



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.04

(21) Номер заявки
201691140

(22) Дата подачи заявки
2014.12.01

(51) Int. Cl. C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
C07K 14/285 (2006.01)

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И ВАКЦИНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ РЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ

(31) 61/910,817; 62/007,068

(32) 2013.12.02; 2014.06.03

(33) US

(43) 2017.02.28

(86) PCT/CA2014/051146

(87) WO 2015/081430 2015.06.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНЖИНИРЕД АНТИДЖЕНЗ ИНК.
(CA)

(72) Изобретатель:
Шрайверс Энтони Б., Морэс
Тревор Ф., Грей-Оуин Скотт (CA)

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н. (RU)

(56) NOINAJ, N., et al., "The transferrin-iron import system from pathogenic Neisseria species", Mol. Microbiol., Vol. 86, No. 2, Pages 246-257, 7 September 2012 (07-09-2012), ISSN: 1365-2958 *abstract; page 247, right col.; page 248, right col.; page 250; page 251, left col.; page 254, left col.*

NOINAJ, N., et al., "Structural basis for iron piracy by pathogenic Neisseria", Nature, Vol. 483, Pages 53-58, 1 March 2012 (01-03-2012), ISSN: 0028-0836 *page 53, left col.; page 55, right col.; page 56, right col.; Fig. 3a*

BOULTON, I.C., et al., "Identification of discrete domains within gonococcal transferrin-binding protein A that are necessary for ligand binding and iron uptake functions", Infect. Immun., Vol. 68, No. 12, Pages 6988-6996, Dec. 2000 (12-2000), ISSN: 0019-9567 *page 6989, left col.; page 6990, right col.; page 6994, right col.; page 6995, right col.*

CALMETTES, C., et al., "The structural basis of transferrin sequestration by transferrin-binding protein B", Nature Structural & Molecular Biology, Vol. 19, No. 3, Pages 358-360, March 2012 (03-2012), ISSN: 1545-9993 *abstract; page 358; page 359, right col.; Fig. 1c*

SIMS, K.L., et al., "Peptide-peptide interactions between human transferrin and transferrin-binding protein B from Moraxella catarrhalis", J. Bacteriol., Vol. 185, No. 8, Pages 2603-2610, April 2003 (04-2003), ISSN: 0021-9193 *page 2604, left col.; pages 2605-2609; Tables 1 and 2; Fig. 2*

PETTERSSON, A., et al., "Vaccine potential of the Neisseria meningitidis lactoferrin-binding proteins LbpA and LbpB", Vaccine, Vol. 24, Pages 3545-3557, 2006, ISSN:0254-410X *abstract; page 3555; Fig. 2; Table 2*

LING, J.M.L., et al., "Delineating the regions of human transferrin involved in interactions with transferrin binding protein B from Neisseria meningitidis", Mol. Microbiol., Vol. 77, No. 5, Pages 1301-1314, 2010, ISSN: 1365-2958 *whole document*

(57) В изобретении предложены иммуногенные композиции, содержащие полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НИБР (host iron binding protein, железосвязывающий белок хозяина), получаемый или полученный из грамтрицательного вида бактерий. Рецепторные белки поверхности к НИБР были модифицированы таким образом, что данные белки не способны связываться с железосвязывающим белком хозяина. Также предложены способы получения и применения данных иммуногенных композиций для получения вакцин для животных и человека.

Ссылка на родственные заявки

Данная заявка по договору о патентной кооперации испрашивает приоритет согласно разделу 35 § 119(e) Свода федеральных нормативных документов США на основании предварительной заявки на патент США № 61/910817, поданной 2 декабря 2013 г., и предварительной заявки на патент США № 62/007068, поданной 3 июня 2014 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям и вакцинам, а также к способам их получения и оценки. Более конкретно настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, полученным из рецепторных белков поверхности бактерий, и к вакцинам против грамотрицательных бактериальных организмов, включая, но не ограничиваясь указанными, бактериальные организмы, относящиеся к семействам бактерий Pasteurellaceae, Neisseriaceae и Moraxellaceae.

Уровень техники

Следующие абзацы предназначены для введения читателя в более подробное описание, которое приведено ниже, а не для определения или ограничения заявляемого объекта настоящего изобретения.

Вакцины, способные опосредовать эффективный иммунный ответ, имеют важное значение в стратегиях здравоохранения, направленных на борьбу с заболеваниями, вызванными микробиологическими патогенами. Две основные стратегии индукции эффективного иммунного ответа у хозяина включают введение субъекту (хозяину) "живого" агента, способного реплицироваться в хозяине, или введение материалов или веществ, которые не способны реплицироваться в хозяине. Введение живой вакцины может представлять собой риск с точки зрения безопасности для индивидуумов с ослабленным иммунитетом, если агент или инфицирующий организм реплицируется и оказывает нежелательное действие на иммунизированного субъекта. Данные риски не свойственны вакцинам на основе убитых целых патогенов, на основе экстрактов из патогенов или на основе очищенных компонентов, которые принято называть субъединичными вакцинами. Применение субъединичных вакцин позволяет избежать проблем с безопасностью, присущих живым вакцинам, но очищенные компоненты сами по себе могут не оказывать на субъект желаемый защитный эффект против инфекционного микробиологического организма и для усиления иммунного ответа требуют добавления соответствующих компонентов, называемых адъювантами.

