP12-6, American SP12-5, Swedish BC5, American 7169, Finnish FIN2344, American V1118, American V1145 или American V1156. UspA2 может представлять собой UspA2, как указано в любом из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. UspA2 может представлять собой UspA2 из другого источника, соответствующий последовательности UspA2 из любого из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. Специалист в данной области может определять соответствующие последовательности UspA2 с использованием различных алгоритмов. Например, можно использовать программу Gap или программу Needle для определения последовательностей UspA2, соответствующих любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38.

UspA2 может представлять собой последовательность по меньшей мере с 95% идентичности, на протяжении полной длины, с любым из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38.

Иммуногенные фрагменты UspA2 содержат иммуногенные фрагменты по меньшей мере из 450 непрерывных аминокислот из SEQ ID NO: 1, 490 непрерывных аминокислот из SEQ ID NO: 1 (например, the UspA2 фрагмент of MC-004 или MC-005), 511 непрерывных аминокислот из SEQ ID NO: 1 (например, фрагмент UspA2 из конструкции MC-001, MC-002, MC-003 или MC-004), 534 непрерывных аминокислот из SEQ ID NO: 1 (например, фрагмент UspA2 из MC-009 или MC-011) или 535 непрерывных аминокислот из SEQ ID NO: 1 (например, фрагмент UspA2 из MC-007, MC-008 или MC-010). Иммуногенные фрагменты могут стимулировать образование антител, которые могут связывать SEQ ID NO: 1.

Иммуногенные фрагменты UspA2 могут содержать иммуногенные фрагменты по меньшей мере из 450, 490, 511, 534 или 535 непрерывных аминокислот из любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. Иммуногенные фрагменты UspA2 могут содержать иммуногенные фрагменты UspA2 из любой из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 38, соответствующие фрагменту UspA2 из SEQ ID NO: 1 в любой из конструкций UspA2 MC-001, MC-002, MC-003, MC-004, MC-005, MC-006, MC-007, MC-008, MC-009, MC-010 или MC-011. Иммуногенные фрагменты могут стимулировать образование антител, которые могут связывать полную размерную последовательность, из которой происходит фрагмент.

Выравнивание между парами полипептидов можно рассчитывать посредством различных программ. Например, можно использовать программу Needle из пакета EMBOSS (бесплатное программное обеспечение; EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000). Trends in Genetics 16(6): 276-277) и программу Gap из пакета GCG (зарегистрированный в США товарный знак) (Accelrys Inc.).

Программы Gap и Needle представляют собой реализацию алгоритма Нидлмана-Вунша, описанного в: Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. В этих программах часто используют оценочную матрицу BLOSUM62 (Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff (1992), "Amino acid substitution matrices from protein blocks"), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (Biochemistry): 10915-10919) с штрафами за открытие и расширение пропуска, соответственно, 8 и 2. Иногда используют также оценочную матрицу PAM250 (Dayhoff et al., (1978), "A model of evolutionary changes in proteins", In "Atlas of Protein sequence and structure" 5(3) M.O. Dayhoff (ed.), 345-352, National Biomedical Research Foundation, Washington).

Оценочные матрицы описывают по количественной оценке тенденции каждой аминокислоты подвергаться мутации до другой аминокислоты или оставаться консервативной. Эти значения, как правило, рассчитывают по статистике мутаций, наблюдаемых при точных попарных или множественных выравниваниях, или даже в фрагментах из множественных выравниваний. Как правило, в этих таблицах, если высокое положительное значение ассоциировано с парой идентичных аминокислот, это является показателем того, что этот остаток проявляет низкую тенденцию к мутации. И напротив, высокое положительное значение, ассоциированное с парой различных аминокислот, является показателем высокой тенденции к мутации между этими двумя. И это называют "консервативной заменой".

Рассматривая попарное выравнивание, можно наблюдать выровненные идентичные остатки ("случаи идентичности") между двумя последовательностями. Процент идентичности можно вычислять посредством умножения на 100 (1) отношения между количеством случаев идентичности и длиной выравнивания (например, в выходе программы Needle), или (2) отношения между количеством случаев идентичности и длиной самой длинной последовательности, или (3) отношения между количеством случаев идентичности и длиной самой короткой последовательности, или (4) отношения между количеством случаев идентичности и количеством выровненных остатков (например, в выходе программы Gap).

Проценты идентичности из табл. 8 рассчитывали в соответствии с определением (3) из предшествующего раздела, с использованием попарного выравнивания, рассчитанного посредством программного обеспечения Gap.

В рамках изобретения "адъювант" обозначает соединение или вещество, которое при введении пациенту в комбинации с вакциной, иммунотерапевтическим средством, или другой содержащей антиген или иммуноген композицией увеличивает или усиливает иммунный ответ пациента на введенный антиген или иммуноген (по сравнению с иммунным ответом, который можно получить в отсутствие адъюванта). Это следует отличать от "адъювантной терапии", определенной Национальным институтом онко-

логии Национального института здравоохранения Соединенных Штатов в контексте лечения злокачественных опухолей как дополнительное лечение, проводимое после первичного лечения, для снижения риска того, что произойдет рецидив злокачественной опухоли.

Изобретение дополнительно относится к белкам формулы (I), содержащим консервативные аминокислотные замены. Например, белки формулы (I) могут содержать консервативную замену любой аминокислоты из UspA2 из *Moraxella catarrhalis*, как описано в любой из последовательностей, указанной в настоящем описании (например, любой последовательности UspA2, указанной в SEQ ID NO. 1 - SEQ ID NO. 38).

В рамках изобретения "сигнальный пептид" относится к короткому (менее 60 аминокислот, например 3-60 аминокислот) полипептиду, который присутствует в белках-предшественниках (как правило, на N-конце), и который, как правило, отсутствует в зрелом белке. Сигнальный пептид (sp) является, как правило, богатым гидрофобными аминокислотами. Сигнальный пептид направляет транспорт и/или секрецию транслированного белка через мембрану. Сигнальные пептиды также можно называть нацеливающими сигналами, транзитными пептидами, сигналами локализации или сигнальными последовательностями. Например, сигнальная последовательность может представлять собой котрансляционный или посттрансляционный сигнальный пептид.

Гетерологичный сигнальный пептид можно отщеплять от белковой конструкции посредством пептидаз сигнального пептида в ходе или после транспорта или секреции белка. Например, пептидаза сигнального пептида представляет собой пептидазу сигнального пептида I. "Гетерологичный" сигнальный пептид представляет собой пептид, не ассоциированный с белком, как он существует в природе.

В рамках изобретения "лечение" обозначает предотвращение возникновения симптомов состояния или заболевания у пациента, предотвращение рецидива симптомов состояния или заболевания у пациента, задержку рецидива симптомов состояния или заболевания у пациента, уменьшение тяжести или частоты симптомов состояния или заболевания у пациента, замедление или прекращение прогрессирования состояния и частичное или полное прекращение симптомов заболевания или состояния у пациента.

В рамках изобретения "необязательно" означает, что описанное затем событие(события) могут произойти или могут не произойти, и включает как событие(события), которые происходят, так и события, которые не происходят.

Отит среднего уха является основной причиной заболеваемости у 80% всех детей в возрасте менее 3 лет. (Expert Rev. Vaccines 5:517-534 (2006)). Более чем у 90% детей развивается отит среднего уха до возраста 7 лет (Current Opinion in Investigational Drugs 4:953-958 (2003)). В 2000 г. состоялось 16 млн приемов у врачей частной практики по поводу отита среднего уха в Соединенных Штатах Америки, и выдано приблизительно 13 млн антибактериальных предписаний. (Pediatrics 113:1451-1465 (2004)). В европейских странах опубликованные частоты острого отита среднего уха лежат в диапазоне 0,125-1,24 на ребенка в год. (Expert Review of Vaccines 8: 1479-1500 (2009)). Отит среднего уха является связанной с затратами инфекцией и наиболее распространенной причиной для введения антибиотиков детям. (Current Infectious Disease Reports 11:177-182 (2009)). Бактерии являются ответственными за приблизительно 70% случаев острого отита среднего уха, где *Streptococcus pneumoniae*, нетипируемый *Haemophilus influenzae* (NTHi) и *Moraxella catarrhalis* преобладают в качестве этиологических агентов (Expert Review of Vaccines 5:517-534 (2006)). Подгруппа детей, испытывающих рецидивирующий и хронический отит среднего уха, и предрасположенных к этим отитам детей обладают продолжительными эффузиями среднего уха, ассоциированными с потерей слуха и задержкой речевого и языкового развития. (Current Infectious Disease Reports 11:177-182 (2009)). Недавнее давление антибиотиков и вакцинация конъюгированной пневмококковой вакциной привели к появлению продуцирующих β -лактамазу *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis* в качестве лидирующих организмов, вызывающих острый отит среднего уха в Северной Америке, следом за *Streptococcus pneumoniae* (Pediatr Clin N Am 60 (2013) 391-407).

Поскольку отит среднего уха является многофакторным заболеванием, возникает вопрос о целесообразности предотвращения отита среднего уха с использованием способа вакцинации (Current Infectious Disease Reports 11:177-182 (2009)).

Модель на шиншиллах является надежной и проверенной моделью на животных отита среднего уха и его предотвращения (Expert Review of Vaccines 8:1063-1082 (2009)). В то время как модель на шиншиллах может имитировать естественное течение инфекции у человека, другие авторы предполагают, что результаты для модели на шиншиллах могут меняться от лаборатории к лаборатории. (Current Opinion in Investigational Drugs 4:953-958 (2003)).

Различных других грызунов также использовали для индукции отита среднего уха, и обобщение приведено в Vaccine 26:1501-1524 (2008). Мышиную модель на животных часто изучают в исследованиях отита среднего уха.

Присутствие бактерицидных антител ассоциировано с защитой от отита среднего уха, обусловленного нетипируемым *H. influenzae*. (Current Opinion in Infectious Disease 16:129-134 (2003)). Однако иммунный ответ не обязательно должен быть бактерицидным, чтобы быть эффективным против NTHi. Антитела, которые просто вступают в реакцию с поверхностными адгезинами NTHi, могут уменьшать или исключать отит среднего уха у шиншилл. (Current Opinion in Investigational Drugs 4:953-958 (2003)).

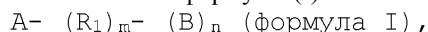
Хроническое обструктивное заболевание легких представляет собой хроническое воспалительное заболевание легких и является главной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Приблизительно одна из 20 смертей в 2005 г. В США имела COPD в качестве лежащей в основе причины (Drugs and Aging 26:985-999 (2009)). Прогнозируют, что в 2020 г. COPD может подняться до пятой основной причины утраченных лет жизни с поправкой на длительность инвалидизации, хронических инвалидизирующих заболеваний, и до третьей из наиболее важных причин смертности (Lancet 349:1498-1504 (1997)).

Течение COPD характеризуется прогрессирующим ухудшением в ограничении воздушного потока и уменьшении легочной функции. COPD может осложняться частыми и рецидивирующими острыми приступами (АЕ), ассоциированными с огромными расходами на здравоохранение и высокой заболеваемостью. (Proceedings of the American Thoracic Society 4:554-564 (2007)). Одно исследование позволяет предположить, что приблизительно 50% острых приступов симптомов COPD вызваны нетипируемыми *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. (Drugs and Aging 26:985-999 (2009)). *Haemophilus influenzae* (H. influenzae) обнаружен при 20-30% обострений COPD; *Streptococcus pneumoniae* - при 10-15% обострений COPD; и *Moraxella catarrhalis* - при 10-15% обострений COPD. (New England Journal of Medicine 359:2355-2365 (2008)). Показано, что *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis* являются первичными патогенами при острых приступах бронхита в Гонконге, Южной Корее и на Филиппинах, в то время как *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter spp.* составляют большую часть патогенов в других азиатских странах/регионах, включая Индонезию, Таиланд, Малайзия и Тайвань (Respirology, (2011) 16, 532-539; doi:10.1111/j.1440,1843,2011,01943.x). В Бангладеш для 20% пациентов с COPD показан посев мокроты, положительный по *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, в то время как для 65% пациентов с АЕCOPD (острый приступ COPD) показан посев мокроты, положительный по *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Moraxella catarrhalis* и их сочетаниям. (Mumensingh Medical Journal 19: 576-585 (2010)). Однако предположили, что двумя наиболее важными мерами для предотвращения обострения COPD являются активные иммунизации и постоянное поддержание фармакотерапии. (Proceedings of the American Thoracic Society 4:554-564 (2007)).

Внебольничная пневмония (САР) описана в качестве основной причины смертности от инфекционных заболеваний и шестой по счету причины общей смертности в Соединенных Штатах Америки. *Moraxella catarrhalis* является одним из патогенов, ассоциированных с САР в Северной Америке (Clin Chest Med 26 (2005) 37-55) и является одним из патогенов, ассоциированных с внебольничной пневмонией от умеренной до сильной тяжести в Японии (J Infect Chemother. 2014 Nov 20. pii: S1341-321X(14) 00396-1. doi: 10, 1016/j. jiac. 2014, 11, 006 [Epub ahead of print]).

Существует необходимость в эффективных вакцинах против *M. catarrhalis*.

Настоящее изобретение относится к белкам формулы (I).



где A представляет собой UspA2 из *Moraxella catarrhalis* или его иммуногенный фрагмент; R_1 представляет собой аминокислоту; m представляет собой 0 или 2; B представляет собой гистидин и n представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В одном конкретном варианте осуществления определены R_1 и m, где $(R_1)_m$ представляет собой AS (аланин, серин). В другом варианте осуществления, R_1 представляет собой неприродные аминокислоты.

В одном из вариантов осуществления определены белки формулы (I) и белки по изобретению, где m представляет собой 0. В одном из вариантов осуществления, когда m представляет собой 0, n представляет собой 2. В другом варианте осуществления изобретения, когда m представляет собой 0, n представляет собой не 0.

В одном из вариантов осуществления m представляет собой 2.

В одном конкретном варианте осуществления n выбран из группы, состоящей из 1, 2 и 6. В другом варианте осуществления n выбран из группы, состоящей из 2 и 6. В одном конкретном варианте осуществления n представляет собой 2. В другом варианте осуществления n представляет собой 6.

В одном из вариантов осуществления n выбран из группы, состоящей из 0, 1, 2 и 6, или любой ее подгруппы.

В одном из вариантов осуществления n представляет собой 0. В другом варианте осуществления, когда n представляет собой 0, m представляет собой 2.

В одном из вариантов осуществления n представляет собой 1. В одном из вариантов осуществления n представляет собой 3. В одном из вариантов осуществления n представляет собой 4. В одном из вариантов осуществления n представляет собой 5.

В одном из вариантов осуществления белки формулы (I) дополнительно содержат метионин (M) на аминоконце; белок со следующей формулой: метионин-A- $(R_1)_m$ -(B)_n. Они включены в белки по изобретению. В одном конкретном варианте осуществления, когда m представляет собой 0, и n представляет собой 0, белки формулы (I) и белки по изобретению являются неприродными белками.

В одном из вариантов осуществления белки формулы (I) и белки по изобретению являются неприродными белками.

В одном из вариантов осуществления, определены белки формулы (I), где А представляет собой UspA2 из *M. catarrhalis*. В другом варианте осуществления, определены белки формулы (I), где А представляет собой UspA2, как указано в аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 или из любой подгруппы из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. В другом варианте осуществления, определены белки формулы (I), где А представляет собой UspA2, где UspA2 является по меньшей мере на 63, 66, 70, 72, 74, 75, 77, 80, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным, на протяжении полной длины, с SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления определены белки формулы (I), где А представляет собой UspA2, где UspA2 является приблизительно на 75-100% идентичным аминокислотной последовательности UspA2, указанной в SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления А представляет собой UspA2, где UspA2 является приблизительно на 90-100% идентичным аминокислотной последовательности UspA2, указанной в SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления А представляет собой UspA2, где UspA2 является по меньшей мере на 95% идентичным аминокислотной последовательности UspA2, указанной в SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления определены белки формулы (I), где А представляет собой UspA2, где UspA2 является приблизительно на 75-100% идентичным аминокислотной последовательности UspA2, указанной в любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. В другом варианте осуществления А представляет собой UspA2, где UspA2 является приблизительно на 90-100% идентичным аминокислотной последовательности UspA2, указанной в любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. В дополнительном варианте осуществления, А представляет собой UspA2, где UspA2 является по меньшей мере на 95% идентичным UspA2, как указано в любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. В конкретном варианте осуществления, А представляет собой UspA2, обладающий аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления определены белки формулы (I), где А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 из *M. catarrhalis*. В другом варианте осуществления А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, где UspA2 обладает аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, или любой подгруппы из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, где UspA2 является приблизительно на 75-100% идентичным аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, где UspA2 является приблизительно на 90-100% идентичным SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, где UspA2 является по меньшей мере на 95% идентичным SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, где UspA2 является приблизительно на 75-100% идентичным аминокислотной последовательности, указанной в любом из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, где UspA2 является приблизительно на 90-100% идентичным любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. В дополнительном варианте осуществления А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, где UspA2 является по меньшей мере на 95% идентичным любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. В конкретном варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, где UspA2 обладает аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 из *M. catarrhal*, выбранный из группы, состоящей из аминокислот 30-540 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 39), аминокислот 31-540 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 40), аминокислот 30-519 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 41), аминокислот 30-564 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 42) и аминокислот 31-564 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 43). Более конкретно, в одном из вариантов осуществления, А представляет собой SEQ ID NO: 43, аминокислоты 31-564 из SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления, А представляет собой SEQ ID NO: 42, аминокислоты 30-564 из SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 из *M. catarrhal*, выбранный из группы, состоящей из аминокислот 30-540 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 39), аминокислот 31-540 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 40) и аминокислот 30-519 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 41). В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 с по меньшей мере 52% (American 2908), 55% (Norwegian 25), 57% (Japanese Z7476), 62% (Finnish FIN2344), 64% (American 2912), 69% (American P44), 73% (Amer-

ican 7169), 76% (Norwegian 27), 81% (American V1145), 88% (German Z8063) или 100% (Swedish BC5) идентичности с SEQ ID NO. 39. В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 с по меньшей мере 52% (American 2908), 57% (Dutch F10), 62% (American 2933), 65% (Greek MC317), 67% (American V1122), 70% (American P44), 73% (American 7169), 76% (Norwegian 3), 81% (German Z8063), 100% (Swedish BC5) идентичности с SEQ ID NO. 43.

В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 из *M. cattarhalis* из SEQ ID NO: 2 -SEQ ID NO: 38, где фрагмент содержит аминокислоты, выравнивающиеся с аминокислотами 30-540 из SEQ ID NO. 1 (SEQ ID NO: 39), аминокислотами 31-540 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 40), аминокислотами 30-519 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 41), аминокислотами 30-564 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 42) или аминокислотами 31-564 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 43). В одном из вариантов осуществления, программу Gap (из пакета GCG) или программу Needle (из пакета EMBOSS), реализующие алгоритм Нидлмана-Вунша, можно использовать для выравнивания последовательностей.

UspA2 - SEQ ID NO: 1

```
MKTMKLLPLKIAVTSAMIIGLGAASTANAQAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDIT
ALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELDEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGE
AIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYD
FGHEVAESIGEIHANEAQNETLTKGLITNSIENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLSG
RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQA
NIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDA
LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIKNQADIANNINN
IYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKL
ITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVTAIDTK
VNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRV
NPNLAFKAGAAINTSGNKKGSYNIGVNYEF
```

Аминокислоты 30-540 UspA2 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID

NO: 39

```
QAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDIT
ALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELDEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGE
AIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYD
FGHEVAESIGEIHANEAQNETLTKGLITNSIENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLSG
RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQA
NIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDA
LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIKNQADIANNINN
IYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKL
ITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVTAIDTK
```

Аминокислоты 31-540 UspA2 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:

40

```
AKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDIT
ALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELDEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGE
AIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYD
```

FGHEVAESIGETIAHNEAQNETLKGLITNSIENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLSG
 RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQA
 NIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDA
 LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINN
 IYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKL
 ITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDSRVTALDTK

Аминокислоты 30-519 UspA2 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:

41

QAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDIT
 ALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELEDVGVNQNNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGE
 AIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYD
 FGHEVAESIGETIAHNEAQNETLKGLITNSIENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLSG
 RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQA
 NIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDA
 LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINN
 IYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKL
 ITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKS

Аминокислоты 30-564 UspA2 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:

42

QAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDIT
 ALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELEDVGVNQNNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGE
 AIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYD
 FGHEVAESIGETIAHNEAQNETLKGLITNSIENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLSG
 RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQA
 NIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDA
 LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINN
 IYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKL
 ITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDSRVTALDTK
 VNAFDGRITALDSKVENGMAAQAA

Аминокислоты 31-564 UspA2 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:

43

AKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDIT
 ALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELEDVGVNQNNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGE
 AIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYD
 FGHEVAESIGETIAHNEAQNETLKGLITNSIENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLSG
 RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQA
 NIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDA
 LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINN
 IYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKEHDKL
 ITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDSRVTALDTK
 VNAFDGRITALDSKVENGMAAQAA

В другом варианте осуществления А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 из *M. catarrhalis*, который отличается от SEQ ID NO: 1 одной или несколькими из следующих аминокислот: ак (аминокислоты) 30-298, ак 299-302, ак 303-333, ак 334-339, ак 349, ак 352-354, ак 368-403, ак 441, ак 451-471, ак 472, ак 474-483, ак 487, ак 490, ак 493, ак 529, ак 532 или ак 543. В другом варианте осуществления, А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 из *M. catarrhalis*, который отличается от SEQ ID NO: 1 тем, что он содержит по меньшей мере одну вставку аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, содержащий связывающий ламинин домен и связывающий фибронектин домен.

В дополнительном варианте осуществления А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, содержащий связывающий ламинин домен, связывающий фибронектин домен и связывающий C3 домен.

В дополнительном варианте осуществления А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, содержащий связывающий ламинин домен, связывающий фибронектин домен, связывающий C3 домен и

амфипатическую спираль.

Связывающий ламинин домен, связывающий фибронектин домен, связывающий C3 домен или амфипатическая спираль могут являться такими, как определено для SEQ ID NO: 1, или могут представлять собой соответствующую последовательность в любой из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 38.

Белки формулы (I) и белки по изобретению можно использовать в качестве иммуногенов у пациентов, таких как млекопитающие, в частности, человек. В частности, белки формулы (I) и белки по изобретению можно использовать в индукции иммунного ответа против *M. catarrhalis* у пациентов, в частности, людей. Белки формулы (I) и белки по изобретению можно использовать в лечении или профилактике инфекции или заболевания, вызванных *M. catarrhalis*. Более конкретно, белки формулы (I) и белки по изобретению можно использовать в лечении или профилактике отита среднего уха и/или COPD, и/или AECOPD, и/или пневмонии.

Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим UspA2 из *M. catarrhalis* или его иммуногенный фрагмент. Настоящее изобретение также относится к вакцинам, содержащим такие иммуногенные композиции и к их терапевтическим применениям. Иммуногенные композиции и вакцины по настоящему изобретению можно использовать в лечении или профилактике *M. catarrhalis* инфекция или заболевание. Более конкретно, иммуногенные композиции и вакцины, описываемые в настоящем описании, можно использовать в лечении или профилактике отита среднего уха и/или COPD, и/или AECOPD, и/или пневмонии.

В одном из вариантов осуществления, иммуногенная композиция содержит UspA2 из *M. catarrhalis*. UspA2 может представлять собой один из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38 или последовательность UspA2, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную любому из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 38. UspA2 также может представлять собой последовательность UspA2, по меньшей мере на 63% (American 2908), 66% (Japanese Z7476), 70% (Dutch F10), 72% (Finnish 358), 74% (American P44), 77% (Finnish 307), 80% (Norwegian 3), 84% (American V1145), 90% (German Z8063) или 100% (Swedish BC5) идентичную последовательности из SEQ ID NO. 1.

В другом варианте осуществления, иммуногенная композиция содержит иммуногенный фрагмент UspA2. Иммуногенный фрагмент UspA2 может представлять собой SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43. Иммуногенный фрагмент UspA2 может представлять собой последовательность UspA2, по меньшей мере на 52% (American 2908), 55% (Norwegian 25), 57% (Japanese Z7476), 62% (Finnish FIN2344), 64% (American 2912), 69% (American P44), 73% (American 7169), 76% (Norwegian 27), 81% (American V1145), 88% (German Z8063) или 100% (Swedish BC5) идентичную SEQ ID NO. 39. Иммуногенный фрагмент UspA2 также может представлять собой последовательность UspA2, по меньшей мере на 52% (American 2908), 57% (Dutch F10), 62% (American 2933), 65% (Greek MC317), 67% (American V1122), 70% (American P44), 73% (American 7169), 76% (Norwegian 3), 81% (German Z8063), 100% (Swedish BC5) идентичную SEQ ID NO. 43. Описаны различия аминокислот в UspA2 из различных видов *Moraxella catarrhalis*.

UspA2 содержит связывающий ламинин домен (например, аминокислоты 30-177 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 44). В одном из вариантов осуществления, фрагмент UspA2 содержит связывающую ламинин область из SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления, фрагмент UspA2 содержит связывающую ламинин область из любой из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 38.

Аминокислоты 30-177 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 44:

QAKNDITLEDLPYLIKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELDEVDVG
NQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKNTQRNLVN
GFEIEKNKDAIAKNNESIED.

UspA2 содержит связывающий фибронектин домен (например, аминокислоты 165-318 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45). В одном из вариантов осуществления, фрагмент UspA2 содержит связывающую фибронектин область из SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления, фрагмент UspA2 содержит связывающую фибронектин область из любой из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 38. Связывающий фибронектин домен из SEQ ID NO: 45 также обладает свойствами связывания C3.

Аминокислоты 165-318 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45:

KDAIAKNNESIEDLYD
FGHEVAESIGEIHANNEAQNETLKGLITNSIENTNNITKNKADIQAENNVVEELFNLG
RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKNVEEGLLELSGHLIDQKTDIAQNQA
NIQDLATYNELQDQYQK.

UspA2 содержит связывающий компонент комплемента 3 (C3) домен (например, аминокислоты 30-539 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 46 или аминокислоты 165-318 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45). В одном из вариантов осуществления, фрагмент UspA2 содержит связывающую C3 область из SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления, фрагмент UspA2 содержит связывающий C3 домен из любой из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 38.

Аминокислоты 30-539 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 46:

QAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDIT
ALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELDEDVGNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGE
AIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYD
FGHEVAESIGEIAHNEAQNETLKLITNSIENTNNITKNKADIQALENNVVEELFNLGS
RLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEGLLESLGHLIDQKTDIAQNQA
NIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDA
LNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNINN
IYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIEKDKHDKL
ITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVGFDSDRVLTALDT

UspA2 содержит амфипатическую спираль (например, аминокислоты 519-564 из SEQ ID NO: 1 или аминокислоты 520-559 из SEQ ID NO:1). В одном из вариантов осуществления, фрагмент UspA2 содержит аминокислоты 519-564 из SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления, фрагмент UspA2 содержит аминокислоты 520-559 из SEQ ID NO:1. В дополнительном варианте осуществления, фрагмент UspA2 содержит амфипатическую спираль из любой из SEQ ID NO: 2 -SEQ ID NO:38.

В одном из вариантов осуществления, иммуногенная композиция содержит белок формулы (I), где А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, содержащий связывающий ламинин домен и связывающий фибронектин домен.

В дополнительном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит белок формулы (I), где А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, содержащий связывающий ламинин домен, связывающий фибронектин домен и связывающий С3 домен.

В дополнительном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит белок формулы (I), где А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, содержащий связывающий ламинин домен, связывающий фибронектин домен, связывающий С3 домен и амфипатическую спираль.

В другом варианте осуществления иммуногенная композиция содержит белок, как определено посредством формулы (I). Иммуногенная композиция может содержать, например, белок формулы (I) с дополнительным метионином на amino-конце.

В одном из вариантов осуществления настоящие иммуногенные композиции можно вводить с другими антигенами. Например, настоящую иммуногенную композицию можно вводить с антигенами из *H. influenzae*. Например, белок формулы (I) можно вводить с белком D (PD) из *H. influenzae*. Белок D может являться таким, как описано в WO91/18926. Настоящую иммуногенную композицию можно вводить с белком E (PE) и пилином А (PilA) из *H. Influenzae*. Белок E и пилин А могут являться такими, как описано в WO 2012/139225; содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки. Белок E и пилин А могут присутствовать в форме слитого белка.

В другом варианте осуществления иммуногенные композиции по изобретению можно вводить с дополнительными антигенами из других видов бактерий, как известно, также вызывающих отит среднего уха, COPD, AECOPD или пневмонию.

Количество иммуногенной композиции, необходимое для достижения желательного терапевтического или биологического действия, зависит от ряда факторов, таких как применение, для которого она предназначена, способы введения, реципиент, и тип и тяжесть состояния, подвергаемого лечению, и в конце концов остается на усмотрение лечащего врача или ветеринара. Как правило, можно ожидать, что типичная доза для лечения состояния, вызванного, полностью или частично, *M. catarrhalis* у человека, например, может лежать в диапазоне приблизительно 0,001-0,120 мг. Более конкретно, типичная доза для лечения состояния, вызванного, полностью или частично, *M. catarrhalis* у человека, может лежать в диапазоне от приблизительно 0,003 до приблизительно 0,03 мг белка. Настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, для применения в лечении или профилактике состояния или заболевания, вызванного, полностью или частично, *M. catarrhalis*. Иммуногенная композиция может содержать дополнительные антигены; типичная доза для лечения состояния, вызванного, полностью или частично, *H. influenzae* у человека, может лежать в диапазоне от приблизительно 0,005 до приблизительно 0,05 мг для каждого дополнительного антигена. Эту дозу можно вводить в форме отдельной единичной дозы. Можно вводить также несколько отдельных единичных доз. Например, отдельные единичные дозы можно вводить в качестве отдельных примиряющих доз в пределах первого года жизни или в качестве отдельных бустерных доз, вводимых с равномерными интервалами (например, каждые 1, 5 или 10 лет). Настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению для применения в лечении или профилактике состояния или заболевания, вызванного, полностью или частично, *Moraxella catarrhalis* в комбинации с по меньшей мере одним антигеном из *Haemophilus influenzae*.

Составы, содержащие иммуногенные композиции по изобретению, можно адаптировать для введения подходящим способом, например, посредством внутримышечного, сублингвального, чрескожного, интрадермального или интраназального способа. Такие составы можно получать посредством любого известного в данной области способа.

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать адъювант. Когда термин "адъювант" используют в этом описании, он относится к веществу, которое вводят в комбинации с иммуногенной композицией для стимуляции иммунного ответа пациентов на иммуногенный компонент композиции.

Пригодные адъюванты включают соль алюминия, такую как гель гидроксида алюминия или фосфат алюминия, или квасцы, но также могут представлять собой соль кальция, магния, железа или цинка, или могут представлять собой нерастворимую суспензию ацилированного тирозина, или ацилированных Сахаров, катионно или анионно дериватизированных сахаридов, или полифосфазенов. В одном из вариантов осуществления белок можно адсорбировать на фосфате алюминия. В другом варианте осуществления белок можно адсорбировать на гидроксида алюминия. В третьем варианте осуществления квасцы можно использовать в качестве адъюванта.

Пригодные адъювантные системы, стимулирующие преимущественный ответ Th1, включают не-токсичные производные липида А, монофосфориллипид А (MPL) или его производные, в частности, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL) (его получение см. в GB 2220211 A); и комбинацию монофосфориллипид А, предпочтительно, 3-де-О-ацилированного монофосфориллипид А, вместе либо с солью алюминия (например, фосфатом алюминия или гидроксидом алюминия), либо с эмульсией "масло-в-воде". В таких комбинациях антиген и 3D-MPL содержатся в одних и тех же структурах частиц, позволяя более эффективную доставку антигенных и иммуностимулирующих сигналов. Исследования показали, что 3D-MPL является способным дополнительно усиливать иммуногенность адсорбированного на квасцах антигена (Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1).

AS01 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А), QS21 ((Quillaja saponaria Molina, фракция 21) Antigenics, New York, NY, USA) и липосомы. AS01B представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL, QS21 и липосомы (50 мкг MPL и 50 мкг QS21). AS01E представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL, QS21 и липосомы (25 мкг MPL и 25 мкг QS21). В одном из вариантов осуществления иммуногенная композиция или вакцина содержит AS01. В другом варианте осуществления иммуногенная композиция или вакцина содержит AS01_B или AS01_E. В конкретном варианте осуществления иммуногенная композиция или вакцина содержит AS01_E.

AS02 представляет собой адъювантную систему содержащую MPL и QS21 в эмульсии масло/вода. AS02_v представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL и QS21 в эмульсии масло/вода (50 мкг MPL и 50 мкг QS21).

AS03 представляет собой адъювантную систему, содержащую α-токоферол и сквален в эмульсии масло/вода (м/в). AS03_a представляет собой адъювантную систему, содержащую α-токоферол и сквален в эмульсии м/в (11,86 мг токоферола). AS03_b представляет собой адъювантную систему, содержащую α-токоферол и сквален в эмульсии м/в (5,93 мг токоферола). AS03_c представляет собой адъювантную систему, содержащую α-токоферол и сквален в эмульсии м/в (2,97 мг токоферола). В одном из вариантов осуществления, иммуногенная композиция или вакцина содержит AS03.

AS04 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (50 мкг MPL), адсорбированный на соли алюминия (500 мкг Al³⁺). В одном из вариантов осуществления, иммуногенная композиция или вакцина содержит AS04.

Система, включающая в себя применение QS21 и 3D-MPL, описана в WO 94/00153. Композиция, где QS21 инактивируют с помощью холестерина, описана в WO 96/33739. Дополнительный адъювантный состав, включающий в себя QS21, 3D-MPL и токоферол в эмульсии масло в воде, описан в WO 95/17210. В одном из вариантов осуществления иммуногенная композиция дополнительно содержит сапонин, который может представлять собой QS21. Состав может также содержать эмульсию масло в воде и токоферол (WO 95/17210). Содержащие неметилованные CpG олигонуклеотиды (WO 96/02555) и другие иммуномодулирующие олигонуклеотиды (WO 0226757 и WO 03507822) также являются предпочтительными индукторами ответа TH1 и являются пригодными для использования по настоящему изобретению.

Дополнительные адъюванты представляют собой адъюванты, выбранные из группы из солей металлов, эмульсий масло в воде, агонистов Toll-подобного рецептора (в частности, агониста Toll-подобного рецептора 2, агониста Toll-подобного рецептора 3, агониста Toll-подобного рецептора 4, агониста Toll-подобного рецептора 7, агониста Toll-подобного рецептора 8 и агониста Toll-подобного рецептора 9), сапонинов или их сочетаний.

Настоящее изобретение относится к способу получения иммуногенной композиции, включающему в себя комбинацию белка формулы (I) или белка по изобретению с адъювантом.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вакцине, содержащей иммуногенную композицию по изобретению и фармацевтически приемлемый адъювант.

Возможные наполнители включают аргинин, плуроновою кислоту и/или полисорбат. В предпочтительном варианте осуществления, используют полисорбат 80 (например, TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 80). В дополнительном варианте осуществления, используют конечную концентра-

цию от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,06%. Конкретно, можно использовать конечную концентрацию 0,03, 0,04, 0,05 или 0,06% полисорбата 80 (мас./об.).

Настоящее изобретение относится к способу получения иммуногенной композиции или вакцины, включающему в себя комбинацию белка формулы (I) или белка по изобретению с фармацевтически приемлемым наполнителем.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим белки по изобретению. Термин "нуклеиновая кислота" относится к полимерной форме нуклеотидов. Нуклеотиды могут представлять собой рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, или модифицированные формы либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Термин включает одинарные и двойные формы ДНК. Нуклеиновые кислоты предпочтительно являются в основном свободными от других нуклеиновых кислот.

Настоящее изобретение относится к способу получения нуклеиновых кислот по изобретению. Нуклеиновые кислоты по изобретению можно получать способами, известными специалистам в данной области. Например, нуклеиновые кислоты по изобретению могут являться частично или полностью синтезированными. Нуклеиновые кислоты можно получать посредством расщепления более длинных нуклеиновых кислот или соединения более коротких нуклеиновых кислот.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики отита среднего уха. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики обострений при хроническом обструктивном заболевании легких. Обострение COPD может представлять собой острый приступ. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики пневмонии. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества белка формулы (I) или белка по изобретению.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, для применения в лечении или профилактике состояния или заболевания, вызванного, полностью или частично, *Moraxella catarrhalis*. Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

Настоящее изобретение относится к применению (a) белков формулы (I) и белков по изобретению, (b) иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, или (c) вакцины, содержащей (c1) белок формулы (I) или белок по изобретению, или (c2) иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции или заболевания, вызванных *M. catarrhalis*.

Настоящее изобретение относится к применению (a) белков формулы (I) и белков по изобретению, (b) иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, или (c) вакцины, содержащей (c1) белок формулы (I) или белок по изобретению, или (c2) иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики отита среднего уха.

Настоящее изобретение относится к применению (a) белков формулы (I) и белков по изобретению, (b) иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, или (c) вакцины, содержащей (c1) белок формулы (I) или белок по изобретению, или (c2) иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (AECOPD).

Настоящее изобретение относится к применению (a) белков формулы (I) и белков по изобретению, (b) иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, или (c) вакцины, содержащей (c1) белок формулы (I) или белок по изобретению, или (c2) иммуногенной композиции, содержащей белок формулы (I) или белок по изобретению, для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики пневмонии.

Следующие примеры предназначены только для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения никаким образом.

В примерах, следующие термины обладают указанным значением:

6xhis=шесть остатков гистидина;
xg=центробежная сила (количество ускорений свободного
падения)
AS=аланин, серин
BSA=бычий сывороточный альбумин;
°C=градусы Цельсия;
CaCl₂=хлорид кальция;
CD=круговой дихроизм;
CHCl₃=хлороформ;
CH₃CN=ацетонитрил;
CO₂=диоксид углерода;
Да=дальтон;
ДНК=дезоксирибонуклеиновая кислота;
DO=растворенный кислород;
DSC=дифференциальная сканирующая калориметрия;
ЭДТА=этилендиаминтетрауксусная кислота;
h=час;
H₂O=вода;
H₂O₂=пероксид водорода;

HCDI=индукция при высокой плотности клеток;
 HCl=соляная кислота;
 His=his=гистидин;
 IMAC=аффинная хроматография с использованием
 иммобилизованных металлов;
 IPTG=изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
 кВ=киловольт
 Л=литр;
 LB=Лурия-Бертани;
 LCDI=индукция при низкой плотности клеток;
 MeOH=метанол; мл=миллилитр;
 NaCl=хлорид натрия;
 ОБ./МИН=об./мин=оборотов в минуту;
 мин=минута;
 мМ=миллимолярный;
 мкг=микрограмм;
 мкл=микролитр;
 MW=молекулярная масса;
 m/z=масса/заряд;
 NaCl=хлорид натрия;
 NaPO₄=фосфат натрия;
 нг=нанограмм;
 NH₄OH=гидроксид аммония;
 нм=нанометр;
 O.D.=оптическая плотность;
 PBS=фосфатно-солевой буфер;
 ПЦР=полимеразная цепная реакция;
 psi=фунтов на квадратный дюйм;
 PVDF=поливинилидендифторид;
 SDS-PAGE=электрофорез в полиакриламидном геле с
 додецилсульфатом натрия;
 TFA=трифторуксусная кислота
 Tm=температура плавления;
 Tm₁=первая температура плавления;
 Tm₂=вторая температура плавления;
 масс./об.=масса/объем.

Примеры

Пример 1. Белковые конструкции

Белковые конструкции получали с различными фрагментами UspA2 в присутствии и в отсутствие дополнительных аминокислот. В следующей таблице описаны полученные белковые конструкции.

Таблица 2. Белковые конструкции, содержащие белок UspA2

ID конструкции	Описание	N-конец-----С-конец		
MC-001	UspA2+1/2 спирали+6His	Фрагмент UspA2 (ак: 30-540 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 47)	ASHNNNNH	
	ак	30	540 541	548
MC-002	UspA2+1/2 спирали	Фрагмент UspA2 (ак: 30-540 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 47)		
	ак	30	540	
MC-003	UspA2+1/2 спирали+1His	Фрагмент UspA2 (ак: 30-540 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 47)	H	
	ак	30	540 541	
MC-004	UspA2+1/2 спирали+2His	Фрагмент UspA2 (ак: 30-540 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 47)	HH	
	ак	30	540 541	542
MC-005	UspA2+Δспирали +6His	Фрагмент UspA2 (ак: 30-519 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 48)	ASHNNNNH	
	ак	30	519 520	527
MC-006	UspA2+Δспирали	Фрагмент UspA2 (ак: 30-519 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 48)		
		30	519	
MC-007	UspA2+спираль+ 6His	Фрагмент UspA2 (ак: 30-564 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 49)	ASHNNNNH	
	ак	30	564 565	572
MC-008	UspA2+спираль +2His	Фрагмент UspA2 (ак: 30-564 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 49)	HH	
	ак	30	564 565 566	
MC-009	UspA2+спираль +2His ΔQ	Фрагмент UspA2 (ак: 31-564 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 50)	HH	
	ак	31	564 565 566	
MC-010	UspA2+спираль +2His	Фрагмент UspA2 (ак: 30-564 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 49)		
	ак	30	564	
MC-011	UspA2+1/2 спирали +6His ΔQ	Фрагмент UspA2 (ак: 31-540 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 51)	ASHNNNNH	
	ак	30	540 541	548

ак=аминокислота

Последовательности ДНК и аминокислотные последовательности для каждой белковой конструкции, перечисленной в табл. 2, указаны ниже.

Последовательности белковых конструкций:

MC-001 (ДНК) - SEQ ID NO: 52

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
TCAGAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
CAGTATGGAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
TGGGTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCTGACCAAAAAATCA
GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
GAAGGTCAGGAAGGCAAAATCTGCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATC
TGGTGAAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCTATGCACATAACGAA
GCACAGAATGAAACCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAAATACCAATAACATTACCA
AAAACAAAGCAGATATTAGGGCGCTGGAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTAATCTGAGCGG
TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCAGAG
CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAAACCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAACTGATATTGCCCAGAATCAGGCAATATTCAGGA
TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAAAACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGC
AGGATGCCTATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
AGGCCGATATTGCCAACAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
GCCGATGCGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACAGAACACCCCTGATTGAAAAAGATA
AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAAATAAAGCCAGCGCAGA
TACCAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAATGCC
AAAAGCATTACCGATCTGGGCACCAAAGTTGATGGTTTGTAGCCGTGTGACCGCACTGGATA
CCAAAGCAAGCCATCATCATCACCACCACTAA

MC-001 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 30-540) (ASHHHHHH)

SEQ ID NO: 53

MQAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
DEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKNT
QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHAHNEAQNETLKGLITNSIENTN
NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKNVEE
GLLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI
AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
EKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVT

ALDTKASHHHHHH

MC-002 (ДНК) - SEQ ID NO: 54

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCCCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
 TCAGAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
 CAGTATGGAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
 TGGGTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCCTGACCAAAAAATCA
 GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
 GAAGGTCAGGAAGGCAAAATTCTGCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATC
 TGGTGAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
 AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAA
 GCACAGAATGAAACCCCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAAATACCAATAACATTACCA
 AAAACAAAGCAGATATTAGGCGCTGGAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTAATCTGAGCGG
 TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCAGAG
 CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAAACCCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
 AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAACTGATATTGCCCAGAATCAGGCAAATATTCAGGA
 TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
 CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAACACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGC
 AGGATGCCATATGAAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
 CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
 ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
 AGGCCGATATTGCCAACAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
 TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAA
 GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCCCTGATTGAAAAAGATA
 AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAAATAAAGCCAGCGCAGA
 TACCAAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAATGCC
 AAAAGCATTACCGATCTGGGCACCAAGTTGATGGTTTTGATAGCCGTGTGACCGCACTGGATA
 CCAAATAA

MC-002 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 30-540) SEQ ID NO:

55

MQAKNDITLEDLPYLIKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
 DEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKNT
 QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIAHNEAQNETLKGLITNSIENTN
 NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKNVEE
 GLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
 NELQD

AYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI

AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
 EKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTKVDGFDSRVT
 ALDTK

SEQ ID NO: 56

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
 TCAGAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
 CAGTATGGAAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
 TGGGTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCCTGACCAAAAAATCA
 GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
 GAAGGTGAGGAAGGCAAAATCTGCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACCCAGCGTAATC
 TGGTGAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
 AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAA
 GCACAGAATGAAACCCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAATACCAATAACATTACCA
 AAAACAAAGCAGATATTCAGGCGCTGGAAAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTAATCTGAGCGG
 TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCACAG
 CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAACCCCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
 AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAAATGATATTGCCCAGAATCAGGCAAAATATTCAGGA
 TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
 CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAAACACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGC
 AGGATGCCTATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
 CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
 ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
 AGGCCGATATTGCCAACAAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
 TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
 GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCCTGATTGAAAAAGATA
 AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAAATAAAGCCAGCGCAGA
 TACCAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAAATGCC
 AAAAGCATTACCGATCTGGGCACCAAAGTTGATGGTTTTGATAGCCGTGTGACCGCACTGGATA
 CCAAAGTTAATGCATTTGATGGTCGTATTACCGCTCTGGATAGTAAAGTTGAAAATGGAATGGC
 AGCACAAGCAGCACACTAA

SEQ ID NO: 57

MQAKNDITLEDLPYLIKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
 DEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKNT
 QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHAHNEAQNETLKGLITNSIENTN
 NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEE
 GLLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAQKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY

NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI
 AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
 EKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTKVDGFDSDRV
 TALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAH

MC-003 (ДНК) -SEQ ID NO: 87

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
 TCAGAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
 CAGTATGGAAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
 TGGGTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCTGACCAAAAAATCA
 GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
 GAAGGTCAGGAAGGCAAAATCTGCAGAACGAAACAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATC
 TGGTGAAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
 AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAA
 GCACAGAATGAAACCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAATACCAATAACATTACCA
 AAAACAAAGCAGATATTCAGGCGCTGGAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTTAATCTGAGCGG
 TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCACAG
 CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAAACCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
 AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAAATGATATTGCCCAGAATCAGGCAATATTCAGGA
 TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
 CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAACACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGC
 AGGATGCCATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
 CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
 ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
 AGGCCGATATTGCCAACAAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
 TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
 GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCTGATTGAAAAAGATA
 AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAAATAAAGCCAGCGCAGA
 TACCAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAATGCC
 AAAAGCATTACCGATCTGGGCACCAAAGTTGATGGTTTTGATAGCCGTGTGACCGCACTGGATA
 CCAAACTAA

MC-003 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 30-540) (H) -SEQ ID
 NO: 88

MQAKNDITLEDLPYLIKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
 DEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKNT
 QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHAHNEAQNETLKGLITNSIENTN
 NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEE

GLLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAQKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
 NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI
 AKNQADIANNINNIYELAQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
 EKDKEDHLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVT
 ALDTKH