Подходы к разработке вакцин против грамотрицательных бактериальных организмов обычно сфокусированы на применении белков, которые в природе связаны с внешней мембраной бактерий и экспонированы на поверхности бактериальных клеток. В особенности привлекательными мишенями при вакцинации являются белки, которые, как предполагают, являются важными для выживания в хозяине, поскольку такие белки не могут быть утрачены или существенно изменены во избежание иммунного ответа хозяина. В связи с этим рецепторные белки поверхности бактерий, способные к взаимодействию и связыванию с белками хозяина, связывающими железо, трансферрином и лактоферрином, в течение некоторого времени считались подходящими компонентами для применения при получении вакцин (1-3). Данная группа рецепторных белков поверхности, именуемых в дальнейшем рецепторные белки поверхности к "НІВР" (host iron binding protein, железосвязывающему белку хозяина), присутствует в патогенах человека и животных, относящихся к семействам бактерий Pasteurellaceae, Moraxellaceae и Neisseriaceae (4). Таким образом, данные белки были признаны потенциальными мишенями для разработки вакцин против множества различных патогенов человека и животных, используемых для получения продуктов питания (5) (6-10).

Рецепторы поверхности к НІВР в норме состоят из двух белков: липопroteина поверхности - трансферринсвязывающего белка В (transferrin binding protein В, TbpВ) или лактоферринсвязывающего белка В (lactoferrin binding protein В, LbpВ), и TonВ-зависимого интегрального белка мембраны - трансферринсвязывающего белка А (TbpА) или лактоферринсвязывающего белка А (LbpА) (11). Недавно с высоким разрешением были определены подробные трехмерные структуры TbpВ из *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* и *Neisseria meningitidis* (12-14). Внутренние свойства белков TbpВ или LbpВ совершенно отличаются от свойств интегральных белков внешней мембраны, TbpА и LbpА, и существенно влияют на стратегии, которые используют для разработки вакцин. Например, из цитоплазмы *E. coli* можно получить и очистить TbpВ или LbpВ с относительно высоким выходом для получения субъединичных вакцин. Однако данные белки полностью отсутствуют или присутствуют в недостаточных количествах в вакцинах на основе везикул внешней мембраны (outer membrane vesicle, OMV), которые получают посредством селективной экстракции детергентом, в связи с удалением данных белков во время процесса экстракции. Напротив, функциональный TbpА или LbpА может быть получен только во внешней мембране, что налагает ограничения на получение высоких выходов очищенных белков, предназначенных для субъединичных вакцин. Альтернативный подход получения белков с нарушенным фолдингом, которые агрегируют в большие тельца включения, и, как следствие, попытка рефолдинга белка из обогащенных препаратов тельц включения, также является проблематичным для коммерческого получения. Большинство стратегий получения вакцин на основе TbpА или LbpА будут, как правило, включать образование OMV или разработку аттенуированных штаммов.

Альтернативный подход, который успешно использовали в случае инвазивных бактериальных па-

тогенов, заключается в использовании в качестве первичного антигена внеклеточного капсульного полисахарида и в слиянии последнего с белком-носителем для стимуляции Т-клеток хелперов. Было доказано, что данные конъюгированные капсульные вакцины являются высокоэффективными для обеспечения защиты от инфекции, вызванной штаммами, экспрессирующими специфичный капсульный полисахарид, но не обеспечивают перекрестной защиты против других типов капсул. Несмотря на то, что конъюгированные капсульные вакцины против патогенов человека *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *Streptococcus pneumoniae* были изначально разработаны для предотвращения инвазивной инфекции, пострегистрационные исследования переноса продемонстрировали, что системное введение данных вакцин препятствовало колонизации патогенами, экспрессирующими специфичные полисахариды-мишени (15-17). Данный факт свидетельствует о дополнительной пользе, которая заключается в предоставлении популяционного иммунитета, обеспечивающего защиту неиммунизированных индивидуумов благодаря уменьшенной частоте переноса в пределах популяции. Потенциал обеспечения популяционного иммунитета стал важным критерием оценки новых и разрабатываемых бактериальных вакцин, хотя данный фактор не являлся изначальной целью при разработке данных ранних вакцин. Однако определение или прогнозирование того, будут ли новые вакцины способны влиять на колонизацию (перенос) или предотвращать ее, является серьезной проблемой (18).