MC-004 (ДНК) - SEQ ID NO: 58

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAAATCGA
 TCAGAACGAACCTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
 CAGTATGGAAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
 TGGGTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCCTGACCAAAAAATCA
 GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
 GAAGGTCAGGAAGGCAAAATTTCTGCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATC
 TGGTGAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
 AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAA
 GCACAGAATGAAACCCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAATACCAATAACATTACCA
 AAAACAAAGCAGATATTAGGCGCTGGAAAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTTAATCTGAGCGG
 TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCACAG
 CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAACCCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
 AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAAACGATATTGCCCAGAATCAGGCAATATTAGGA
 TCTGGCCACCTATAATGAACCTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
 CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAACACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATAACAACGAACCTGC
 AGGATGCCTATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
 CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
 ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
 AGGCCGATATTGCCAACAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
 TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
 GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCCTGATTGAAAAAGATA
 AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAAATAAAGCCAGCGCAGA
 TACCAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAAATGCC
 AAAAGCATTACCGATCTGGGCACCAAGTTGATGGTTTTGATAGCCGTGTGACCGCACTGGATA
 CCAAACATCATTA

MC-004 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 30-540) (HH) SEQ ID
 NO: 59

MQAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
 DEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNT
 QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHAHNEAQNETLKGLITNSIENTN

NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEE
 GLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
 NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI
 AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
 EKDKEDKLIITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGDSRV
 T
 ALDTKHH

MC-005 (ДНК) - SEQ ID NO: 60

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
 TCAGAACGAAGCTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
 CAGTATGGAAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
 TGGGTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCTGACCAAAATCA
 GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
 GAAGGTGAGGAAGGCAAAATCTGCAGAACGAACAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATC
 TGGTGAAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATGGA
 AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAA
 GCACAGAATGAAACCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAATACCAATAACATTACCA
 AAAACAAAGCAGATATTAGGCGCTGGAAAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTTAATCTGAGCGG
 TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCAGCAG
 CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAAACCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
 AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAAATGATATTGCCCGAATCAGGCAAAATATTCAGGA
 TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
 CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAAACACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAAGTGC
 AGGATGCCTATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
 CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
 ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
 AGGCCGATATTGCCAACATATCAATAATATCTATGAACTGGCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
 TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
 GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACAGAACACCCCTGATTGAAAAAGATA
 AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAATAAAGCCAGCGCAGA
 TACCAAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAATGGCAATGCCATCACCAAAATGCC
 AAAAGCGCAAGCCATCATCATCACCACCACTAA

MC-005 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 30-519) (ASHHHHHH)

SEQ ID NO: 61

MQAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
 DEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNT
 QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIAHNEAQNETLKGLITNSIENTN

NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEE
 GLLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
 NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI
 AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
 EKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSASHHHHHH

MC-006 (ДНК) - SEQ ID NO: 62

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
 TCAGAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
 CAGTATGGAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
 TGGGTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCTGACCAAAAAATCA
 GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
 GAAGGTCAGGAAGGCAAAATTTGTCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATC
 TGGTGAAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
 AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAA
 GCACAGAATGAAACCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAAATACCAATAACATTACCA
 AAAACAAAGCAGATATTCAGGCGCTGGAAAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTTAATCTGAGCGG
 TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAAACACATTTATGAACCTGGCAG
 CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAAACCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
 AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAAACCTGATATTGCCCAGAATCAGGCAAATATTCAGGA
 TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
 CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAAACACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGC
 AGGATGCCTATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
 CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
 ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
 AGGCCGATATTGCCAACAAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
 TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
 GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCCCTGATTGAAAAAGATA
 AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAATAAAGCCAGCGCAGTA
 TACCAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAATGCC
 AAAAGCTAA

MC-006 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 30-519) SEQ ID NO:

63

MQAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
 DEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKN
 QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHAHNEAQNETLKGLITNSIENTN
 NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEE

GLLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAQKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI
AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
EKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKS

MC-007 (ДНК) - SEQ ID NO: 64

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
TCAGAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
CAGTATGGAAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
TGGGTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCTGACCAAAAAATCA
GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
GAAGGTCAGGAAGGCAAAATTCTGCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATC
TGGTGAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAATTCATGCACATAACGAA
GCACAGAATGAAACCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAAATACCAATAACATTACCA
AAAACAAAGCAGATATTCAGGCGCTGGAAAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTTAATCTGAGCGG
TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCACAG
CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAACCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAACTGATATTGCCCAGAATCAGGCAAATATTCAGGA
TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAAAACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGC
AGGATGCCATATGAAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
AGGCCGATATTGCCAACAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCTGATTGAAAAAGATA
AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAATAAAGCCAGCGCAGA
TACCAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAATGCC
AAAAGCATTACCGATCTGGGCACCAAAGTTGATGGTTTTGATAGCCGTGTGACCGCACTGGATA
CCAAAGTTAATGCATTTGATGGTCGTATTACCGCTCTGGATAGTAAAGTTGAAAATGGTATGGC
AGCACAGGCAGCAGCAAGCCATCATCATCACCACCACTAA

MC-007 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 30-564) (ASHHHHHH)

SEQ ID NO: 65

MQAKNDITLEDLPYLIKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
DEDVGNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNT
QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHANEAQNETLKGLITNSIENTN

NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEE
 GLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
 NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI
 AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
 EKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRV
 ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAASHHHHHH

MC-008 (ДНК) - SEQ ID NO: 66

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
 TCAGAACGAACCTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
 CAGTATGGAAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
 TGGGTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCTGACCAAAAAATCA
 GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
 GAAGGTGAGGAAGGCAAAATCTGCAGAACGAAACAGCATCAAAAAAACCCAGCGTAATC
 TGGTGAAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
 AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAA
 GCACAGAATGAAACCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAAATACCAATAACATTACCA
 AAAACAAAGCAGATATTAGGCGCTGGAAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTTAACTGAGCGG
 TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAAACATTTATGAACTGGCACAG
 CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAAACCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
 AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAAATGATATTGCCCAGAATCAGGCAAAATATTCAGGA
 TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
 CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAAACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGC
 AGGATGCCTATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
 CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
 ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
 AGGCCGATATTGCCAACAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
 TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
 GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCCTGATTGAAAAAGATA
 AAGAACATGATAAACTGATCACCGCAATAAAACCGCAATTGATGCAATAAAGCCAGCGCAGA
 TACCAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAAATGGCAATGCCATACCAAAAAATGCC
 AAAAGCATTACCGATCTGGGCACCAAGTTGATGGTTTTGATAGCCGTGTGACCGCACTGGATA
 CCAAAGTTAATGCATTTGATGGTCGTATTACCGCTCTGGATAGTAAAGTTGAAATGGTATGGC
 AGCACAGGCAGCACACCACTAA

MC-008 (белок) - (M) (UspA2 30-564) (HH) SEQ ID NO: 67

MQAKNDITLEDLPYLIKKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
 DEDVGNWQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNT

QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHANEAQNETLKGLITNSIENTN
 NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEE
 GLLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
 NELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEAIDALNKASSENTQNI
 AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
 EKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVT
 ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAHH

MC-009 (ДНК) - SEQ ID NO: 68

ATGGCGAAAAATGATATTACCCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAAATCGATCA
 GAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGCCAG
 TATGGAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATGTGG
 GTTGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCTGACCAAAAAATCAGAA
 TGCCTGCGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGTGAA
 GGTCAGGAAGGCAAAATTCTGCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATCTGG
 TGAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGAAGA
 TCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAAGCA
 CAGAATGAAACCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAATACCAATAACATTACCAAAA
 ACAAAGCAGATATTAGGCGCTGGAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTAATCTGAGCGGTCTG
 TCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCACAGCAG
 CAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAAACCTGAAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGGAAC
 TGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAAACGATATTGCCCAGAATCAGGCAAATATTCAGGATCT
 GGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCCCTG
 AATAAAGCGAGCAGCGAAAAACACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGCAGG
 ATGCCATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAAAC
 GCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAGACC
 GAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATCAGG
 CCGATATTGCCAACAAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCAGCAGCAGGATCAGCACTCTTC
 TGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAAGCC
 GATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACAGAACACCCCTGATTGAAAAAGATAAAG
 AACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAATAAAGCCAGCGCAGATAC
 CAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAAATGCCAAA
 AGCATTACCGATCTGGGCACCAAAGTTGATGGTTTTGATAGCCGTGTGACCGCACTGGATACCA
 AAGTTAATGCATTTGATGGTCGTATTACCGCTCTGGATAGTAAAGTTGAAAATGGTATGGCAGC
 ACAGGCAGCACACCACTAA

MC-009 (белок) - (M) (UspA2 31-564) (HH) SEQ ID NO: 69

MAKNDITLEDLPYLIKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELD

EDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQ
 RNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHAHNEAQNETLKGLITNSIENTNN
 ITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEG
 LLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAKQKTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYN
 ELQDAYAKQKTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQKTEAIDALNKASSENTQNIA
 KNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIE
 KDEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFDSDRVTA
 LDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAHH

MC-010 (ДНК) - SEQ ID NO: 70

ATGCAGGCCAAAAATGATATTACCCCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGA
 TCAGAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGC
 CAGTATGGAAATATTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATG
 TGGGTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCCGTACCAAAAAATCA
 GAATGCACTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGT
 GAAGGTCAGGAAGGCAAAATTCTGCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATC
 TGGTGAATTGGCTTTGAAATTGAAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGA
 AGATCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAA
 GCACAGAATGAAACCCGTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAATACCAATAACATTACCA
 AAAACAAAGCAGATATTAGGCGCTGGAAAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTAATCTGAGCGG
 TCGTCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAAACAACATTTATGAACTGGCAGAG
 CAGCAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAACCCGTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGG
 AACTGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAACTGATATTGCCCAGAATCAGGCAAATATTCAGGA
 TCTGGCCACCTATAATGAACTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCC
 CTGAATAAAGCGAGCAGCGAAAAACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGC
 AGGATGCCTATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAA
 CACGCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAG
 ACCGAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATC
 AGGCCGATATTGCCAACAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCAGCAGCAGGATCAGCACTC
 TTCTGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAA
 GCCGATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCCCTGATTGAAAAAGATA
 AAGAACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAATAAAGCCAGCGCAGA
 TACCAAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAATGCC
 AAAAGCATTACCGATCTGGGCACCAAAGTTGATGGTTTTGATAGCCGTGTGACCGCACTGGATA
 CCAAAGTTAATGCATTTGATGGTCGTATTACCGCTCTGGATAGTAAAGTTGAAAATGGTATGGC
 AGCACAGGCAGCATAA

MC-010 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 30-564) SEQ ID NO:

71

MQAKNDITLEDLPYLIKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEEL
 DEDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNT
 QRNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHANEAQNETLKGLITNSIENTN
 NITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEE
 GLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAY
 NELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNI
 AKNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLI
 EKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRV
 TALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAA

MC-011 (ДНК) - SEQ ID NO: 72

ATGGCGAAAAATGATATTACCTGGAAGATCTGCCGTATCTGATCAAAAAATCGATCA
 GAACGAACTGGAAGCCGATATTGGTGATATTACCGCACTGGAAAAATATCTGGCACTGAGCCAG
 TATGGAATATTTCTGGCCCTGGAAGAACTGAATAAAGCTCTGGAAGAGCTGGATGAAGATGTGG
 GTTGGAATCAGAATGATATCGCCAATCTGGAAGATGATGTTGAAACCCTGACCAAAAAATCAGAA
 TGCCTGGCAGAACAGGGTGAAGCAATTAAGAAGATCTGCAGGGTCTGGCAGATTTTGTGAA
 GGTCAGGAAGGCAAAATTTCTGCAGAACGAAACCAGCATCAAAAAAACACCCAGCGTAATCTGG
 TGAATGGCTTTGAAATTGAAAAAACAAAGATGCCATTGCCAAAAACAACGAAAGCATTGAAGA
 TCTGTATGATTTTGGTCATGAAGTTGCCGAAAGCATTGGTGAAATTCATGCACATAACGAAGCA
 CAGAATGAAACCTGAAAGGTCTGATTACCAACAGCATCGAAAATACCAATAACATTACCAAAA
 ACAAAGCAGATATTCAGGCGCTGGAATAATGTTGTGGAAGAACTGTTAATCTGAGCGGTCTG
 TCTGATTGATCAGAAAGCCGATATCGATAATAACATTAACAACATTTATGAACTGGCACAGCAG
 CAGGATCAGCATAGCAGCGATATCAAAACCTGAAAAAACGTTGAAGAAGGTCTGCTGGAAC
 TGTCTGGTCACCTGATCGATCAGAAACTGATATTGCCCAGAATCAGGCAAATATTCAGGATCT
 GGCCACCTATAATGAAGTGCAGGATCAGTATGCACAGAAACAGACCGAAGCAATTGATGCCCTG
 AATAAAGCGAGCAGCGAAAAACACCCAGAATATCGAAGATCTGGCAGCATACAACGAACTGCAGG
 ATGCCTATGCAAAACAGCAGACTGAAGCCATCGACGCACTGAACAAGGCAAGCTCTGAAAACAC
 GCAGAACATTGAAGATCTGGCTGCCTATAATGAATTACAGGATGCGTATGCCAAACAGCAGACC
 GAAGCGATTGATGCGCTGAACAAAGCCTCTTCTGAAAATACACAGAATATCGCCAAAAATCAGG
 CCGATATTGCCAACAATATCAATAATATCTATGAACTGGCCAGCAGCAGGATCAGCACTCTTC
 TGATATCAAAACACTGGCAAAAGCAAGCGCAGCAAATACCGATCGTATTGCGAAAAACAAAGCC
 GATGCAGATGCAAGCTTTGAAACACTGACGAAAAACCAGAACACCTGATTGAAAAAGATAAAG
 AACATGATAAACTGATCACCGCCAATAAAACCGCAATTGATGCAAATAAAGCCAGCGCAGATAC
 CAAATTTGCAGCAACCGCAGATGCAATTACCAAAAATGGCAATGCCATCACCAAAAATGCCAAA
 AGCATTACCGATCTGGGCACCAAGTTGATGGTTTGTAGCCGTGTGACCGCACTGGATACCA
 AAGCAAGCCATCATCATCACCACCACTAA

MC-011 (белок) - (M) (аминокислоты UspA2 31-540) (ASHHHHHH)

SEQ ID NO: 73

MAKNDITLEDLPYLIKIDQNELEADIGDITALEKYLALSQYGNILALEELNKALEELD
 EDVGWNQNDIANLEDDVETLTKNQNALAEQGEAIKEDLQGLADFVEGQEGKILQNETSIKKNTQ
 RNLVNGFEIEKNKDAIAKNNESIEDLYDFGHEVAESIGEIHANEAQNETLKGLITNSIENTNN
 ITKNKADIQALENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKKNVEEG
 LLELSGHLIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYN
 ELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSENTQNIA
 KNQADIANNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTLIE
 KDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSITDLGTVKVDGFSRVTA
 LDTKASHHHHHH

Конструирование вектора и трансформация

Последовательность ДНК для *UspA2* из штамма ATCC 25238 - SEQ

ID NO: 74.

ATGAAAACCATGAAACTTCTCCCTCTAAAAATCGCTGTAACCAAGTGCCATGATTATTGG
CTTGGGTGCGGCATCTACTGCGAATGCGCAGGCTAAAAATGATATAACTTTAGAGGATTTACCA
TATTTAATAAAAAAGATTGACCAAAATGAATTGGAAGCAGATATCGGAGATATTACTGCTCTTG
AAAAGTATCTAGCACTTAGCCAGTATGGCAATATTTTAGCTCTAGAAGAGCTCAACAAGGCTCT
AGAAGAGCTCGACGAGGATGTTGGATGGAATCAGAATGATATTGCAAACCTTGAAGATGATGTT
GAAACGCTCACCAAAAATCAAAATGCTTTGGCTGAACAAGGTGAGGCAATTAAGAAGATCTTC
AAGGGCTTGAGATTTTGTAGAAGGGCAAGAGGGTAAAATTCTACAAAATGAAACTTCAATTA
AAAAAATACTCAGAGAAACCTTGTCAATGGGTTTGAGATTGAGAAAAATAAGATGCTATTGCT
AAAAACAATGAGTCTATCGAAGATCTTTATGATTTTGGTCATGAGGTTGCAGAAAGTATAGGCG
AGATACATGCTCATAATGAAGCGCAAAATGAACTCTTAAAGGCTTGATAACAAACAGTATTGA
GAATACTAATAATATTACCAAAAACAAAGCTGACATCCAAGCACTTGAAAACAATGTCGTAGAA
GAACTATTCAATCTAAGCGTTCGCTTAATTGATCAAAAAGCAGATATTGATAATAACATCAACA
ATATCTATGAGCTGGCACAACAGCAAGATCAGCATAGCTCTGATATCAAAACACTTAAAAAAA
TGTCGAAGAAGGTTTGTGGAGCTAAGCGGTACCTAATTGATCAAAAACAGATATTGCTCAA
AACCAAGCTAACATCCAAGATCTGGCCACTTACAACGAGCTACAAGACCAGTATGCTCAAAAGC
AAACCGAAGCGATTGACGCTCTAAATAAAGCAAGCTCTGAGAATACACAAAACATCGAAGATCT
GGCCGCTTACAACGAGCTACAAGATGCCTATGCCAAACAGCAACCGAAGCAATTGACGCTCTA
AATAAAGCAAGCTCTGAGAATACACAAAACATCGAAGATCTGGCCGCTTACAACGAGCTACAAG
ATGCCTATGCCAAACAGCAAAACCGAAGCCATTGACGCTCTAAATAAAGCAAGCTCTGAGAATAC
ACAAAACATTGTAAAAACCAAGCGGATATTGCTAATAACATCAACAATATCTATGAGCTGGCA
CAACAGCAAGATCAGCATAGCTCTGATATCAAAACCTTGGCAAAAGCAAGTGTGCCAATACTG
ATCGTATTGCTAAAAACAAAGCCGATGCTGATGCAAGTTTGAACGCTCACCAAAAATCAAAA
TACTTTGATTGAAAAGATAAGAGCATGACAAATTAATTACTGCAACAAAACCTGCGATTGAT
GCCAATAAAGCATCTGCGGATACCAAGTTTGCAGCGACAGCAGACGCCATTACCAAAAATGGAA
ATGCTATCACTAAAAACGCAAAATCTATCACTGATTTGGGCACTAAAGTGGATGGTTTTGACAG
TCGTGTAAGTGCATTAGACACCAAGTCAATGCCTTTGATGGTTCGTATCACAGCTTTAGACAGT
AAAGTTGAAAACGGTATGGCTGCCCAAGCTGCCCTAAGTGGTCTATTCCAGCCTTATAGCGTTG
GTAAGTTTAATGCGACCGCTGCACTTGGTGGCTATGGCTCAAAATCTGCGGTTGCTATCGGTGC
TGGCTATCGTGTGAATCCAAATCTGGCGTTTAAAGCTGGTGGCGGATTAATACAGTGGTAAT
AAAAAAGGCTCTTATAACATCGGTGTGAATTACGAGTTCTAA

Белковая последовательность для *UspA2* из штамма ATCC 25238. - SEQ ID NO. 1, как описано выше.

Конструирование вектора

Для получения вектора MC-001, фрагмент ДНК, кодирующий фрагмент гена *UspA2* (аминокислоты 30-540 из штамма ATCC 25238), включая участки рестрикции *NdeI/XhoI* для облегчения клонирования (начальный метионин закодирован в участке *NdeI*) и последовательность ДНК, соответствующую аминокислотному линкеру AS (аланин, серин) и аминокислотам *bxhis*, являлся оптимизированным по кодонному составу (неприродным) и синтезированным в GENEART (зарегистрированный в США товарный знак). Оптимизированная по кодонному составу означает, что нуклеотидная последовательность изменена по сравнению с нативной последовательностью без изменения аминокислотной последовательности, для лучшего соответствия с использованием кодонов в *Escherichia coli* для оптимальной экспрессии. Фрагмент *UspA2* клонировали в соответствии с стандартными способами в экспрессирующий вектор pET-26b с использованием участков рестрикции *NdeI/XhoI*.

Для получения конструкций MC-002, MC-003 и MC-004, проводили полимеразную цепную реакцию для амплификации фрагмента гена *UspA2* (аминокислоты 30-540 из штамма ATCC 25238) с использованием конструкции MC-001 в качестве матрицы, праймера *UspA2Nde opt* (содержащего иницирующий кодон метионина) и праймера *UspA2opt delta His*, *A2opt 1His delta AS* и *A2opt 2His delta AS*, соответственно. Фрагмент *UspA2* клонировали в соответствии со стандартными способами в экспрессирующий вектор pET-26b с использованием участков рестрикции *NdeI/XhoI*.

Для получения конструкции MC-005, проводили полимеразную цепную реакцию для амплификации фрагмента гена *UspA2* (аминокислоты 30-519 из штамма ATCC 25238) с использованием вектора MC-001 в качестве матрицы с праймерами *UspA2Nde opt* (содержащим иницирующий кодон метиони-

на) и R delta hairpin A2opt His. Последовательность ДНК, соответствующую участку рестрикции NdeI, вставляли в 5'-праймер, и участок рестрикции XhoI вставляли в 3'-праймер. Кроме того, последовательность ДНК, соответствующую аминокислотному линкеру AS и аминокислотам 6xhis, вставляли в 3'-праймер. Полученный продукт ПЦР затем вставляли в вектор для клонирования pET-26b(+) (NOVAGEN (зарегистрированный в США товарный знак)).

Для получения конструкции MC-006, проводили полимеразную цепную реакцию для амплификации фрагмента гена UspA2 (аминокислоты 30-519 из штамма ATCC 25238) с использованием конструкции MC-005 в качестве матрицы с праймерами UspA2Nde opt (содержащим иницирующий кодон метионина) и delta His delta hélice. Последовательность ДНК, соответствующую участку рестрикции NdeI, вставляли в 5'-праймер и XhoI участок рестрикции, вставляли в 3'-праймер. Полученный продукт ПЦР затем вставляли в вектор для клонирования pET-26b(+) (NOVAGEN (зарегистрированный в США товарный знак)).

Для получения конструкции MC-007, фрагмент ДНК, кодирующий фрагмент гена UspA2 (аминокислоты 30-564 из штамма ATCC 25238), включая участки рестрикции NdeI/XhoI для облегчения клонирования (начальный метионин закодирован в участке NdeI) и последовательность ДНК, соответствующую аминокислотному линкеру AS и аминокислотам 6xhis, подвергали оптимизации по кодонному составу и синтезировали в GENEART (зарегистрированный в США товарный знак) (плазмида: 1026399). Фрагмент UspA2 клонировали в соответствии с стандартными способами в экспрессирующий вектор pET-26b с использованием участков рестрикции NdeI/XhoI.

Для получения конструкции MC-008, проводили полимеразную цепную реакцию для амплификации фрагмента гена UspA2 (аминокислоты 30-564 из штамма ATCC 25238) с использованием конструкции MC-007 в качестве матрицы с праймерами UspA2Nde opt (содержащим иницирующий кодон метионина) и 2His hélice deltaAS. Последовательность ДНК, соответствующую участку рестрикции NdeI, вставляли в 5'-праймер, и участок рестрикции XhoI вставляли в 3'-праймер. Полученный продукт ПЦР затем вставляли в вектор для клонирования pET-26b(+) (NOVAGEN (зарегистрированный в США товарный знак)).

Для получения конструкции MC-009, проводили полимеразную цепную реакцию для амплификации фрагмента гена UspA2 (аминокислоты 31-564 из штамма ATCC 25238) с использованием плазмиды 1026399 в качестве матрицы и праймеров N-концевым cyto Abis (содержащим иницирующий кодон метионина) и 2His hélice deltaAS. Последовательность ДНК, соответствующую участку рестрикции NdeI, вставляли в 5'-праймер, включая делецию глутамина, и участок рестрикции XhoI, вставляли в 3'-праймер, включая два остатка гистидина. Полученный продукт ПЦР затем вставляли в вектор для клонирования pET-26b(+) (NOVAGEN (зарегистрированный в США товарный знак)). Проводили секвенирование ДНК конечной конструкции для подтверждения правильной последовательности.

Для получения конструкции MC-010, проводили полимеразную цепную реакцию для амплификации фрагмента гена UspA2 (аминокислоты 30-564 из штамма ATCC 25238) с использованием конструкции MC-007 в качестве матрицы с праймерами UspA2 Nde opt (содержащим иницирующий кодон метионина) и cyto hélice dHis dAS. Последовательность ДНК, соответствующую участку рестрикции NdeI, вставляли в 5'-праймер, и участок рестрикции XhoI вставляли в 3'-праймер. Полученный продукт ПЦР затем вставляли в вектор для клонирования pET-26b(+) (NOVAGEN (зарегистрированный в США товарный знак)).

Для получения конструкции MC-011, проводили полимеразную цепную реакцию для амплификации фрагмента гена UspA2 (аминокислоты 31-540 из штамма ATCC 25238) с использованием конструкции MC-001 в качестве матрицы с праймерами N-концевым cyto Abis (содержащим иницирующий кодон метионина) и N-концевым обратным. Последовательность ДНК, соответствующую участку рестрикции NdeI, вставляли в 5'-праймер, и участок рестрикции XhoI вставляли в 3'-праймер. Полученный продукт ПЦР затем вставляли в вектор для клонирования pET-26b(+) (NOVAGEN (зарегистрированный в США товарный знак)).

Подробный список последовательностей праймеров для ПЦР, использованных для амплификации, проиллюстрирован в табл. 3. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием набора Expand High Fidelity PCR System (Roche) согласно рекомендациям производителя. Лигирование проводили с использованием набора Rapid DNA Ligation Kit (Roche) согласно рекомендациям производителя.

Таблица 3. Последовательности праймеров для ПЦР, использованных для амплификации UspA2

ID праймера	Последовательность ДНК, 5'-3'
UspA2 Nde opt	gaattcttaattaacatatgcaggccaaaatgatattaccctg (SEQ ID NO:75)
UspA2opt delta His	GGCGCGCCTCGAGTTATTATTGGTATCCAGTGCGGTCACACG (SEQ ID NO:76)
UspA2opt 1His delta AS	GGCGCGCCTCGAGTTAGTGTGGTATCCAGTGCGGTCACACG (SEQ ID NO:77)
UspA2opt 2His delta AS	GGCGCGCCTCGAGTTAGTGTGGTATCCAGTGCGGTCACACG (SEQ ID NO:78)
R delta hairpin A2opt His	ggcgcgcctcgagttagtggtggtgatgatgatggcttgcgcttttggc atttttggtgatggcat (SEQ ID NO:79)
Delta His delta hélice	CCGCTCGAGCTAGCTTTTGGCATTTTTGGTGATGGC (SEQ ID NO:80)
N-концевой cytoAbis	GGAATTCATATGGCGAAAAATGATATTACCTGGAAGATCTG (SEQ ID NO:81)
2His hélice delta AS	GGCGCGCCTCGAGTTAGTGTGGTGTGCTGCTGTGCTGCCATACCATT (SEQ ID NO:82)
Cyto hélice dHis dAS	GGCGCGCCTCGAGTTATGCTGCCTGTGCTGCCATACCATT (SEQ ID NO:83)
N-концевой обратный	CAGTTCATTATAGGTGGCCAGATCCTG (SEQ ID NO:84)

Трансформация

Клетки *Escherichia coli* (E. coli) BLR (DE3), модифицированные клетки BLR (DE3) или B834(DE3) трансформировали плазмидной ДНК в соответствии с стандартными способами с использованием обработанных CaCl_2 клеток (Hanahan D. "Plasmid transformation by Simanis." In Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135.). Кратко, компетентные клетки BLR (DE3) осторожно размораживали на льду. Приблизительно 4 мкл плазмиды (10-100 нг) смешивали с 50-100 мкл компетентных клеток. Затем этот состав инкубировали на льду в течение 5 мин. Для проведения реакции трансформации, состав подвергали воздействию теплового импульса при 42°C в течение 30 с, затем инкубировали на льду в течение 2 мин. Приблизительно 0,5 мл среды SOC (супероптимальной среды с катаболитной репрессией) добавляли к трансформированным клеткам, и культуру клеток инкубировали при 37°C в течение одного часа перед рассевом на агар Лурия-Бертани (LB) с 50 мкг/мл канамицина. Приблизительно 150 мкл трансформированной культуры клеток высевали и инкубировали в течение ночи при 37°C.

BLR (DE3): BLR представляет собой recA^- производное BL21 (F-ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3). Этот штамм E. coli, использованный для экспрессии рекомбинантных белков, улучшает выход мономеров плазмиды и может способствовать стабилизации целевых плазмид, которые содержат повторяющиеся последовательности, или продукты которых могут вызывать потерю профага DE3 (Studier, F.W. (1991) J. Mol. Biol. 219: 37-44). Подробный генотип E.coli BLR (DE3) опубликован NOVAGEN (зарегистрированный в США товарный знак). (F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm Δ (srl-recA)306::Tn10 (TetR) (DE3).

B834 (DE3) является родительским штаммом для BL21. Эти хозяева являются ауксотрофами по метионину и обеспечивают высокую специфическую активность мечения белков-мишеней ^{35}S -метионином и селенометионином для кристаллографии. Подробный генотип E.coli B834 (DE3) опубликован NOVAGEN (зарегистрированный в США товарный знак): F⁻ ompT hsdSB_B (rB- mB-) gal dcm met (DE3).

Модифицированный BLR (DE3): Для предотвращения (фосфо)глюконилирования, ген Pgl1 вставлен в локус биотина, локализованный в геноме BLR (DE3). Кроме того, для предотвращения замен Ile-Val, скорректирована мутация C219Y в гене треониндезаминазы.

Генотип: (F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm Δ (srl-recA) 306: :Tn10 (TetR); Δ (bioA-bioD)::Pgl1; TD+(C219Y) (DE3).

Пример 2. Экспрессия белка с использованием встряхиваемой колбы

Штаммы *Escherichia coli*, трансформированные рекомбинантной плазмидой, использовали для инокуляции 100 мл среды LB (Becton, Dickinson and Company) $\pm 1\%$ (масса/объем, мас./об.) глюкозы (Laboratoire MAT, каталожный номер: GR-0101) и 50 мкг/мл канамицина (Sigma). Эту прекультуру, как правило,

выращивали в течение ночи при 37°C. Двенадцать мл прекультуры используют для инокуляции 500 мл среды LB+50 мкг/мл канамицина. Культуры инкубировали при 37°C с встряхиванием при 150 об./мин до достижения O.D._{600nm} ~0,6.

При O.D._{600nm} ~0,6, в культурах BLR (DE3) индуцировали экспрессию рекомбинантного белка посредством добавления 1 mM изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG; EMD Chemicals Inc., каталожный номер: 5815) и инкубировали в течение ночи при 23°C с встряхиванием 150 об./мин. После периода индукции культуры центрифугировали при 6370 g в течение 20 мин, и осадки из 350 мл культуры замораживали при -20°C по отдельности.

Пример 3. Очистка белка с использованием фосфатного буфера (конструкция MC-001 и конструкция MC-011)

Каждый осадок бактерий, полученный после индукции в встряхиваемой колбе, ресуспендировали в 30 мл 20 mM калий-фосфатного буфера (pH 8,0), содержащего 10 mM NaCl и коктейль ингибиторов протеаз Roche COMPLETE (зарегистрированный в США товарный знак) (1 таблетка/50 мл буфера). Лизис клеток проводили посредством 3 X экстракций в френч-прессе (20000 psi (137,9 МПа)), и осветление проводили посредством центрифугирования 30 мин при 23700 g. Супернатант собирали и фильтровали при 0,22 мкм.

Меченные 6xHis белки очищали посредством аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (IMAC) с использованием колонки XK16 и 20 мл смолы NiNTA (Qiagen), предварительно уравновешенных 20 mM калий-фосфатным буфером (pH 8,0), содержащим 10 mM NaCl, или буфером PBS pH 8,0, содержащим 500 mM аргинин. Растворимые компоненты загружали при скорости вплоть до 4 мл/мин (получая "фракцию проскока"). После загрузки колонки колонку промывали с помощью 60 мл 20 mM калий-фосфатного буфера (pH 8,0), содержащего 10 mM NaCl, при скорости 4 мл/мин, получая "фракцию промывки #1". Проводили вторую промывку с использованием такого же буфера+10 mM имидазол, получая "фракцию промывки #2". Элюцию проводили с использованием такого же буфера, содержащего 200 или/и 500 mM имидазола.

Образцы из фракций элюции анализировали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Образцы, содержащие белок, подвергали диализу против 5 л 20 mM калий-фосфатного буфера (pH 8,0), содержащего 10 mM NaCl. Концентрацию белка определяли с использованием способа Лоури.

Пример 4. Очистка белка с использованием содержащего аргинин буфера (MC-001, MC-005 и MC-007)

Каждый осадок бактерий, полученный после индукции в встряхиваемой колбе (пример 3) или ферментере (пример 5), ресуспендировали в 30 мл буфера PBS+500 mM аргинин pH 8,0 и коктейль ингибиторов протеаз Roche COMPLETE (зарегистрированный в США товарный знак) (1 таблетка/50 мл буфера). Альтернативно, клеточную массу после ферментации (~7 г) ресуспендировали в 90 мл буфера PBS, содержащего 500 mM аргинина pH 8,0 и коктейль ингибиторов протеаз Roche COMPLETE (зарегистрированный в США товарный знак) (1 таблетка/50 мл буфера).

Лизис клеток проводили посредством 2 или 3 X экстракций в френч-прессе (20000 psi (137,9 МПа)), и осветление проводили посредством центрифугирования 30 мин при 23700 g при 4°C. Супернатант собирали и фильтровали при 0,22 мкм. Меченные 6xHis белки очищали посредством аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (IMAC) с использованием колонки XK16 и 80 мл смолы NiNTA (Qiagen), предварительно уравновешенных буфером PBS+500 mM аргинин pH 8,0. Растворимые компоненты загружали при скорости вплоть до 4 мл/мин (получая "фракцию проскока"). После загрузки колонки колонку промывали таким же буфером, затем 20 mM калий-фосфатным буфером (pH 8,0), содержащим 10 mM NaCl, при скорости 4-6 мл/мин, получая "фракцию промывки #1". Проводили вторую промывку с использованием такого же буфера+10 mM имидазол, получая "фракцию промывки #2". Элюцию проводили с использованием такого же буфера+200 mM имидазол или 500 mM имидазол. В следующие флаконы для элюции добавляли ЭДТА до конечной концентрации 5 mM.

Образцы из фракций элюции анализировали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Образцы, содержащие белки, подвергали диализу против 5 литров 20 mM калий-фосфатного буфера (pH 8,0), содержащего 10 mM NaCl и 5 mM ЭДТА. Концентрацию белка определяли с использованием способа Лоури.

Этот протокол можно использовать для других меченных 6xHis белков.

Пример 5. Ферментация

Можно использовать следующий способ ферментации:

Рабочий посевной материал представляет собой замороженные аликвоты выращенных в колбе штаммов *Escherichia coli* BLR(DE3) или производных BLR(DE3), трансформированных производным pET26b, содержащим последовательность, кодирующую конструкцию рекомбинантного белка - специфического антигена-кандидата.

Рабочий посевной материал (WS) вынимают из морозильника для хранения, размораживают и используют для инокуляции колбы Эрленмейера, содержащей среду для прекультивирования.

Манипуляции с посевной культурой и культурой в колбе проводят асептически в ламинарном вытяжном шкафу (LAF) или боксе биологической безопасности (BSC). Колбу для прекультивирования инокубируют, как правило, между 30-37°C при скорости встряхивания 200 об./мин в течение времени, необходимого для достижения оптической плотности при 650 нм (OD_{650nm}) между 1,0 и 3,0, как правило, между 4-6 ч.

20 л ферментер подготавливают посредством безразборной очистки с последующей автоматизированной стерилизации паром. Исходную среду переносят асептически в ферментер. Бутыль, заполненную 25% NH_4OH , асептически присоединяют к ферментеру для автоматического контроля pH. Начальный pH исходной среды доводят до целевого pH добавлением раствора NH_4OH . Облученный пеногаситель добавляют с использованием шприца через мембрану в головке. Бутыль, заполненную подпитывающей средой, асептически присоединяют к ферментеру. Добавление подпитки контролируют либо посредством каскада pO_2 (контроль растворенного кислорода), либо посредством предварительно запрограммированной кривой подпитки. Перемешивание контролируют либо посредством каскада pO_2 , либо посредством предварительно запрограммированной кривой перемешивания.

Исходные параметры ферментера, как правило, являются следующими:

Температура: 28-32°C

Давление: 0,5 бар и.д. (7 psi (48,3 кПа)); Скорость потока воздуха: 2 WM (объемов сосуда в минуту) pH: регулируют до 6,8 посредством добавления 25% NH_4OH . Аликвоту этой прекультуры (как правило, между 5-50 мл) используют для инокуляции исходной среды для ферментера посредством добавления шприцом через мембрану в головку ферментера. Фазы культивирования в ферментере представляют собой:

Периодическая фаза: биомассу накапливают с использованием источника углерода в исходной среде.

Периодическая фаза с подпиткой: Среду для подпитки вводят либо в соответствии с контролем каскада pO_2 , либо в соответствии с предварительно запрограммированной кривой подпитки.

Продолжается накопление биомассы на источнике углерода в среде для подпитки.

Фаза индукции: Экспрессию рекомбинантного белкового антигена индуцируют посредством добавления раствора IPTG в культуру в ферментере.

При сборе культуру собирают, как правило, в 1 л бутыли для центрифугирования и центрифугируют для отделения фракции твердого осадка (клеточной массы) от фракции жидкого супернатанта. Супернатант отбрасывают, и массу клеток во влажном состоянии (твердого осадка) регистрируют, и пакеты с клеточной массой сохраняют при -20°C.

Можно использовать также следующий способ:

Стандартная прекультура *Escherichia coli*

Каждую стандартную прекультуру получали с использованием замороженной культуры для посева штаммов *Escherichia coli*. Эти штаммы представляют собой штаммы BLR(DE3), трансформированные производным pET26b, содержащим последовательность, кодирующую конкретную конструкцию, подлежащую оценке.

Культуру для посева размораживали до комнатной температуры, и 400 мкл использовали для инокуляции 2 литровой колбы Эрленмейера, содержащей 400 мл среды для прекультивирования (адаптированной из Zabriskie et al. (J. Ind. Microbiol. 2:87-95 (1987))).

Затем колбу после инокуляции was инкубировали при 37°C ($\pm 1^\circ C$) и 200 об./мин. Прекультивирование останавливали после 6 час инкубации. На этой стадии оптическая плотность при 650 нм (OD_{650nm}) составляет приблизительно 2. Прекультуру использовали для инокуляции среды в ферментере сразу после остановки культивирования.

Периодическая ферментация с подпиткой в масштабе 20 л.

Способ

Использовали 20-литровый ферментер (Biolafitte). Девять литров среды с периодической фазы асептически переносили в ферментер. pH среды повторно довели до 6,8 с помощью добавления основания. 1 мл неразведенного облученного пеногасителя (SAG 471) также добавляли в ферментер. Затем температуру (28°C), давление в головке (0,5 бар (50 кПа)), скорость аэрации (20 л барботажного воздуха в минуту) и начальную скорость перемешивания (300 об./мин) устанавливали перед инокуляцией. Уровень растворенного кислорода в этих условиях составлял 100%. Давление в головке и скорость аэрации поддерживали на постоянном уровне на протяжении ферментации.

Инокуляцию осуществляли посредством добавления эквивалента 10 мл $OD_{650 nm}=2$ прекультуры (полученной, как описано выше, в примере 2) в соответствии со следующей формулой:

$$\text{Объем прекультуры (мл)} = \frac{20}{\text{Конечная } OD_{650nm} \text{ прекультуры}}$$

На протяжении периодической фазы (0-15 час), поддерживали температуру 28°C. Уровень растворенного кислорода устанавливали на 20%. Уровень растворенного кислорода (DO) регулировали посредством увеличения перемешивания, когда DO падает ниже 20%. Истощение глюкозы приводит к увеличе-

нию DO и сопутствующему уменьшению перемешивания.

Когда глюкоза истощается, начинают подпитку со скоростью, основанной на сигнале того, что pH увеличивается выше 7,0. Далее после этой точки, скорость подпитки контролировали по необходимости в кислороде, увеличивая скорость потока, когда растворенный кислород проявляет тенденцию к падению ниже 20% от исходной точки. На этой стадии скорость перемешивания поддерживают при 900 об./мин.

На протяжении периодической фазы с подпиткой (до индукции), поддерживали pH 6,8 посредством добавления основания, температуру регулировали при 30°C.

Два способа применяли для получения белка:

"Индукцию при высокой плотности клеток" (HCDI) применяют, когда индукцию в культуре проводят посредством 1 mM IPTG (изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид) при оптической плотности 80 ± 5 , как правило, достигаемой через 40 ч культивирования. Температуру поддерживали при 28°C, и скорость подпитки все еще контролируют по потребности в кислороде с постоянной скоростью перемешивания 900 об./мин.

Способ "индукции при низкой плотности клеток" (LCDI) обозначает индукцию при оптической плотности 40 ± 5 , как правило, достигаемой через 24 ч культивирования. Температуру уменьшают до 30°C, и применяют постоянную скорость подпитки 0,5 мл/мин. Затем 1 mM IPTG добавляют в культуру. На этой стадии, уровень DO поддерживают на 20% посредством контроля скорости перемешивания.

В конце фазы индукции (72 час), клеточную массу собирали посредством центрифугирования ($6500 \times g$, 4°C в течение 1 ч), и сохраняли при -20°C.

На фиг. 1 и 2 проиллюстрирован типичный профиль ферментации с использованием способов HCDI и LCDI, и параметров, мониторируемых в ходе периодической ферментации с подпиткой в масштабе 20 л.

В табл. 4 указаны конструкции, оцененные в ферментере, и выход UspA2, полученный для каждой.

Таблица 4

ID конструкции	Наименование	Спираль	Метка His	Используемый способ	UspA2 (г/л)
MC-008	UspA2+Спираль+2 His	Полная	2 остатка	HCDI	2,21
MC-007	UspA2+Спираль+6 His	Полная	6 остатков	LCDI	2,60
MC-010	UspA2+Спираль	Полная	Нет	HCDI	0,22
MC-005	UspA2 ΔСпираль+6 His	Нет	6 остатков	LCDI	1,92
MC-006	UspA2 ΔСпираль	Нет	Нет	LCDI	1,14
MC-004	UspA2+ ½ Спираль+2 His	1/2	2 остатка	LCDI	0,92
MC-001	UspA2+ ½ Спираль+6 His	1/2	6 остатков	HCDI	3,68
MC-002	UspA2+ ½ Спираль	1/2	Нет	HCDI	0,49

His=гистидин

На фиг. 3 изображен в графической форме выход UspA2 в табл. 4 для конструкций, оцененных в ферментере.

На этой фигуре на выход UspA2 влияют остатки гистидина, присутствующие в конструкции. ($p < 0,05$, односторонний, трехуровневый, ANOVA типа II). Наблюдали положительную корреляцию между количеством остатков гистидина и выходом при ферментации UspA2, с увеличением выхода более, чем на 400% при сравнении 0 и 6 остатков в периодической ферментации с подпиткой.

Наблюдали также, что с одним остатком гистидина, добавленным в фрагмент половины спирали (конструкция MC-003), получали выход UspA2 приблизительно 1 г/л белка.

Пример 6. Характеризация белка

Аналитическое ультрацентрифугирование

Аналитическое ультрацентрифугирование используют для определения гомогенности и распределения по размерам в растворе различных молекул в образце белка посредством измерения скорости, при которой молекулы движутся в ответ на центробежную силу. Это основано на расчете коэффициентов седиментации различных молекул, полученных в эксперименте по скорости седиментации, которые зависят от формы и массы их молекул.

Следующие образцы белка центрифугировали на аналитической ультрацентрифуге Beckman-Coulter ProteomeLab XL-1 при 28000 об./мин после уравнивания ротора AN-60Ti до 15°C.

а) MC-005, партия BMP53, 675 мкг/мл в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

б) MC-001, партия BMP13, 545 мкг/мл в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

с) MC-001, партия BMP14, 545 мкг/мл в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

д) MC-001, партия BMP54, 445 мкг/мл в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

е) MC-007, партия BMP70, 510 мкг/мл в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

Для сбора данных, регистрировали от 133 до 325 сканирований при 280 нм каждые 5 мин.

Анализ данных проводили с использованием программы SEDFIT (доступной через National Institutes for Health) для определения распределения C(S). Распределение C(S) является представлением относительной интенсивности различных компонентов в смеси макромолекул, разделенных по их коэффициентам седиментации, которое является функцией размера и конформации молекул. Определение парциального удельного объема белков при 15°C проводили с помощью программного обеспечения SEDNTERP по их аминокислотной последовательности. SEDNTERP (SEDNTERP распространяется и поддерживается через Biomolecular Interaction Technologies Center at the University of New Hampshire) также использовали для определения вязкости и плотности буфера при 15°C.

Определение относительной распространенности всех молекул проводили посредством учета общей площади под кривой общего распределения как 100% образца и посредством расчета процента этой общей области, представленной распределением каждой молекулы. График распределения C(S) (концентрация против коэффициента седиментации) использовали для этого расчета, считая, что это лучшее представление необработанных данных, чем распределение C(M) (концентрация против молекулярной массы).

Аналитическое ультрацентрифугирование различных очищенных конструкций позволило сделать наблюдение, что UspA2 с Δ спирали, UspA2 с $1/2$ спирали и UspA2 с полноразмерной спиралью с C-концевой меткой his присутствуют в основном в форме тримеров в растворе, когда 500 mM L-аргинин добавляют в ходе лизиса клеток перед очисткой (фиг. 4, 5, 7 и 8).

Гетерогенное распределение размеров наблюдали для UspA2 с $1/2$ спирали, когда L-аргинин не добавляли в ходе лизиса клеток. Наблюдали две основных популяции. Не представлялось возможным подтвердить молекулярную массу молекул, детектированных посредством AUC (аналитическое ультрацентрифугирование) для этого препарата белка, поскольку коэффициент трения, который является необходимым для оценки молекулярной массы, необходимо рассчитывать для гомогенного образца. Однако на основании коэффициентов седиментации ни одна из наблюдаемых молекул, по-видимому, не соответствовала тримеру, наблюдаемому в других образцах.

На фиг. 4 проиллюстрировано распределение молекулярной массы очищенного MC-005, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. Большая часть белка обнаружена в форме тримера, с небольшой долей олигомера более высокой молекулярной массы, которая может соответствовать олигомеру от димера до тримера.

На фиг. 5 проиллюстрировано распределение молекулярной массы очищенного MC-001, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. Большая часть белка обнаружена в форме тримера.

На фиг. 6 проиллюстрировано распределение молекулярной массы очищенного MC-001, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. В образце представлено множество молекул, и он обладает высокой полидисперсностью. Коэффициент седиментации основных детектированных молекул не соответствует ни одному из тримеров, в норме детектированных в других партиях.

На фиг. 7 проиллюстрировано распределение молекулярной массы очищенного MC-001, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. Большая часть белка обнаружена в форме тримера.

На фиг. 8 проиллюстрировано распределение молекулярной массы очищенного MC-007, определенное посредством ультрацентрифугирования с анализом скорости седиментации. Большая часть белка обнаружена в форме тримера.

Круговой дихроизм/Вторичная структура

Круговой дихроизм (CD) используют для определения состава вторичной структуры белка посредством измерения различия в поглощении левополяризованного света по сравнению с правополяризованным светом, обусловленного структурной асимметрией. Форма и амплитуда спектров CD в области дальнего УФ (190-250 нм) являются различными, в зависимости от того, обладает ли белок бета-листом, альфа-спиралью или неупорядоченной спиральной структурой. Относительную распространенность каждого типа вторичной структуры в данном образце белка можно рассчитывать посредством сравнения с эталонными спектрами.

Спектры в дальнем УФ измеряют с использованием оптического пути 0,01 см от 178 до 250 нм, с разрешением и шириной полосы 1 нм в спектрополяриметре Jasco J-720. Температуру ячейки поддерживают при различных температурах посредством термостатированного по Пельтье блока ячеек RTE-111. Поток азота 10 л/мин поддерживали на протяжении измерений.

Концентрацию следующих белковых конструкций доводили до 4 00 мкг/мл в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH8,0 буфер.

а) MC-005, партия BMP53, в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

б) MC-001, партия BMP13, в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

с) MC-001, партия BMP14, в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

d) MC-001, партия BMP54, в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

e) MC-007, партия BMP70, в 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, pH 8,0

Расчеты вторичной структуры выполняли с использованием следующих алгоритмов:

Selcon 3 (Sreerama and Woody, Anal. Biochem. (1993), 209, 32; Sreerama and Woody, Biochemistry, 33, 10022-25 (1994); Sreerama et al. Protein Science, 8, 370-380 (1999); Johnson W.C.Jr., Proteins:Struc.Func.Genet.35,307-312 (1999)) CDSSTR (Johnson W.C. Proteins:Struc.Func.Genet. 35, 307-312 (1999), модифицировано Sreerama. N. (Anal.Biochem., 287,252 (2000)).

Показанные результаты представляют собой среднее от процента, рассчитанного с помощью обоих алгоритмов, и с предельной ошибкой 5%.

Результаты расчетов вторичной структуры для экспрессированных в ферментере белков показаны в табл. 5, с учетом предельной ошибки 5%.

Таблица 5. Расчеты вторичной структуры при 22°C

Белок	Спираль	Бета	Неупорядоченный
MC-005 BMP53	40, 8	26, 4	34, 1
MC-007 BMP70	58, 2	18, 2	24, 7
MC-001 BMP54	53, 7	14, 2	34, 4

Расчеты являются сравнимыми с формой и визуальным анализом спектров, где содержание спиралей увеличивается с интенсивностью минимума при 208 и 220 нм. Белки состоят из высокой доли спиральных структур, с присутствием бета-структур.

Наложение спектров на фиг. 9 показывает отсутствие значительных отличий формы между конструкциями. Для спектров спиралей MC-005 показана более низкая интенсивность, которую можно объяснить более низким содержанием альфа-структур, что согласуется с отсутствием С-концевой спирали.

На фиг. 9 проиллюстрированы спектры кругового дихроизма в дальнем УФ для конструкций UspA2 MC-001, MC-005 и MC007, дающие указания на вторичные структуры белков. Наложение спектров явно показывает, что конструкции, содержащие половину С-концевой спирали и полноразмерную С-концевую спираль, не обладают поддающимися детекции различиями своих вторичных структур, в то время как для конструкции без спирали получены спектры, отличающиеся по интенсивности, что можно объяснить различным содержанием вторичной структуры.

Термическое разворачивание

Измерение спектров CD в дальнем УФ при различных температурах в ходе термического разворачивания позволяет предполагать, что MC-005 является менее термически стабильным, чем MC-007. Спектры, наблюдаемые при 33°C для MC-005, являются сходными с типичными спектрами развернутого белка. Для конструкции MC-007, даже если частичную потерю вторичной структуры наблюдают при 33°C, полное разворачивание, по-видимому, происходит между 35°C и 37°C. Это может являться показателем более высокой термической стабильности содержащей полноразмерную спираль конструкции MC-007.

На фиг. 10 проиллюстрировано мониторинг вторичных структур посредством кругового дихроизма в ходе термического разворачивания MC-005 (UspA2 с Δ спирали+6His). Визуальный анализ спектров ясно показывает, что белок теряет большую часть своей вторичной структуры при 33°C.

На фиг. 11 проиллюстрировано мониторинг вторичных структур посредством кругового дихроизма в ходе термического разворачивания MC-007 (UspA2+спираль+6His). Визуальный анализ спектров показывает, что потеря вторичной структуры является более медленной по сравнению с конструкцией без спирали. Структурные изменения поддаются детекции при нагревании до 33°C, однако, по-видимому, полное разворачивание происходит между 35 и 37°C.

Термическое разворачивание по дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC)

Тепловые переходы различных конструкций UspA2 сравнивали, чтобы оценить эффект модификаций С-концевой спирали на термическую стабильность белков.

Анализ выполняли на VP-DSC из MicroCal (часть GE Healthcare). Буфер 20 mM NaPO₄, 10 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, pH8 использовали в качестве контроля и вычитали из сканирований. Белки уравнивали при исходной температуре в течение 15 мин перед изменением температуры. Затем проводили сканирование DSC от 10 до 60°C со скоростью нагревания 90°C/ч.

Два перехода детектировали в конструкциях MC-001 и MC-007 и только один - в MC-005. Величину перехода (или T_m) различных конструкций можно найти в табл. 6.

В то время как более низкая T_m всех трех белков составляет приблизительно 32°C, основным различием является значение второй T_m. Конструкция, содержащая полную спираль (MC-007), обладает более высокой T_m при 37,5°C, по сравнению с 34,5°C для половины спирали (MC-001).

Показано, что для MC-001 и MC-007 первая T_m около 32°C является обратимой, в то время как более высокая T_m является необратимой. Для MC-005, единственная детектированная T_m является необратимой.

Это может являться показателем более высокой термостабильности, содержащей полную спираль

конструкции MC-007.

Таблица 6. Температура плавления конструкций UspA2, измеренная посредством DSC

Конструкции	[мг/мл]	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
MC-005, партия BMP53	0,400	31,74	-----
MC-001, партия BMP54	0,400	32,02	34,51
MC-007, партия BMP70	0,400	32,19	37,50

Масс-спектрометрия

Образцы белка UspA2 получали посредством осаждения белка с помощью системы CHCl₃/MeOH/H₂O. Осадок белка осаждали центрифугированием на дно пробирки eppendorf перед осторожным высушиванием под азотом. Затем высушенный осадок растворяли в 2 мкл чистой муравьиной кислоты перед разведением с помощью 3 мкл ультрачистой воды и 5 мкл синапиновой кислоты. Синапиновую кислоту, использованную в качестве матрицы для анализа MALDI-TOF (на анализаторе масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из матрицы с последующей времяпролетной спектрометрией) получают в 50% CH₃CN/50% H₂O, дополненной TFA до конечной концентрации 0,1%.

1 мкл смеси образец+матрица наносили пятнами на мишень для MALDI из шлифованной нержавеющей стали Bruker 384 и оставляли высухать для кристаллизации при комнатной температуре и атмосферном давлении (способ высушенных капель).

Масс-спектрометрический анализ UspA2 проводили на масс-спектрометре Bruker Ultraflex 2 MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) в режиме положительной ионизации и в линейном режиме. Образцы белка, совместно кристаллизованные в матрице синапиновой кислоты, облучали посредством лазера smartbeam. Измерение массы интактного белка UspA2 выполняли в диапазоне масс 10000-100000 Да с ускоряющим напряжением 25 кВ. Выполняли тонкую настройку ослабления лазерного излучения, чтобы получать наилучший возможный сигнал белка и чтобы избежать какой-либо фрагментации, а также феномена фоновой сверхионизации. Калибровку масс-спектрометра проводили способом близкого внешнего контроля с гомологичной матрицей и с использованием коммерческой смеси белков для калибровки 2 от Bruker, посредством точного измерения следующих калибраторов: [M+2H]²⁺ (масса, измеренная посредством детектора MS после добавления двух ионов H⁺ к белку в ходе ионизации) молекул белка A при массе/заряде 22307 Да, [M+H]⁺ молекул трипсиногена при массе/заряде 23982 Да, [M+H]⁺ молекул белка A при массе/заряде 44613 Да и [M+H]⁺ молекул бычьего альбумина при массе/заряде 66431 Да. Каждый представленный спектр получен в результате суммирования 500 индивидуальных измерений.

Анализировали следующие образцы:

Конструкция MC-001 с аминокислотами MQAK (SEQ ID NO: 85) на N-конце, полученная в встряхиваемой колбе, партия opt-01, конструкция MC-011 с аминокислотами MAK на N-конце, полученная в встряхиваемой колбе, партия BMP37.

В табл. 7 и на фиг. 12 показано, что белок MC-001 с аминокислотами MQAK (SEQ ID NO: 85) на N-конце является по меньшей мере частично деметионированным, как показано по измеренной молекулярной массе 57427 Да, по сравнению с ожидаемой массой 57565 Да. Другой пик 57620 Да может представлять полноразмерный недеметионированный белок, N-ацетилированный белок или популяцию другого модифицированного белка.

На фиг. 12 проиллюстрирован спектр MALDI MC-001, партия opt-01. Наблюдаемая масса 57427 Да может соответствовать деметионированному белку, в то время как пик 57620 Да может соответствовать полноразмерному белку.

Как показано в табл. 7 и на фиг. 13, белок MC-011 с аминокислотами MAK на N-конце составляет основную популяцию при MALDI-MS, которая может соответствовать деметионированному белку с массой 57265 Да, по сравнению с 57437 Да для ожидаемой массы на основании полной аминокислотной последовательности. Два других пика +186 Да и +366 Да не являются близкими к каким-либо ожидаемым посттрансляционным модификациям, так что их невозможно было идентифицировать в этом эксперименте.

Таблица 7.

Молекулярная масса двух конструкций UspA2, как измерено по MALDI-MS. Обе конструкции обладают средней измеренной массой, более низкой, чем ожидаемая из аминокислотной последовательности. Масса основной популяции, полученная для обеих конструкций, может соответствовать деметионированному белку.

Белок	Теоретическая масса (Да)	Измеренная масса (Да)	Комментарий
МС-001, партия opt-01	57565,8	-57427,9 -57620,3	- Соответствует деметионилированию (57434,6) - Соответствует белку, содержащему N-концевой метионин
МС-011, партия ВМР37	57437,6	57265,2	Соответствует деметионилированию (57306,4)

N-концевое секвенирование посредством деградации по Эдману

Для оценки того, приводит ли оптимизация N-концевой области (оптимизация аминокислотной последовательности, следующей за N-концевого метионина) к деметионилированию белка, выполняли N-концевое секвенирование конструкции МС-011, несущей аминокислоты МАК на своем N-конце.

Белки разделяли посредством SDS PAGE в полиакриламидном геле Novex 4-20% от Invitrogen, перед переносом на мембрану Problot PVDF (поливинилидендифторид) (Bio-Rad). Мембрану окрашивали амидочерным. Затем представляющую интерес полосу вырезали, и анализ проводили по протоколу производителя с использованием системы секвенатора Applied Biosystems Procise. Проводили двенадцать циклов деградации по Эдману.

Полученная N-концевая аминокислотная последовательность представляет собой AKNDITLEDLP (SEQ ID NO:86), что соответствует N-концу белка, начиная с аминокислоты номер два после начального метионина. Это указывает на то, что зрелый белок является в основном деметионилированным.

Пример 7. Бактерицидная активность конструкции UspA2 МС-001:

Бактерицидный анализ

Moraxella catarrhalis культивировали в течение ночи на чашке Петри при 37°C+5% CO₂. Бактерии переносили в 12 мл 0,1% буфера HBSS-BSA (забуференный солевой раствор Хенкса с бычьим сывороточным альбумином), чтобы получить OD₆₂₀ 0,650. Образцы сыворотки нагревали в течение 45 мин при 56°C для инактивации эндогенного комплемента. Серийные двукратные разведения сыворотки в буфере SBA (HBSS-BSA 0,1%) добавляли в 96-луночный круглодонный планшет для микротитрования (25 мкл/лунку). Затем 50 мкл буфера SBA добавляли в каждую лунку. Затем 25 мкл штаммов *Moraxella catarrhalis* при 4×10⁴ КОЕ/мл добавляли в лунки, содержащие сыворотку, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Наконец, добавляли 25 мкл свежеразмороженного комплемента детеныша кролика, разведенного 1/8 в 0,1% HBSS-BSA, для достижения конечного объема 125 мкл. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C с ротационным встряхиванием (210 об./мин). Реакцию останавливали посредством выдерживания микропланшета на льду в течение по меньшей мере 5 мин.

После гомогенизации, различные разведения суспензии (смеси бактерий, сыворотки, комплемента и буфера, в объеме 125 мкл, как обсуждали в предыдущем разделе) наносили на чашки с "шоколадным" агаром, инкубировали в течение 24 ч при 37°C с 5% CO₂ и подсчитывали колонии *Moraxella catarrhalis*.

Восемь лунок без образцов сыворотки использовали в качестве бактериального контроля для определения количества колоний *Moraxella catarrhalis* на лунку. Среднее количество КОЕ (колониеобразующих единиц) в контрольных лунках определяли и использовали для расчета активности уничтожения для каждого образца сыворотки. Бактерицидные титры выражали как величину, обратную разведению сыворотки, индуцирующему 50% уничтожение.

Антисыворотки против UspA2, полученные у мышей, морских свинок и кроликов против МС-001, тестировали в бактерицидном анализе, описанном в настоящем описании выше, против 20 различных штаммов *Moraxella catarrhalis*, выделенных из различных тканей (крови, мокроты, жидкостей носа, среднего уха) в различных странах (США, Финляндия, Нидерланды, Норвегия, Швеция).

Как показано ниже, антитела против UspA2 являлись способными индуцировать перекрестное бактерицидное уничтожение *Moraxella catarrhalis*, вне зависимости от процента гомологии с UspA2, экспрессированного тестируемым штаммом. Кроме того, показана также бактерицидная активность штаммов, экспрессирующих только UspA1 или химерный белок UspA2Н. Как и ожидали, не измерены или измерены только слабые титры бактерицидных антител против мутантов с двойным нокаутом UspA1 и UspA2.

Таблица 8: Перекрестная бактерицидная активность антител против UspA2 МС-001, полученных у мыши, морской свинки и кролика. 1+2 КО представляет собой двойной нокаут, UspA1 и UspA2. 1КО представляет собой нокаут только UspA1. MEF (АОМ)=жидкость среднего уха (острый отит среднего уха). "/" в столбце источник выделения=источник выделения неизвестен.

Таблица 8

Перекрестная бактерицидная активность антител против UspA2 МС-001, полученных у мыши, мор-

ской свинки и кролика. 1+2 КО представляет собой двойной нокаут, UspA1 и UspA2. 1КО представляет собой нокаут только UspA1. MEF (AOM)=жидкость среднего уха (острый отит среднего уха). "/" в столбце источник выделения=источник выделения неизвестен.

Штаммы		Источник выделения	Присутствующий ген UspA	Идентичность в %* по сравнению с последовательностью вакцины ATCC25238	Бактерицидная активность антисыворотки против UspA2		
					Мышь	Морская свинка	Кролик
ATCC	25238	/	UspA1/UspA2	45,2/100	+++	++	+++
	43617	бронхит	UspA1	40,1	+	+	+
American	2926	/	UspA1	36,4	-	+/-	-
	2933	/	UspA1/UspA2	44,6/62,4	-	++	++
	2912	/	UspA1/UspA2	39,3/64,6	++	++	+++
	2908	/	UspA1/UspA2	43,3/52,8	+++	+++	+++
Finnish	307	MEF (AOM)	UspA1/UspA2	47,6/70,1	-	++	+++
	353	MEF (AOM)	UspA1/UspA2	45/61,8	+	++	++
	358	MEF (AOM)	UspA1/UspA2	47/61,5	+++	+++	+++
	216	MEF (AOM)	UspA1/UspA2	46,6/66,9	+++	+++	+++
Dutch	N9	полость носа	UspA1/UspA2H	41,1/70,1	++	+++	+++
	H2	мокрота	UspA1/UspA2	47/61,6	+++	+++	+++
	F10	мокрота	UspA1/UspA2	42,9/61,1	++	+++	+++
Norwegian	1	трахеотомия (при пневмонии)	UspA1/UspA2	44,6/60,9	+++	+++	+++
	13	трахеотомия (при пневмонии)	UspA1/UspA2	47,8/55	++	+++	+++
	20	трахеотомия (при пневмонии)	UspA1/UspA2	33,7/60,6	+++	++	+++
	25	трахеотомия (при пневмонии)	UspA1/UspA2	47,8/65	++	+++	+++
	27	трахеотомия (при пневмонии)	UspA1/UspA2	46/76,1	++	+++	+++
	36	трахеотомия (при пневмонии)	UspA1/UspA2	53,6/61,6	+	++	++
Swedish	BBH18 WT	мокрота	UspA1/UspA2H	42,9/57,3	+++	+++	+++
	BBH18 (1+2KO)			-	+	-	-
	BBH18 (1KO)		UspA2H	57,3	+++	+++	+++
	RH4 WT	кровь	UspA1/UspA2H	37,4/59,9	не выполняли	++	++
	RH4 (1+2KO)		-		-	-	+

* определено с использованием программного обеспечения Gapl./ClustalX по сравнению с фрагментом ак 30-540 UspA2 ATCC25238

+++	>50000
++	>20000
+	>500
-	<200

Таблица 9. Экспрессия UspA в штаммах *M. catarrhalis* из табл. 8

Штаммы		Экспрессия UspA1	Экспрессия UspA2	Экспрессия UspA2H
ATCC	25238	Да	Да	Нет
	43617	Да	стоп-кодон	Нет
American	2926	Да	Нет	стоп-кодон
	2933	Да	Да	Нет
	2912	Да	Да	Нет
	2908	Да	Да	Нет
Finnish	307	Да	Да	Нет
	353	Да	Да	Нет
	358	Да	Да	Нет
	216	Да	Да	Нет
Dutch	N9	Да	Нет	Да
	H2	Да	Да	Нет
	F10	Да	Да	Нет
Norwegian	1	Да	Да	Нет
	13	Да	Да	Нет
	20	Да	Да	Нет
	25	Да	Да	Нет
	27	Да	Да	Нет
	36	Да	Да	Нет
Swedish	BBH18 WT	Да	Нет	Да
	BBH18 (1+2KO)	Нет	Нет	Нет
	BBH18 (1 KO)	Нет	Нет	Да
	RH4 WT	Да	Нет	Да
	RH4 (1+2KO)	Нет	Нет	Нет

Пример 8. Защита в модели колонизации легких на мышах (MC-001)

Самок мышей Balb/c в возрасте пяти недель (n=8/5 групп) иммунизировали внутримышечным способом на сутки 0, 14 и 28 с помощью 50 мкл вакцины, содержащей 10 мкг конструкции UspA2 MC-001, в составе AS02V. Мышей подвергали интраназальному заражению на сутки 42 с помощью 5×10^5 КОЕ различных штаммов *Moraxella catarrhalis*. Бактерии подсчитывали в легких, собранных через 0, 3 и 6 ч после заражения. Различия между группами анализировали с использованием критерия Даннетта.

Как обобщено в табл. 10, конструкция UspA2 MC-001 индуцировала значительную защиту против как гомологичных, так и гетерологичных штаммов, включая штамм 43617, экспрессирующий UspA1, но не UspA2, и штамм BBH18, экспрессирующий химерный белок UspA2H (состоящий из N-концевой последовательности из UspA1 и C-концевой последовательности из UspA2).

Таблица 10. Защитная эффективность конструкции UspA2, MC-001

Штамм	Экспрессированный UspA	Идентичность в %* по сравнению с последовательностью вакцины ATCC25238	Log ₁₀ КОЕ/мл		Значение p
			Контрольная группа	Группа вакцины	
25238	UspA1 и UspA2	45,2/100	5,2	3,1	0,01
43617	UspA1	40,1	4,9	3,6	0,01
F10	UspA1 и UspA2	42,9/61,1	4,3	3,9	0,25
F10	UspA1 и UspA2	42,9/61,1	4,4	3,6	0,01
BBH18	UspA1 и UspA2H	42,9/57,3	4,3	3,5	0,01
20	UspA1 и UspA2	33,7/60,6	4,4	3,9	0,02

* определено с использованием программного обеспечения Gapl./ClustalX по сравнению с фрагментом ак 30-540 UspA2 ATCC25238

Значение p, указанные жирным шрифтом, являются значимыми (p<0,05)

Пример 9. Конструкция UspA2 MC-007: бактерицидная активность антител

Бактерицидный анализ

Moraxella catarrhalis 25238 культивировали в течение ночи на чашке Петри при 37°C+5% CO₂. Бактерии переносили в 12 мл буфера HBSS-BSA 0,1%, чтобы получить OD₆₂₀ 0,650. Образцы сыворотки нагревали в течение 45 мин при 56°C для инактивации эндогенного комплемента. Серийные двукратные разведения сыворотки в буфере SBA (HBSS-BSA 0,1%) добавляли в 96-луночный круглодонный планшет для микротитрования (25 мкл/лунку). Затем 50 мкл буфера SBA добавляли в каждую лунку. Затем 25 мкл *Moraxella catarrhalis* штамма 25238 при 4×10⁴ КОЕ/мл добавляли в лунки, содержащие сыворотку, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Наконец, добавляли 25 мкл свежеразмороженного комплемента детеныша кролика, разведенного 1/8 в 0,1% HBSS-BSA, для достижения конечного объема 125 мкл. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C с ротационным встряхиванием (210 об./мин). Реакцию останавливали посредством выдерживания микропланшета на льду в течение по меньшей мере 5 мин. После гомогенизации, различные разведения суспензии наносили на чашки с "шоколадным" агаром и инкубировали в течение 24 ч при 37°C с 5% CO₂, и подсчитывали колонии *Moraxella*. Восемь лунок без образцов сыворотки использовали в качестве бактериального контроля для определения количества колоний *Moraxella catarrhalis* на лунку. Среднее количество КОЕ в контрольных лунках определяли для расчета активности уничтожения для каждого образца сыворотки. Бактерицидные титры выражали как величину, обратную разведению сыворотки, индуцирующему 50% уничтожение.

Антисыворотки против UspA2, полученные у мышей с помощью конструкции UspA2 MC-001 или MC-007, тестировали в бактерицидном анализе с использованием протокола, описанного выше, против гомологичного штамма 25238 *Moraxella catarrhalis*.

Как показано в табл. 11, конструкция MC-007 UspA2 стимулировала высокий бактерицидный ответ, сходный с ответом, индуцированным MC-001.

Таблица 11. Бактерицидная активность антител против UspA2 MC-001 и MC-007. Нормальная сыворотка мышей=сыворотка от мышей, иммунизированных только AS02V, не UspA2

Образцы	Бактерицидные титры
Нормальная сыворотка мышей (AS02V)	–
Сыворотка мышей против убитых цельных клеток 25238	++
Сыворотка мышей против UspA2, против UspA2 MC-001	+++
Сыворотка мышей против UspA2, против UspA2 MC-007	+++

Пример 10. Конструкция UspA2 MC-007: Защитная эффективность в модели заражения легких

Защита в модели колонизации легких на мышцах самок мышей Balb/c в возрасте пяти недель (8 мышей на группу, 5 групп максимум на момент времени) иммунизировали внутримышечным способом на сутки 0, 14 и 28 с помощью 50 мкл вакцины, содержащей 10 мкг конструкции UspA2 MC-001 в составе с AS02V или MC-007 в составе с AS02V. Мышей подвергали интраназальному заражению на сутки 42 с помощью 5×10⁵ КОЕ *Moraxella catarrhalis* штамма ATCC (зарегистрированный в США товарный знак) 25238TM. Мышей иммунизировали 10 мкг убитых цельных клеток *Moraxella catarrhalis* штамма ATCC (зарегистрированный в США товарный знак) 25238TM (в качестве положительного контроля) (M.cat. WC 25238 на фиг. 14) или только AS02V (в качестве отрицательного контроля). Бактерии подсчитывали в легких, собранных через 0, 3 и 6 ч после заражения. Различия между группами анализировали с использованием критерия Даннетта.

Как показано на фиг. 14, обе конструкции UspA2 являлись сходным образом защитными против ATCC (зарегистрированный в США товарный знак) штамма 25238TM.

Пример 11. Иммуногенность белковых составов UspA2 MC-009 у мышей

Группы из 25 самок мышей Balb/c иммунизировали внутримышечным (IM) способом на сутки 0, 14 и 28 с помощью 50 мкл следующих составов:

MC-009 (1 мкг) AlPO₄ (1000 мкг/мл)

MC-009 (1 мкг) AS04_C (AlPO₄/MPL 100/100 на мл)

MC-009 (1 мкг) AS01_E (QS21/MPL 50/50 на мл)

Уровни антител против IgG определяли в индивидуальных сыворотках, собранных на сутки 28 (PII) и 42 (PIII) с использованием следующего протокола:

ELISA для измерения антител против UspA2.

Проводили покрытие планшетов в течение ночи при 4°C с помощью 100 мкл на лунку конструкции UspA2 MC-009 при 4 мкг/мл в карбонатном буфере pH 9,6. Планшеты промывали три раза NaCl 0,09% TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 (полисорбат 20) 0,05%. После промывки, в микрорунку добавляли серийные двукратные разведения сыворотки в PBS TWEEN (зарегистрированный в

США товарный знак) 20 0,05%. Планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. После промывки добавляли антитела против IgG мыши (Jackson 115-035-003), конъюгированные с пероксидазой (100 мкл на лунку) и планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. Планшеты промывали, как выше, и раствор для проявления (4 мг OPDA Sigma P8787) и 5 мкл H₂O₂ в 10 мл цитрата 0,1 М pH (pH) 4,5) добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунку) на 15 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl 1 Н и поглощение считывали при 490 нм (620 нм для контрольного фильтра).

Титры рассчитывали 4-параметрическим способом с использованием программного обеспечения SOFTMAX (зарегистрированный в США товарный знак) Pro.

Как показано на фиг. 15, UspA2 индуцировал высокие уровни антител с каждым адьювантным составом. Актерицидный анализ

Бактерицидный анализ проводили против *M. catarrhalis* штамма (ATCC (зарегистрированный в США товарный знак) 25238TM), экспрессирующего гомологичный полноразмерный UspA2 с использованием следующего протокола: *Moraxella catarrhalis* штамма ATCC (зарегистрированный в США товарный знак) 25238TM культивировали в течение ночи на чашке Петри при 37°C+5% CO₂. Бактерии переносили в 10 мл BHI (среда с экстрактом сердца), чтобы получить OD₆₂₀ 0,650. Образцы сыворотки нагревали в течение 45 мин при 56°C для инактивации эндогенного компонента. Серийные двукратные разведения сыворотки в буфере SBA (HBSS-BSA 0,1%) добавляли в 96-луночный круглодонный планшет для микротитрования (25 мкл/лунку). Затем 50 мкл буфера SBA добавляли в каждую лунку. Затем 25 мкл *Moraxella catarrhalis* штамма 25238TM при 4×10³ КОЕ/мл добавляли в лунки, содержащие сыворотку, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Наконец, добавляли 25 мкл свежеразмороженного компонента детеныша кролика, разведенного 1/8 в HBSS-BSA 0,1%, для достижения конечного объема 125 мкл. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C с ротационным встряхиванием (210 об./мин). Реакцию останавливали посредством выдерживания микропланшета на льду в течение по меньшей мере 5 мин. Затем аликвоту 20 мкл из каждой лунки планшета переносили в соответствующую лунку 96-луночного плоскодонного микропланшета и 50 мкл среды Мюллера-Хинтона - 0,9% агара добавляли в каждую лунку. 50 мкл PBS с 0,9% агаром добавляли в качестве второго слоя. После 3 ч при 37°C с 5% CO₂ планшеты инкубировали в течение ночи при 25°C, колонии *Moraxella* подсчитывали с использованием автоматической системы анализа изображений (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Germany). Восемь лунок без образцов сыворотки использовали в качестве бактериального контроля для определения количества *Moraxella* на лунку. Среднее количество КОЕ в контрольных лунках определяли и использовали для расчета активности уничтожения для каждого образца сыворотки. Бактерицидные титры выражали как величину, обратную разведению сыворотки, индуцирующему 50% уничтожение.

На фиг. 16 проиллюстрированы бактерицидные титры, индуцированные UspA2 против гомологичного штамма. В этом эксперименте, UspA2 индуцировал высокие уровни бактерицидных антител для каждого адьювантного состава. Сыворотку тестировали в РИИ; тестировали пять пулов из пяти образцов сыворотки.

Пример 12. Иммуногенность UspA2 в комбинации с антигенами PD и PE-PilA NTHi.

Протокол иммунизации

Группы из 25 самок мышей Balb/c иммунизировали внутримышечным (IM) способом на сутки 0, 14 и 28 с помощью 50 мкл следующих составов:

конструкция UspA2 MC-009 (1 мкг) AlPO₄

конструкция UspA2 MC-009 (1 мкг) AS04C

конструкция UspA2 MC-009 (1 мкг) AS01E

UspA2-PD-PEPila (конструкция UspA2 MC-009, конструкция PEPila LVL-735) AlPO₄ (1 мкг каждой из UspA2, PD и PEPila; 1000 мг/мл AlPO₄)

UspA2-PD-PEPila (конструкция UspA2 MC-009, конструкция PEPila LVL-735) AS04C, AlPO₄ (1 мкг каждой из UspA2, PD и PEPila; 100/100 на мл AlPO₄/MPL)

UspA2-PD-PEPila (конструкция UspA2 MC-009, конструкция PEPila LVL-735) AS01E (1 мкг каждой из UspA2, PD и PEPila; 50/50 на мл QS21/MPL)

ELISA для измерения антител против UspA2

Уровни IgG против Anti-UspA2 определяли в индивидуальных сыворотках, собранных на сутки 28 и 42, с использованием следующего протокола.

Проводили покрытие планшетов в течение ночи при 4°C с помощью 100 мкл на лунку конструкции UspA2 MC-009 при 4 мкг/мл в карбонатном буфере pH 9,6. Планшеты промывали три раза NaCl 0,09% TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 (полисорбат 20) 0,05%. После промывки, в микролунки добавляли серийные двукратные разведения сыворотки в PBS TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 0,05%. Планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. После промывки добавляли антитела против IgG мыши (Jackson 115-035-003), конъюгированные с пероксидазой (100 мкл на лунку), и планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. Планшеты промывали, как выше, и раствор для проявления (4 мг

OPDA Sigma P8787) и 5 мкл H_2O_2 в 10 мл цитрата 0,1 М PH (pH) 4,5) добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунку) на 15 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl 1N, и поглощение считывали при 490 нм (620 нм для контрольного фильтра). Титры рассчитывали 4-параметрическим способом с использованием программного обеспечения SOFTMAX (зарегистрированный в США товарный знак) Pro.

ELISA для измерения антител против PE

Проводили покрытие планшетов в течение ночи при 4°C с помощью 100 мкл на лунку 2 мкг/мл UspA2 в карбонатном буфере pH 9,6. Планшеты промывали три раза NaCl 0,09% TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 0,05%. После промывки, в микролунки добавляли серийные двукратные разведения сыворотки в PBS TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 0,05%. Планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. После промывки добавляли антитела против IgG мыши (Jackson 115-035-003), конъюгированные с пероксидазой (100 мкл на лунку), и планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. Планшеты промывали, как выше, и раствор для проявления (4 мг OPDA и 5 мкл H_2O_2 в 10 мл цитрата 0,1 М PH 4,5) добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунку) на 15 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl 1 N, и поглощение считывали при 490 нм (620 нм для контрольного фильтра).

Титры рассчитывали 4-параметрическим способом с использованием программного обеспечения SOFTMAX (зарегистрированный в США товарный знак) Pro.

ELISA для измерения антител против PilA

Проводили покрытие планшетов в течение ночи при 4°C с помощью 100 мкл на лунку 4 мкг/мл PilA в карбонатном буфере pH 9,6. Планшеты промывали три раза NaCl 0,09% TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 0,05%. После промывки, в микролунки добавляли серийные двукратные разведения сыворотки в PBS TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 0,05%. Планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. После промывки добавляли антитела против IgG мыши (Jackson 115-035-003), конъюгированные с пероксидазой (100 мкл на лунку), и планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. Планшеты промывали, как выше, и раствор для проявления (4 мг OPDA и 5 мкл H_2O_2 в 10 мл цитрата 0,1 М PH 4,5) добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунку) на 15 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl 1 N, и поглощение считывали при 490 нм (620 нм для контрольного фильтра).

Титры рассчитывали 4-параметрическим способом с использованием программного обеспечения SOFTMAX (зарегистрированный в США товарный знак) Pro.

ELISA для измерения антител против PD

Проводили покрытие планшетов в течение ночи при 4°C с помощью 100 мкл на лунку 8 мкг/мл PD в карбонатном буфере pH 9,6. Планшеты промывали три раза NaCl 0,09% TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 0,05%. После промывки, в микролунки добавляли серийные двукратные разведения сыворотки в PBS TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 0,05%. Планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. После промывки добавляли антитела против IgG мыши (Jackson 115-035-003), конъюгированные с пероксидазой (100 мкл на лунку), и планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. Планшеты промывали, как выше, и раствор для проявления (4 мг OPDA и 5 мкл H_2O_2 в 10 мл цитрата 0,1 М PH 4,5) добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунку) на 15 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl 1N, и поглощение считывали при 490 нм (620 нм для контрольного фильтра).

Титры рассчитывали 4-параметрическим способом с использованием программного обеспечения SOFTMAX (зарегистрированный в США товарный знак) Pro. Бактерицидный анализ Бактерицидные титры измеряли в пулированных сыворотках (5 пулов/группу), собранных на сутки 42 с использованием следующего протокола:

Moraxella catarrhalis культивировали в течение ночи на чашке Петри при 37°C+5% CO_2 . Бактерии переносили в 10 мл BHI (среда с экстрактом сердца), чтобы получить OD_{620} of 0,650. Образцы сыворотки нагревали в течение 45 мин при 56°C для инактивации эндогенного комплемента. Серийные двукратные разведения сыворотки в буфере SBA (HBSS-BSA 0,1%) добавляли в 96-луночный круглодонный планшет для микротитрования (25 мкл/лунку). Затем 50 мкл буфера SBA добавляли в каждую лунку. Затем 25 мкл *Moraxella catarrhalis* штамма 25238 при 4×10^3 КОЕ/мл добавляли в лунки, содержащие сыворотку, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Наконец, добавляли 25 мкл свежеразмороженного комплемента детеныша кролика, разведенного 1/8 в HBSS-BSA 0,1%, для достижения конечного объема 125 мкл. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C с ротационным встряхиванием (210 об./мин). Реакцию останавливали посредством выдерживания микропланшета на льду в течение по меньшей мере 5 мин. Затем аликвоту 20 мкл из каждой лунки планшета переносили в соответствующую лунку 96-луночного плоскодонного микропланшета, и 50 мкл среды Мюллера-Хинтона 0,9% агара добавляли в каждую лунку. 50 мкл PBS с 0,9% агаром добавляли в качестве второго слоя. После 3 ч при 37°C с 5% CO_2 планшеты инкубировали в течение ночи при 25°C. Колонии *Moraxella* подсчитывали с использованием автоматической системы анализа изображений (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Germany). Восемь лунок без образцов сыворотки использовали в качестве бактериального контроля для определе-

ния количества *Moraxella* на лунку. Среднее количество КОЕ в контрольных лунках определяли и использовали для расчета активности уничтожения для каждого образца сыворотки. Бактерицидные титры выражали как величину, обратную разведению сыворотки, индуцирующему 50% уничтожение.

Бактерицидный анализ проводили против *Moraxella catarrhalis* штамма 25238TM, экспрессирующего гомологичный UspA2.

Отрицательное влияние присутствия антигенов PD и PE-PilA на уровни IgG против UspA2 наблюдали в составах AS04_C (точка III) и AS01_E (точка II) (фиг. 17). Однако влияние оставалось ограниченным (уменьшение уровня антител в ≤ 2 раза) и не было подтверждено в бактерицидном анализе (фиг. 18). Ответы IgG, индуцированные против PD, PE и PilA у мышей посредством вакцины PE-PEPila-UspA2, показаны на фиг. 19, фиг. 20 и фиг. 21, соответственно.

Таким образом, UspA2 являлся иммуногенным при комбинации с PD и PE-PilA.

Пример 13. Конструкция UspA2 MC-009: Иммуногенность антигенов PD и PE-PilA NTHi в комбинации с UspA2 у мышей

Протокол иммунизации

Группы из 25 самок мышей Balb/c иммунизировали внутримышечным (IM) способом на сутки 0, 14 и 28 с помощью 50 мкл следующих составов:

PD-PEPila (1 мкг PD и 1 мкг конструкции PEPila LVL-735) AS01_E

UspA2-PD-PEPila (1 мкг конструкции UspA2 MC-009, PD и конструкции PEPila LVL-735) AS01_E

Уровни IgG против PD, PE и PilA в ELISA определяли в индивидуальных сыворотках, собранных на сутки 28 (PII) и 42 (PIII).

ELISA для измерения антител против PE

Проводили покрытие планшетов в течение ночи при 4°C с помощью 100 мкл на лунку 2 мкг/мл UspA2 в карбонатном буфере pH 9,6. Планшеты промывали три раза NaCl 0,09% TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 0,05%. После промывки, в микролунки добавляли серийные двукратные разведения сыворотки в PBS TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 0,05%. Планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. После промывки добавляли антитела против IgG мыши (Jackson 115-035-003), конъюгированные с пероксидазой (100 мкл на лунку), и планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. Планшеты промывали, как выше, и раствор для проявления (4 мг OPDA и 5 мкл H₂O₂ в 10 мл цитрата 0,1 M pH 4,5) добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунку) на 15 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl 1 N, и поглощение считывали при 490 нм (620 нм для контрольного фильтра).

Титры рассчитывали 4-параметрическим способом с использованием программного обеспечения SOFTMAX (зарегистрированный в США товарный знак) Pro. ELISA для измерения антител против PilA

Проводили покрытие планшетов в течение ночи при 4°C с помощью 100 мкл на лунку 4 мкг/мл of PilA в карбонатном буфере pH 9,6. Планшеты промывали три раза NaCl 0,09% TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 0,05%. После промывки, в микролунки добавляли серийные двукратные разведения сыворотки в PBS TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 0,05%. Планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. После промывки добавляли антитела против IgG мыши (Jackson 115-035-003), конъюгированные с пероксидазой (100 мкл на лунку), и планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. Планшеты промывали, как выше, и раствор для проявления (4 мг OPDA и 5 мкл H₂O₂ в 10 мл цитрата 0,1M pH 4,5) добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунку) на 15 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl 1 N, и поглощение считывали при 490 нм (620 нм для контрольного фильтра).

Титры рассчитывали 4-параметрическим способом с использованием программного обеспечения SOFTMAX (зарегистрированный в США товарный знак) Pro.

ELISA для измерения антител против PD

Проводили покрытие планшетов в течение ночи при 4°C с помощью 100 мкл на лунку 8 мкг/мл PD в карбонатном буфере pH 9,6. Планшеты промывали три раза NaCl 0,09% TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 0,05%. После промывки, в микролунки добавляли серийные двукратные разведения сыворотки в PBS TWEEN (зарегистрированный в США товарный знак) 20 0,05%. Планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. После промывки добавляли антитела против IgG мыши (Jackson 115-035-003), конъюгированные с пероксидазой (100 мкл на лунку), и планшеты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании. Планшеты промывали, как выше, и раствор для проявления (4 мг OPDA и 5 мкл H₂O₂ в 10 мл цитрата 0,1 M pH 4,5) добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунку) на 15 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl 1N, и поглощение считывали при 490 нм (620 нм для контрольного фильтра).

Титры рассчитывали 4-параметрическим способом с использованием программного обеспечения SOFTMAX (зарегистрированный в США товарный знак) Pro.

Не наблюдали значительного влияния добавления UspA2 на иммуногенность PD и PEPila в AS01_E, как показано на фиг. 22, 23 и 24.

Пример 14. Безопасность тетравалентного вакцинного состава, содержащего UspA2, в модели воспаления легких с *Moraxella catarrhalis* на мышах.

Для уменьшения риска индукции нежелательных воспалительных ответов в легких пациентов COPD при иммунизации вакциной-кандидатом с целью предотвращения обострений из-за нетипируемого *Haemophilus influenzae* (NTHi) и *Moraxella catarrhalis* (M. cat.), различные модели на животных разрабатывали и использовали для оценки безопасности этой вакцины. Тестируемый состав содержал три антигена NTHi (PD, PE и PilA, где два последних комбинировали в форме слитого белка PEPilA), один антиген M. cat. (UspA2) и адъювантную систему 01_E (AS01_E).

В частности, две модели предназначены для оценки безопасности компонента UspA2 вакцины.

Модель 1.

Цель:

Целью этой модели являлась оценка возможной индукции нежелательных иммунных ответов в воспаленных легких после вакцинации.

Дизайн исследования

Мышей C57Bl/6 сенсibilизировали посредством трех интраназальных введений 25 мкг инактивированных нагреванием цельных клеток M. cat. штамма ATCC (зарегистрированный в США товарный знак) 25238™ (экспрессирующих UspA2, который является на 100% гомологичным вакцинному UspA2) на сутки 0, 7 и 14. Эта обработка индуцировала в легких периваскулярное и перибронхиолярное воспаление (с формированием лимфоидных агрегатов), альвеолит, пневмонит, фиброз и сильный ответ IL-17⁺ CD4⁺ Т-клеток, специфических для цельных клеток M.cat., что вместе имитировало воспалительный процесс, наблюдаемый в легких пациентов с COPD (за исключением эмфиземы).

Затем мышей вакцинировали на сутки 42 внутримышечным способом 1/10^{-й} дозы для человека следующих составов:

PD 10 мкг/ PEPilA (конструкция LVL735, описанная в WO 2012/139225) 10 мкг/ UspA2 (конструкция MC009) 10 мкг/ AS01_E

PD 10 мкг/ PEPilA (конструкция LVL735) 10 мкг/ UspA2 (конструкция MC009) 3,3 мкг/ AS01_E

AS01_E (отрицательный контроль)

PBS (отрицательный контроль)

Для оценки влияния этих составов на индуцированное сенсibilизацией воспаление легких:

Мышей ежедневно мониторировали от суток 43 до суток 49 для обследования смертности и любых клинических признаков, указывающих на индукцию неблагоприятных событий (упадок сил, piloэрекция, горбленая поза).

Гистологический анализ легких проводили на сутки 2, 7 и 14 после вакцинации (по 5 мышей на группу и временную точку) для наблюдения возможного ухудшения воспаления.

Индукцию потенциально нежелательных Т-клеточных ответов оценивали на пулах легких, собранных на сутки 7 и 14 после вакцинации (по 4 пула/группу/временную точку и легкие от 3 мышей на группу). Т-клетки легких повторно стимулировали в течение ночи пептидами UspA2, инактивированными нагреванием цельными клетками (WC) M. cat. или средой (в качестве отрицательного контроля), а затем анализировали проточной цитометрией по экспрессии CD5, CD4, CD8, IL-17, IL-13, TNFα и IFNγ.

Результаты

Не зарегистрировано смертности или неблагоприятных событий.

Гистология легких (фиг. 25-29):

Изменения, наблюдаемые в легких, являлись сходными по тяжести во всех группах и характеризовались периваскулярной/бронхиолярной инфильтрацией мононуклеарных клеток от слабой до умеренной степени.

Не наблюдали альвеолита и/или пневмонита, связанных с вакцинацией.

Т-клеточный ответ:

Сильные ответы CD4⁺ Т-клеток (в основном, клеток, продуцирующих IL-17 и TNFα) измеряли в легких после повторной стимуляции WC, однако, вне зависимости от введенного состава (вакцины или только адъювант, или PBS) (фиг. 30-33). Наблюдали низкие ответы или отсутствие ответов CD8⁺ Т-клеток легких (данные не показаны).

Не происходило повторной стимуляции подающегося детекции ответа Т-клеток посредством пептидов UspA2, вне зависимости от группы, что указывает на то, что специфический для UspA2 ответ не был примирован или повторно стимулирован после вакцинации (данные не показаны).

Модель 2.

Цель:

Целью этой модели являлась оценка возможной индукции нежелательных иммунных ответов в воспаленных легких после вакцинации и заражения M. cat.

Дизайн исследования

Мышей C57Bl/6 последовательно подвергали:

Сенсibilизации посредством трех интраназальных введений 25 мкг инактивированных нагревани-

ем цельных клеток M. cat. штамма 25238 (экспрессирующих UspA2, который является на 100% гомологичным вакцинному UspA2) на сутки 0, 7 и 14 (как в модели 1).

Вакцинации на сутки 42 внутримышечным способом $1/10^4$ дозы для человека следующих составов (как в модели 1):

PD (10 мкг/ PEPiA (конструкция LVL735) 10 мкг/ UspA2 (конструкция MC009) 10 мкг/ AS01_E

PD 10 мкг/ PEPiA (конструкция LVL735) 10 мкг/ UspA2 (конструкция MC009) 3,3 мкг/ AS01_E

AS01_E (отрицательный контроль)

PBS (отрицательный контроль)

Заражению посредством одного интраназального введения 25 мкг инаktivированных нагреванием WC M. cat. штамма F10 (экспрессирующих UspA2, разделяющий 53% гомологии с вакцинным UspA2) или посредством одного интраназального введения PBS в качестве контроля, оба на сутки 56. Штамм для заражения являлся отличным от штамма для сенсибилизации для имитации ситуации, наблюдаемой у пациентов с COPD, испытывающих новые обострения из-за вновь приобретенных штаммов M. cat.

Для оценки влияния вакцинации и заражения на индуцированное сенсибилизацией воспаление легких:

Мышей ежедневно мониторировали от суток 43 до суток 63 для обследования смертности и любых клинических признаков, указывающих на индукцию неблагоприятных событий (упадок сил, piloэрекция, сгорбленная поза).

Индукцию потенциально нежелательных Т-клеточных ответов оценивали на пулах легких, собранных на сутки 7 и 14 после заражения (по 4 пула/группу/временную точку и легкие от 3 мышей на группу). Т-клетки легких повторно стимулировали в течение ночи пептидами UspA2, инаktivированными нагреванием WC M. cat. F10 или средой (в качестве отрицательного контроля), а затем анализировали проточной цитометрией по экспрессии CD5, CD4, CD8, IL-17, IL-13, TNF α и IFN γ .

Результаты

Не зарегистрировано смертности или неблагоприятных событий.

Ответ Т-клеток:

Сильные ответы CD4⁺ Т-клеток после заражения (в основном, клеток, продуцирующих IL-17 и TNF α) измеряли в легких после повторной стимуляции WC F10, вне зависимости от введенного состава (вакцины или только адъювант, или PBS) (фиг. 34-37). Неудивительно, что эти ответы были более высокими у мышей после заражения инаktivированными бактериями, чем у мышей после заражения PBS. Вне зависимости от заражения, наблюдали низкие ответы или отсутствие ответов CD8⁺ Т-клеток легких (данные не показаны).

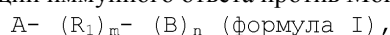
Не происходило повторной стимуляции поддающегося детекции ответа Т-клеток посредством пептидов UspA2, вне зависимости от группы, что указывает на то, что специфический для UspA2 ответ не был примирован или повторно стимулирован после заражения (данные не показаны).

Заключение

Показано, что тестируемые составы PD/PEPiA/UspA2/AS01_E и, более конкретно, компонент UspA2 этих вакцин, являлись безопасными в модели воспаления легких с M. cat. у мышей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок формулы I для индукции иммунного ответа против *Moraxella catarrhalis*:



где

A представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2 из *Moraxella catarrhalis*, имеющий по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID No: 39, SEQ ID No: 40, SEQ ID No: 41, SEQ ID No: 42 или SEQ ID No: 43;

R₁ представляет собой аминокислоту;

m представляет собой 0 или 2;

B представляет собой гистидин и

n представляет собой 0, 1, 2 или 6.

2. Белок по п.1, где m представляет собой 2.

3. Белок по п.1, где m представляет собой 0.

4. Белок по любому из пп.1-3, где (R₁)_m представляет собой AS (аланин, серин).

5. Белок по любому из пп.1-4, где n выбран из группы, состоящей из 1, 2 и 6.

6. Белок по любому из пп.1-5, где n представляет собой 2.

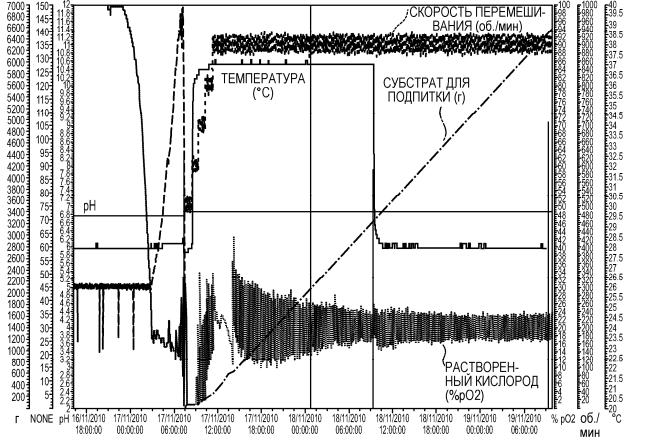
7. Белок по любому из пп.1-6, дополнительно содержащий метионин на аминоконце.

8. Белок по любому из пп.1-4 или 7, где n представляет собой 0.

9. Белок по любому из пп.1-8, где A представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, выбранный из группы, состоящей из аминокислот 30-540 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 39), аминокислот 31-540 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 40), аминокислот 30-519 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 41), аминокислот 30-564 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 42) и аминокислот 31-564 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 43).

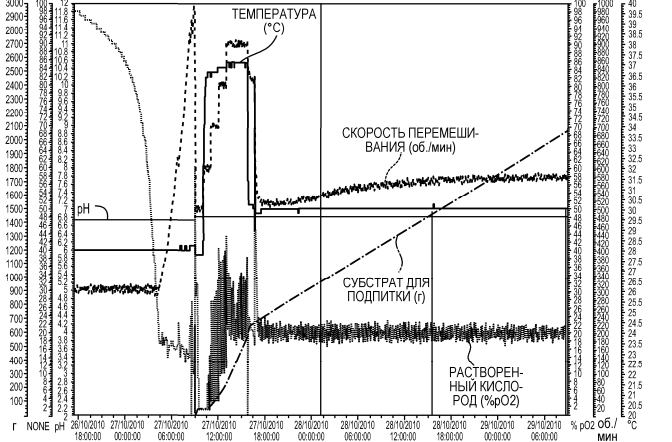
10. Белок по любому из пп.1-9, где А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, имеющий по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности с SEQ ID NO: 39.
11. Белок по любому из пп.1-9, где А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, имеющий по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности с SEQ ID NO: 43.
12. Белок по любому из пп.1-11, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 88.
13. Белок по п.12, имеющий последовательность SEQ ID NO: 69.
14. Белок по любому из пп.1-13, где А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, содержащий связывающий ламинин домен и связывающий фибронектин домен.
15. Белок по любому из пп.1-13, где А представляет собой иммуногенный фрагмент UspA2, содержащий связывающий ламинин домен, связывающий фибронектин домен и связывающий C3 домен.
16. Иммуногенная композиция для индукции иммунного ответа против *Moraxella catarrhalis*, содержащая белок по любому из пп.1-15.
17. Иммуногенная композиция по п.16, содержащая белок, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 88.
18. Иммуногенная композиция по любому из пп.16, 17, дополнительно содержащая по меньшей мере один антиген из *Haemophilus influenzae*.
19. Иммуногенная композиция по п.18, где указанный один антиген представляет собой белок D.
20. Иммуногенная композиция по пп.16-19, дополнительно содержащая белок E.
21. Иммуногенная композиция по любому из пп.16-20, дополнительно содержащая PilA.
22. Иммуногенная композиция по п.21, где PE и PilA присутствуют в форме слитого белка.
23. Вакцина для индукции иммунного ответа против *Moraxella catarrhalis*, содержащая белок по любому из пп.1-15 или иммуногенную композицию по любому из пп.16-22.
24. Вакцина по п.23, дополнительно содержащая адъювант.
25. Вакцина по п.24, где адъювант представляет собой AS01E.
26. Вакцина по любому из пп.23-25, где иммуногенная композиция содержит белок из SEQ ID NO: 69, белок D и слитый белок PE-PilA.
27. Вакцина по любому из пп.23-26, где слитый белок PE-PilA представляет собой LVL-735.
28. Вакцина по любому из пп.23-27, содержащая 10 мкг белка D, 10 мкг слитого белка PEPilA LVL735, 10 мкг фрагмента UspA2 MC009 и адъювант AS01E.
29. Вакцина по любому из пп.23-27, содержащая 10 мкг белка D, 10 мкг слитого белка PEPilA LVL735, 3,3 мкг фрагмента UspA2 MC009 и адъювант AS01E.
30. Способ лечения или профилактики отита среднего уха у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.16-22 или вакцины по любому из пп.23-29.
31. Способ лечения или профилактики острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (АЕСОРD) у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.16-22 или вакцины по любому из пп.23-29.
32. Способ лечения или профилактики пневмонии у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.16-22 или вакцины по любому из пп.23-29.
33. Способ лечения или профилактики заболевания, вызванного *M. Catarrhalis*, у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.16-22 или вакцины по любому из пп.23-29.
34. Применение белка по пп.1-15 в лечении или профилактике отита среднего уха.
35. Применение иммуногенной композиции по пп.16-22 в лечении или профилактике отита среднего уха.
36. Применение вакцины по пп.23-29 в лечении или профилактике отита среднего уха.
37. Применение белка по пп.1-15 в лечении или профилактике острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (АЕСОРD).
38. Применение иммуногенной композиции по пп.16-22 в лечении или профилактике острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (АЕСОРD).
39. Применение вакцины по пп.23-29 в лечении или профилактике острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (АЕСОРD).
40. Применение белка по пп.1-15 в лечении или профилактике пневмонии.
41. Применение иммуногенной композиции по пп.16-22 в лечении или профилактике пневмонии.
42. Применение вакцины по пп.23-29 в лечении или профилактике пневмонии.
43. Белок по пп.1-15 или иммуногенная композиция по пп.16-22, или вакцина по пп.23-29 для применения в лечении или профилактике заболевания, вызванного *M. catarrhalis*.

ТИПИЧНЫЙ ПРОФИЛЬ ФЕРМЕНТАЦИИ ДЛЯ СПОСОБОВ С ИНДУКЦИЕЙ ПРИ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК (НСДИ) И ПАРАМЕТРЫ, МОНИТОРИРУЕМЫЕ В ХОДЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ С ПОДПИТКОЙ В МАСШТАБЕ 20 Л



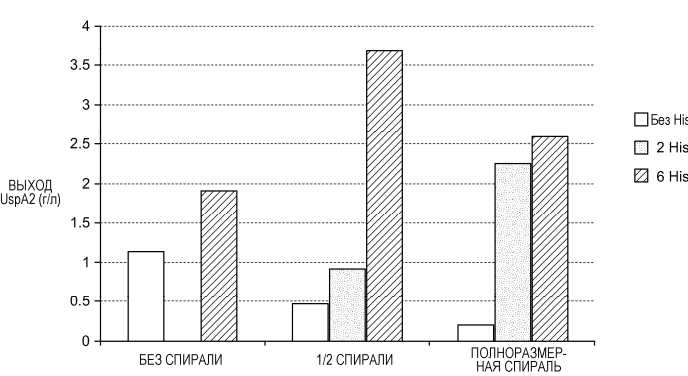
Фиг. 1

ТИПИЧНЫЙ ПРОФИЛЬ ФЕРМЕНТАЦИИ ДЛЯ СПОСОБОВ С ИНДУКЦИЕЙ ПРИ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК (НСДИ) И ПАРАМЕТРЫ, МОНИТОРИРУЕМЫЕ В ХОДЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ С ПОДПИТКОЙ В МАСШТАБЕ 20 Л



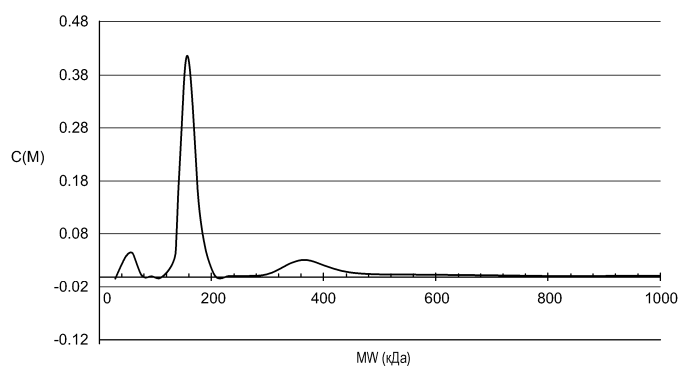
Фиг. 2

Выход UspA2 для белковых конструкций MC-001, MC-002, MC-004, MC-005, MC-006, MC-007, MC-008 и MC-010, оцененный в ферментере; данные из таблицы 4 His=ГИСТИДИН



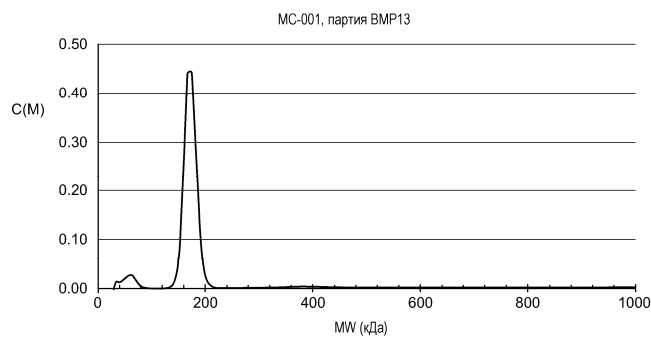
Фиг. 3

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ОЧИЩЕННОГО МС-005, ОПРЕДЕЛЕННОЕ ПОСРЕДСТВОМ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ С АНАЛИЗОМ СКОРОСТИ СЕДИМЕНТАЦИИ. БОЛЬШАЯ ЧАСТЬ БЕЛКА ОБНАРУЖЕНА В ФОРМЕ ТРИМЕРА, С НЕБОЛЬШОЙ ДОЛЕЙ ОЛИГОМЕРА БОЛЕЕ ВЫСОКОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ, КОТОРАЯ МОЖЕТ СООТВЕТСТВОВАТЬ ОЛИГОМЕРУ ОТ ДИМЕРА ДО ТРИМЕРА MW=МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА кДа=КИЛОДАЛЬТОН



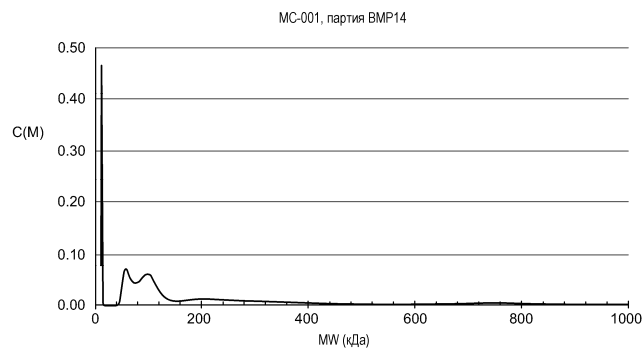
Фиг. 4

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ОЧИЩЕННОГО МС-001, ОПРЕДЕЛЕННОЕ ПОСРЕДСТВОМ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ С АНАЛИЗОМ СКОРОСТИ СЕДИМЕНТАЦИИ. БОЛЬШАЯ ЧАСТЬ БЕЛКА ОБНАРУЖЕНА В ФОРМЕ ТРИМЕРА



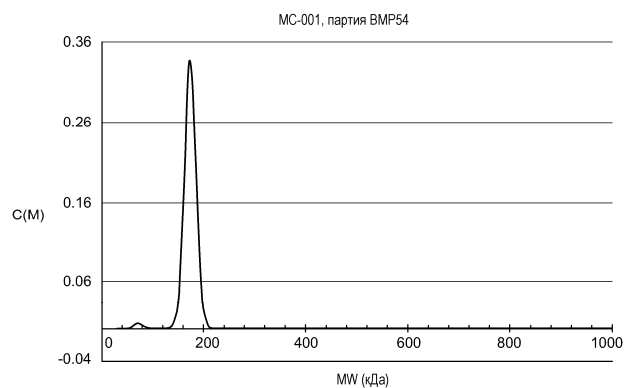
Фиг. 5

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ОЧИЩЕННОГО МС-001, ОПРЕДЕЛЕННОЕ ПОСРЕДСТВОМ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ С АНАЛИЗОМ СКОРОСТИ СЕДИМЕНТАЦИИ. В ОБРАЗЦЕ ПРЕДСТАВЛЕНО МНОЖЕСТВО МОЛЕКУЛ, И ОН ОБЛАДАЕТ ВЫСОКОЙ ПОЛИДИСПЕРСНОСТЬЮ. КОЭФФИЦИЕНТ СЕДИМЕНТАЦИИ ОСНОВНЫХ ДЕТЕКТИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ НЕ СООТВЕТСТВУЕТ НИ ОДНОМУ ИЗ ТРИМЕРОВ, В НОРМЕ ДЕТЕКТИРОВАННЫХ В ДРУГИХ ПАРТИЯХ



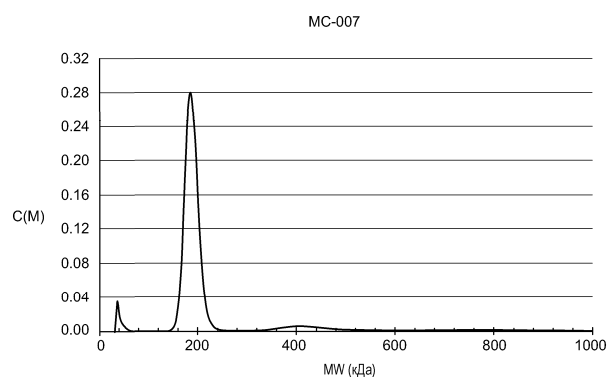
Фиг. 6

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ОЧИЩЕННОГО МС-001, ОПРЕДЕЛЕННОЕ ПОСРЕДСТВОМ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ С АНАЛИЗОМ СКОРОСТИ СЕДИМЕНТАЦИИ. БОЛЬШАЯ ЧАСТЬ БЕЛКА ОБНАРУЖЕНА В ФОРМЕ ТРИМЕРА



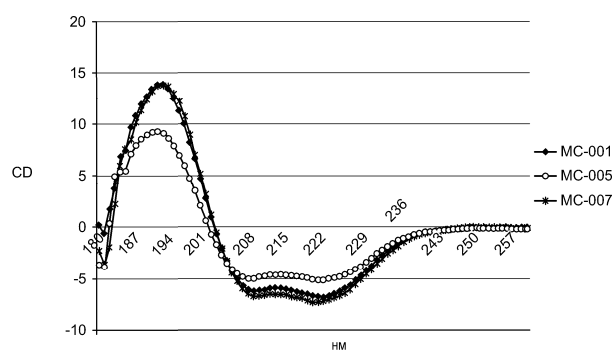
Фиг. 7

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ОЧИЩЕННОГО МС-007, ОПРЕДЕЛЕННОЕ ПОСРЕДСТВОМ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ С АНАЛИЗОМ СКОРОСТИ СЕДИМЕНТАЦИИ. БОЛЬШАЯ ЧАСТЬ БЕЛКА ОБНАРУЖЕНА В ФОРМЕ ТРИМЕРА



Фиг. 8

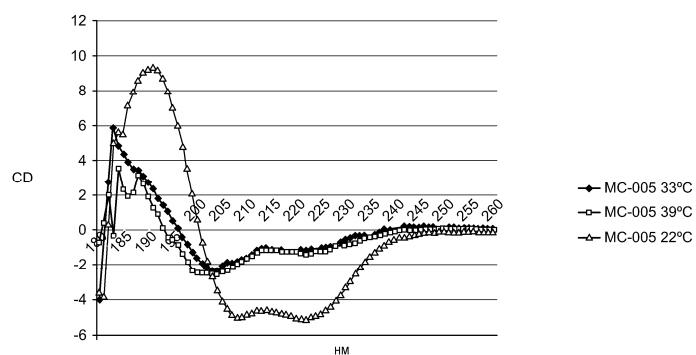
СПЕКТРЫ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА (CD) В ДАЛЬНОМ УФ ДЛЯ КОНСТРУКЦИЙ UspA2, ДАЮЩИЕ УКАЗАНИЯ НА ВТОРИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ



Фиг. 9

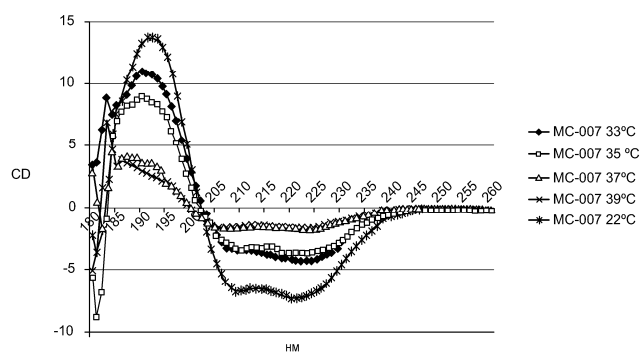
034352

МОНИТОРИНГ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ПОСРЕДСТВОМ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА (CD) В ХОДЕ ТЕРМИЧЕСКОГО РАЗВОРАЧИВАНИЯ MC-005 (UsrA2ΔСПИРАЛЬ+βHis). ВИЗУАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПЕКТРОВ ЯСНО ПОКАЗЫВАЕТ, ЧТО БЕЛОК ТЕРЯЕТ БОЛЬШУЮ ЧАСТЬ СВОЕЙ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПРИ 33°C



Фиг. 10

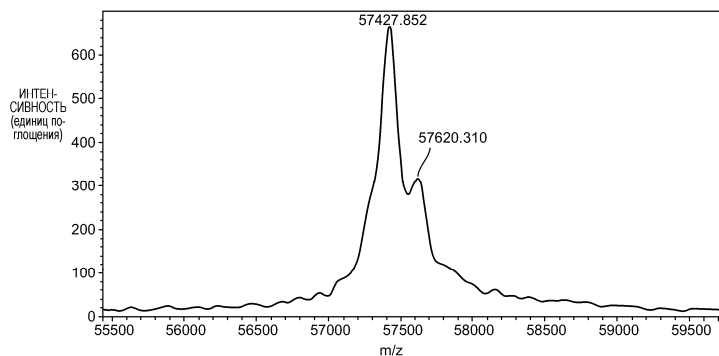
МОНИТОРИНГ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ПОСРЕДСТВОМ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА (CD) В ХОДЕ ТЕРМИЧЕСКОГО РАЗВОРАЧИВАНИЯ MC-007 (UsrA2 ПОЛНАЯ СПИРАЛЬ+βHis). ВИЗУАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПЕКТРОВ ПОКАЗЫВАЕТ, ЧТО ПОТЕРЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ЯВЛЯЕТСЯ БОЛЕЕ МЕДЕННОЙ ПО СРАВНЕНИЮ С КОНСТРУКЦИЕЙ БЕЗ СПИРАЛИ. СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДАЮТСЯ ДЕТЕКЦИИ ПРИ НАГРЕВАНИИ ДО 33°C. ОДНАКО, ПО-ВИДИМОМУ, ПОЛНОЕ РАЗВОРАЧИВАНИЕ ПРОИСХОДИТ МЕЖДУ 35°C И 37°C



Фиг. 11

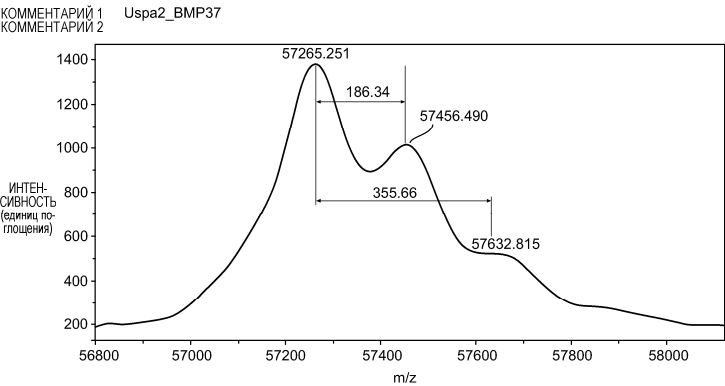
СПЕКТР MALDI MC-001 ПАРТИИ opt-01. НАБЛЮДАЕМАЯ МАССА 57427 Да МОЖЕТ СООТВЕТСТВОВАТЬ ДЕМЕТИОНИЛИРОВАННОМУ БЕЛКУ, В ТО ВРЕМЯ КАК ПИК 57620 Да МОЖЕТ СООТВЕТСТВОВАТЬ ПОЛНОРАЗМЕРНОМУ БЕЛКУ

КОММЕНТАРИЙ 1 UsrA2 opt-His партии opt 01 bm_CHC13/MeOH_Sin
КОММЕНТАРИЙ 2

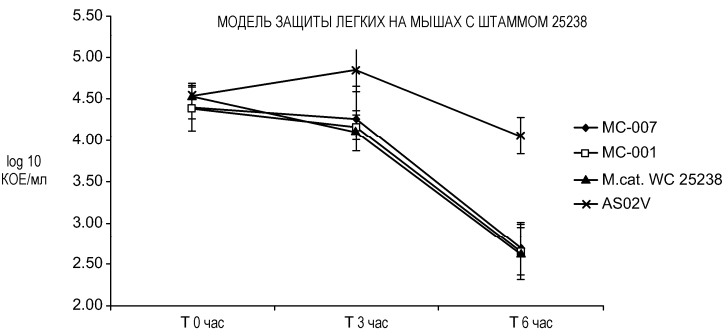


Фиг. 12

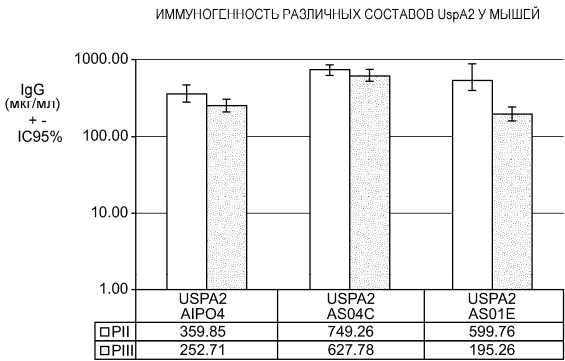
СПЕКТР MALDI MS-011 ПАРТИИ ВМР37. НАБЛЮДАЕМАЯ МАССА МОЖЕТ СООТВЕТСТВОВАТЬ ДЕМЕТИОНИЛИРОВАННОМУ БЕЛКУ. ДВА ДРУГИХ ПИКА +186 Да И +366 Да НЕ ИДЕНТИФИЦИРОВАНЫ



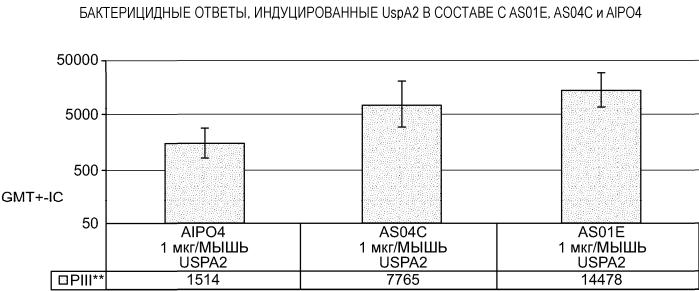
ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МС-001 И МС-007 В МОДЕЛИ КОЛОНИЗАЦИИ ЛЕГКИХ НА МЫШАХ



ОТВЕТ АНТИТЕЛ, НАПРАВЛЕННЫЙ ПРОТИВ UspsA2, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПОСЛЕ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ВВЕДЕНИЯ У МЫШЕЙ, ГДЕ РII И РIII ОБОЗНАЧАЮТ, СООТВЕТСТВЕННО, УРОВНИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ IgG В СЫВОРОТКЕ, СОБРАННОЙ НА СУТКИ 28 (ТОЧКА II) И СУТКИ 42 (ТОЧКА III)



БАКТЕРИЦИДНЫЕ ТИТРЫ ПРОТИВ ГОМОЛОГИЧНОГО ШТАММА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ UspsA2, СОСТАВЛЕННЫМ С РАЗЛИЧНЫМИ АДЬЮВАНТАМИ (AS01E, AS04C и AIPO4). **=ТЕСТИРОВАНО ПЯТЬ ПУЛОВ (ТЕСТИРОВАНО 5 ПУЛОВ ПО ПЯТЬ СЫВОРОТОК)

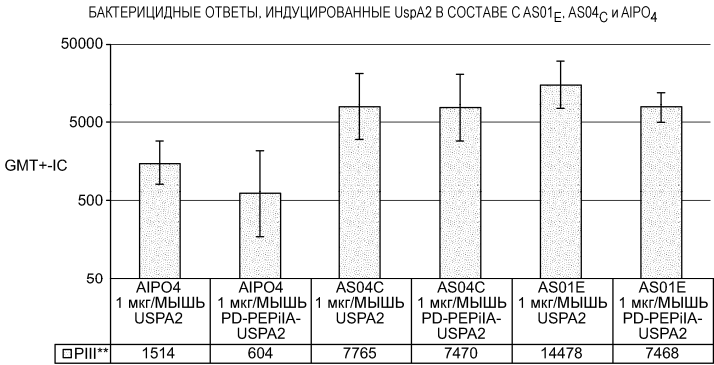


ОТВЕТ АНТИТЕЛ, НАПРАВЛЕННЫЙ ПРОТИВ UspA2, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПОСЛЕ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ВВЕДЕНИЯ У МЫШЕЙ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ СОСТАВОВ АНТИГЕНОВ И АДЬЮВАНТОВ



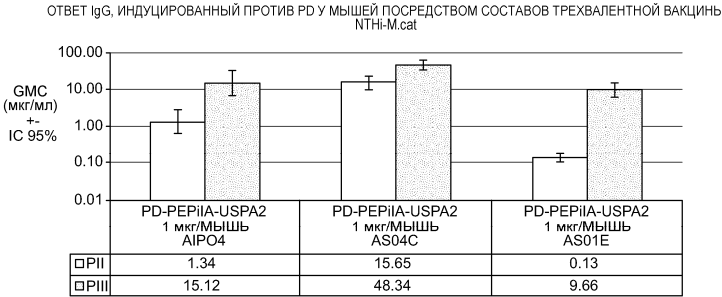
Фиг. 17

БАКТЕРИЦИДНЫЕ ТИТРЫ ПРОТИВ ГОМОЛОГИЧНОГО ШТАММА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ UspA2, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ СОСТАВОВ АНТИГЕНОВ И АДЬЮВАНТОВ. **=ТЕСТИРОВАНО ПЯТЬ ПУЛОВ (ТЕСТИРОВАНО 5 ПУЛОВ ПО ПЯТЬ СЫВОРОТОК)



Фиг. 18

ОТВЕТ IgG, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПРОТИВ PD У МЫШЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ВАКЦИНЫ PD-PERiA-UspA2 (ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ NTHi-M.cat.), СОСТАВЛЕННОЙ С РАЗЛИЧНЫМИ АДЬЮВАНТАМИ



Фиг. 19

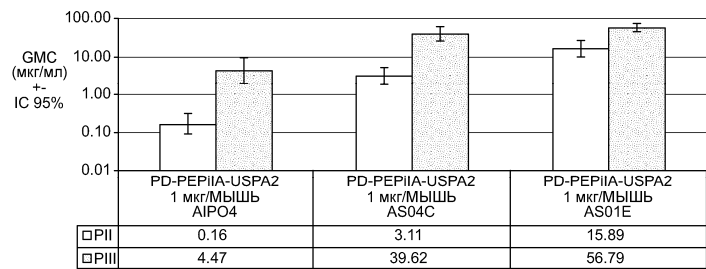
ОТВЕТ IgG, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПРОТИВ PE У МЫШЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ВАКЦИНЫ PD-PERiA-UspA2 (ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ NTHi-M.cat.), СОСТАВЛЕННОЙ С РАЗЛИЧНЫМИ АДЬЮВАНТАМИ



Фиг. 20

ОТВЕТ IgG, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПРОТИВ РiA У МЫШЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ВАКЦИНЫ PD-PEP*i*A-UspA2 (ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ NTHi-M.cat.), СОСТАВЛЕННОЙ С РАЗЛИЧНЫМИ АДЬЮВАНТАМИ

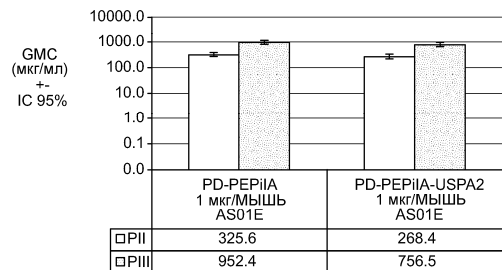
ОТВЕТ IgG, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПРОТИВ РiA У МЫШЕЙ ПОСРЕДСТВОМ СОСТАВОВ ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ NTHi-Mcat



Фиг. 21

ИММУНОГЕННОСТЬ РЕ В ДВУХВАЛЕНТНОМ NTHi PD-PEP*i*A И ТРЕХВАЛЕНТНОМ NTHi-M.cat. PD-PEP*i*A-UspA2 СОСТАВАХ С AS01E

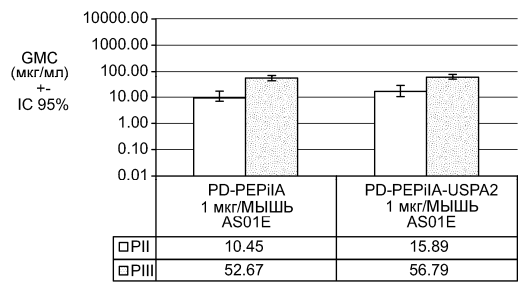
ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ UspA2 НА ИММУНОГЕННОСТЬ PD, РЕ И РiA. ТИТРЫ ПРОТИВ РЕ, 14Pii-PIII



Фиг. 22

ИММУНОГЕННОСТЬ РiA В ДВУХВАЛЕНТНОМ NTHi PD-PEP*i*A И ТРЕХВАЛЕНТНОМ NTHi-M.cat. PD-PEP*i*A-UspA2 СОСТАВАХ С AS01E

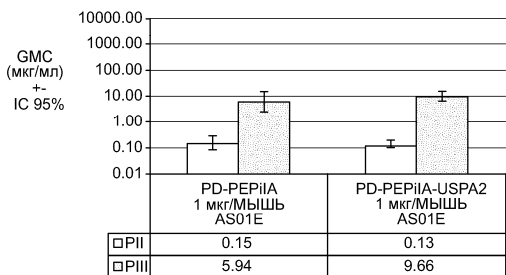
ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ UspA2 НА ИММУНОГЕННОСТЬ PD, РЕ И РiA. ТИТРЫ ПРОТИВ РiA, 14Pii-PIII



Фиг. 23

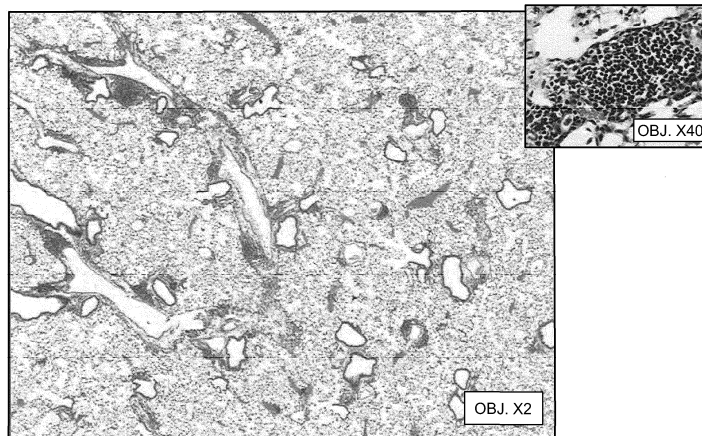
ИММУНОГЕННОСТЬ PD В ДВУХВАЛЕНТНОМ NTHi PD-PEP*i*A И ТРЕХВАЛЕНТНОМ NTHi-M.cat. PD-PEP*i*A-UspA2 СОСТАВАХ С AS01E

ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ UspA2 НА ИММУНОГЕННОСТЬ PD, РЕ И РiA. ТИТРЫ ПРОТИВ PD, 14Pii-PIII



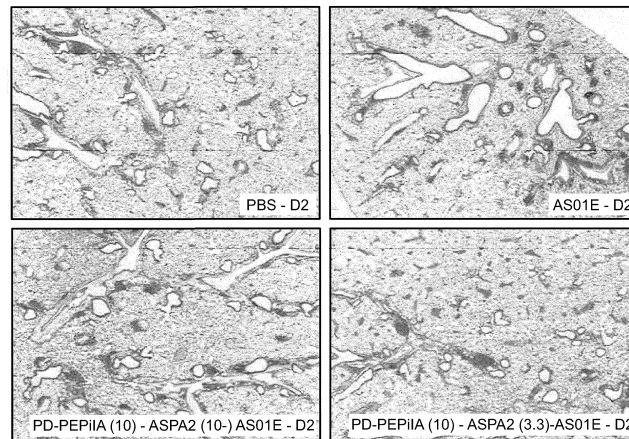
Фиг. 24

ЭФФЕКТ ТЕТРАВАЛЕНТНОГО ВАКЦИННОГО СОСТАВА PD/PEPIA/UspA2/AS01E НА ЛЕГКИЕ МЫШИ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ИНАКТИВИРОВАННЫМ НАГРЕВАНИЕМ M. cat. - ПЕРИВАСКУЛИТ И ПЕРИБРОНХИОЛИТ У ИММУНИЗИРОВАННЫХ PBS МЫШЕЙ



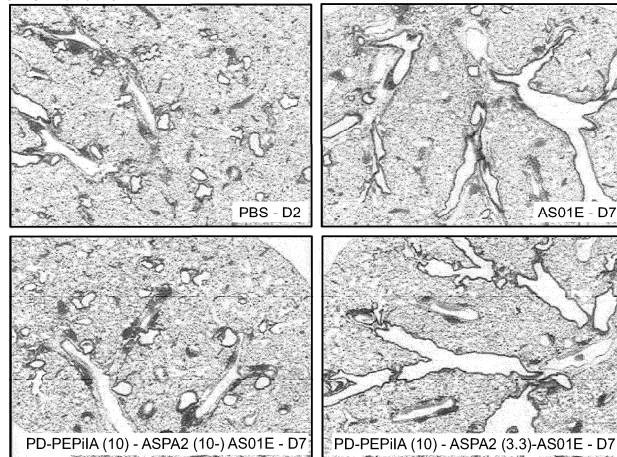
Фиг. 25

ЭФФЕКТ ТЕТРАВАЛЕНТНОГО ВАКЦИННОГО СОСТАВА PD/PEPIA/UspA2/AS01E НА ЛЕГКИЕ МЫШИ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ИНАКТИВИРОВАННЫМ НАГРЕВАНИЕМ M. cat. - СУТКИ 2 ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ



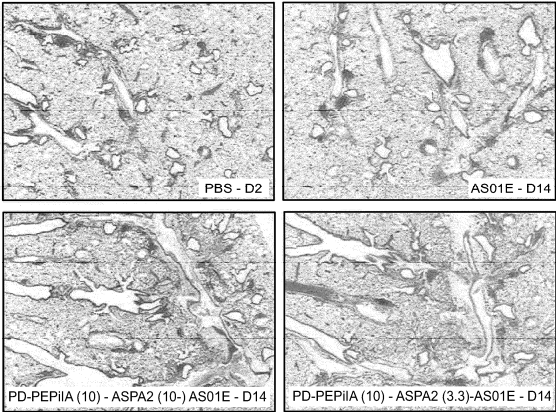
Фиг. 26

ЭФФЕКТ ТЕТРАВАЛЕНТНОГО ВАКЦИННОГО СОСТАВА PD/PEPIA/UspA2/AS01E НА ЛЕГКИЕ МЫШИ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ИНАКТИВИРОВАННЫМ НАГРЕВАНИЕМ M. cat. - СУТКИ 7 ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ



Фиг. 27

ЭФФЕКТ ТЕТРАВАЛЕНТНОГО ВАКЦИННОГО СОСТАВА PD/PEPIIA/UsrA2/AS01E НА ЛЕГКИЕ МЫШИ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ИНАКТИВИРОВАННЫМ НАГРЕВАНИЕМ M. cat. - СУТКИ 14 ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ



Фиг. 28

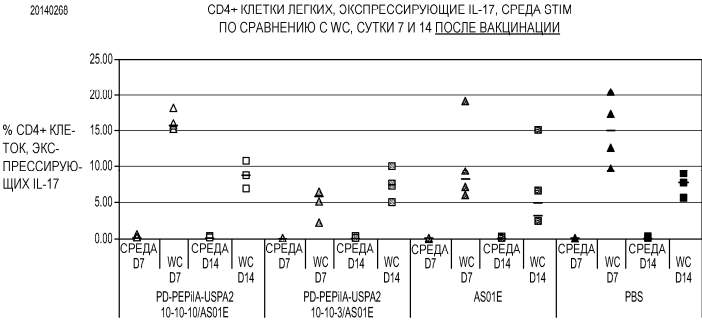
ЭФФЕКТ ТЕТРАВАЛЕНТНОГО ВАКЦИННОГО СОСТАВА PD/PEPIIA/UsrA2/AS01E НА ЛЕГКИЕ МЫШИ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ИНАКТИВИРОВАННЫМ НАГРЕВАНИЕМ M. cat. - ПОДРОБНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

		ПЕРИВАСКУЛИТ/ПЕРИБРОНХИОЛИТ				
		AN. #	1	2	3	4
D2	PBS		3 F L+M	3 D L+M	3 D L+M	3 D L+M
	PD-PE-PIIA- USPA2 (10)		2 D L+M	2-3 D L+M	3 D L+M	2-3 D L+M
	PD-PE-PIIA- USPA2 (3.3)		2-3 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M	3 D L+M
	AS01E-3		3 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M	2 D L+M
D7	PD-PE-PIIA- USPA2 (10)		2-3 D L+M	3 D L+M	3 D L+M	2-3 D L+M
	PD-PE-PIIA- USPA2 (3.3)		3 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M
	AS01E-3		3 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M
	PD-PE-PIIA- USPA2 (10)		2 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M	A
D14	PD-PE-PIIA- USPA2 (3.3)		2-3 D L+M	2 D L+M	2-3 D L+M	A
	AS01E-3		2 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M	2 D L+M
	PD-PE-PIIA- USPA2 (10)		2 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M	A
	AS01E-3		2 D L+M	2-3 D L+M	2-3 D L+M	2 D L+M

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ:
• В ПЕРВОЙ СТРОКЕ В КАЖДОЙ ЯЧЕЙКЕ ДАНА ИНФОРМАЦИЯ О ТЯЖЕСТИ ВОСПАЛЕНИЯ: А-ОТСУТСТВУЕТ; 1-МИНИМАЛЬНОЕ; 2-СЛАБОЕ; 3-УМЕРЕННОЕ; 4-ЗНАЧИТЕЛЬНОЕ; 5-ТЯЖЕЛОЕ, И РАСПРОСТРАНЕНИИ ИЗМЕНЕНИЙ: F-ОЧАГОВОЕ; M-МНОГООЧАГОВОЕ; D-ДИФфуЗНОЕ
• ВТОРАЯ СТРОКА ОТНОСИТСЯ К ПРИРОДЕ НАБЛЮДАЕМЫХ КЛЕТОК: L-ЛИМФОЦИТЫ; M-МАКРОФАГИ

Фиг. 29

ОТВЕТЫ CD4 Т-КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПОСЛЕ ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ WC M. cat. КЛЕТКИ CD4 ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IL17. ПОВТОРНО СТИМУЛИРОВАНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ НАГРЕВАНИЕМ ЦЕЛЫМИ КЛЕТКАМИ (WC) M. cat ИЛИ СРЕДОЙ

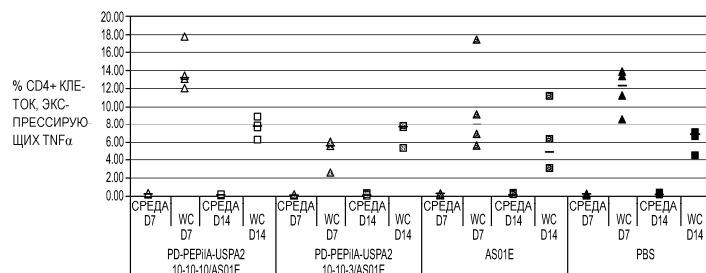


Фиг. 30

ОТВЕТЫ CD4 T-КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПОСЛЕ ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ WC M. cat. КЛЕТКИ CD4 ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ TNF α . ПОВТОРНО СТИМУЛИРОВАНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ НАГРЕВАНИЕМ ЦЕЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ (WC) M. cat. ИЛИ СРЕДОЙ

20140268

CD4+ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ TNF α , СРЕДА STIM ПО СРАВНЕНИЮ С WC, СУТКИ 7 И 14 ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ

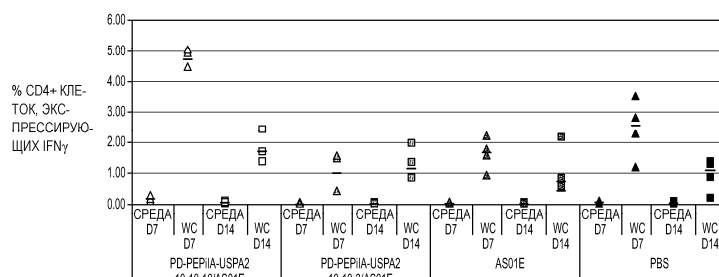


Фиг. 31

ОТВЕТЫ CD4 T-КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПОСЛЕ ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ WC M. cat. КЛЕТКИ CD4 ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IFN γ . ПОВТОРНО СТИМУЛИРОВАНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ НАГРЕВАНИЕМ ЦЕЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ (WC) M. cat. ИЛИ СРЕДОЙ

20140268

CD4+ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IFN γ , СРЕДА STIM ПО СРАВНЕНИЮ С WC, СУТКИ 7 И 14 ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ

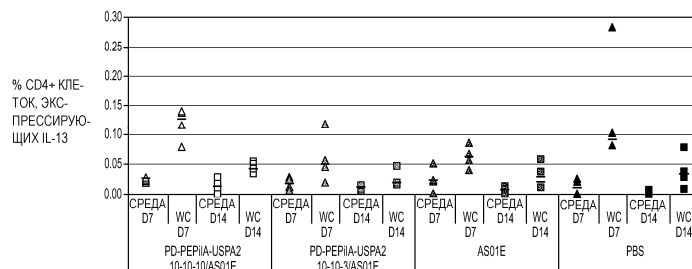


Фиг. 32

ОТВЕТЫ CD4 T-КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПОСЛЕ ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ WC M. cat. КЛЕТКИ CD4 ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IL-13. ПОВТОРНО СТИМУЛИРОВАНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ НАГРЕВАНИЕМ ЦЕЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ (WC) M. cat. ИЛИ СРЕДОЙ

20140268

CD4+ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IL-13, СРЕДА STIM ПО СРАВНЕНИЮ С WC, СУТКИ 7 И 14 ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ

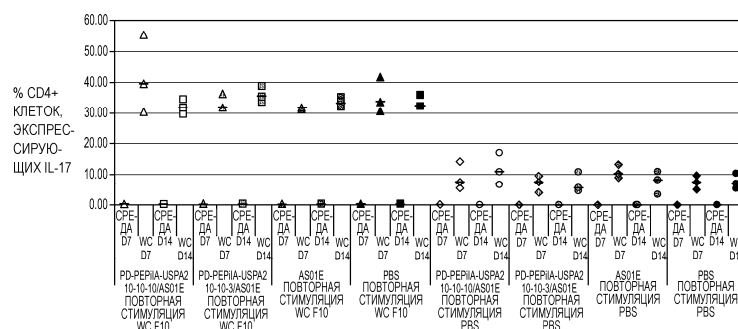


Фиг. 33

ОТВЕТЫ CD4 T-КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ ПРИ ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ WC M. cat. КЛЕТКИ CD4 ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IL-17. ПОВТОРНО СТИМУЛИРОВАНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ НАГРЕВАНИЕМ ЦЕЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ (WC) M. cat. ИЛИ СРЕДОЙ

20140416

CD4+ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IL-17, СРЕДА STIM ПО СРАВНЕНИЮ С WC, СУТКИ 7 И 14 ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ



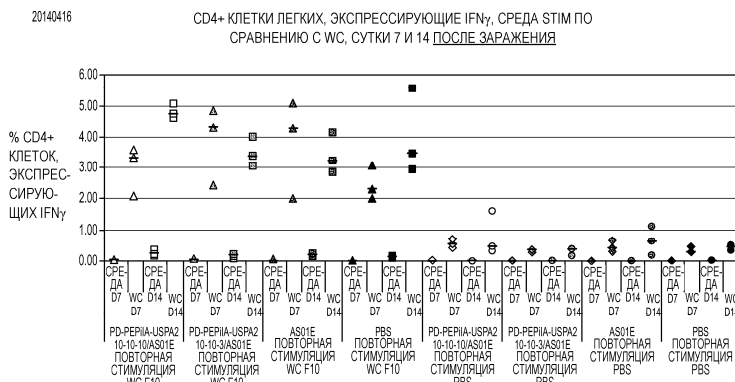
Фиг. 34

ОТВЕТЫ CD4 T-КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ ПРИ ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ WC M. cat. КЛЕТКИ CD4 ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ TNF α . ПОВТОРНО СТИМУЛИРОВАНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ НАГРЕВАНИЕМ ЦЕЛЫМИ КЛЕТКАМИ (WC) M. cat. ИЛИ СРЕДОЙ



Фиг. 35

ОТВЕТЫ CD4 T-КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ ПРИ ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ WC M. cat. КЛЕТКИ CD4 ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IFN γ . ПОВТОРНО СТИМУЛИРОВАНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ НАГРЕВАНИЕМ ЦЕЛЫМИ КЛЕТКАМИ (WC) M. cat. ИЛИ СРЕДОЙ



Фиг. 36

ОТВЕТЫ CD4 T-КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ ПРИ ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ WC M. cat. КЛЕТКИ CD4 ЛЕГКИХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ IL-13. ПОВТОРНО СТИМУЛИРОВАНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ НАГРЕВАНИЕМ ЦЕЛЫМИ КЛЕТКАМИ (WC) M. cat. ИЛИ СРЕДОЙ



Фиг. 37



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2