Способность оценить то, будут ли белковые антигены в конечном итоге способны обеспечить широкий диапазон защиты от разнообразного множества изолятов заболевания, также является значительной проблемой (19). Первоначальные попытки исследования данной способности обычно включают иммунизацию других видов животных (мышей, кроликов) с последующим анализом перекрестно-реактивных и перекрестно-защитных свойств полученной в результате сыворотки. Для тех антигенов поверхности, которые можно легко получить в растворимой форме, таких как липопротеины поверхности, первым этапом часто является получение и очистка ряда белков-вариантов и их использование в стандартном анализе методом ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, твердофазный иммуноферментный анализ) для оценки способности антисыворотки распознавать белки-варианты. Такая достаточно высокая трудоемкость делает анализ большого набора вариантов дорогостоящим предприятием; кроме того, данный анализ основывается на предположении, что связывание антигена с планшетом ELISA является случайным и позволяет исследовать все поверхности белков.

Принимая во внимание ограничения различных вариантов анализа, которые используют для оценки и предсказания перекрестно-защитных и перекрестно-реактивных свойств антисыворотки, наработанной против антигенов, выбор и разработку новых и улучшенных вакцин на основе белков следует осуществлять в сочетании с разработкой улучшенных вариантов анализа так, чтобы оптимизации и усовершенствования вакцин, находящихся на стадии разработки, можно было достичь на рациональной основе.

Несмотря на значительные усилия, прилагаемые в течение нескольких лет после открытия рецепторных белков поверхности к НВР (20, 21), остается непонятным, можно ли использовать данные белки для получения эффективных вакцин против грамотрицательных бактериальных патогенов и, если да, то как. И, в частности, можно ли разработать вакцину с широким диапазоном защиты и, если да, то как. Таким образом, в данной области техники существует потребность в улучшении иммуногенных композиций и вакцин на основе рецепторных белков поверхности к НВР против грамотрицательных бактериальных организмов.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены новые иммуногенные композиции и, в частности, иммуногенные композиции на основе рецепторных белков поверхности к НВР из грамотрицательного патогенного вида бактерий.

Соответственно по меньшей мере в одном варианте реализации настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая антиген, полученный из рецепторного белка поверхности к НВР из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем указанный белок, полученный из рецепторного белка поверхности к НВР, был модифицирован таким образом, что он, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

По меньшей мере в одном варианте реализации настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая полипептид, который содержит домен С-доли (C-lobe domain) или домен N-доли (N-lobe domain) рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Согласно предпочтительным вариантам реализации в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая домен С-доли рецепторного полипептида поверхности к НВР, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая смесь по меньшей мере двух полипептидов, каждый из которых содержит домен С-доли, причем домены С-доли являются получаемыми или полученными по меньшей мере из двух грамотрицательных видов бактерий или по меньшей мере из двух грамотрицательных штаммов бактерий. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения домены С-доли получены из рецепторных белков поверхности к

НВР, которые являются антигенно различными.

Согласно следующим вариантам реализации в настоящем изобретении также предложена иммуногенная композиция, содержащая полипептид, который содержит домен N-доли и/или домен С-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из граммотрицательного патогенного вида бактерий, причем домен N-доли или домен С-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов домена N-доли или домена С-доли был модифицирован, и причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения модификация включает модификацию по меньшей мере одного остатка аминокислоты в пределах петлевого домена.

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере два петлевых домена из множества петлевых доменов в пределах домена С-доли и/или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР были модифицированы.

Согласно следующим вариантам реализации в настоящем изобретении предложены (i) первый полипептид, содержащий домен N-доли или домен С-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из граммотрицательного патогенного вида бактерий, причем домен N-доли или домен С-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов домена N-доли или домена С-доли был модифицирован, соединенный со (ii) вторым полипептидом, содержащим рецепторный белок поверхности к НВР или его участок, получаемый из граммотрицательного вида бактерий, и причем присоединенный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения участок белка поверхности к НВР представляет собой домен N-доли или домен С-доли. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения участок белка поверхности к НВР представляет собой домен N-доли или домен С-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из граммотрицательного патогенного вида бактерий, причем домен N-доли или домен С-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов домена N-доли или домена С-доли был модифицирован.

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли представляет собой домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из вида бактерий, относящегося к семейству бактерий Pasteurellaceae, Moraxellaceae или Neisseriaceae, и согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли представляет собой домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НВР, получаемый или полученный из вида бактерий, относящегося к роду бактерий Actinobacillus, Neisseria, Haemophilus, Mannheimia, Histophilus, Pasteurella или Moraxella.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения рецепторный белок поверхности к НВР модифицирован таким образом, что N-концевой якорный полипептид рецепторного белка поверхности к НВР или его участок удален, и причем полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

Согласно другим аспектам в настоящем изобретении предложены способы получения иммуногенной композиции. Соответственно в настоящем изобретении предложен способ получения иммуногенной композиции, включающий:

(a) обеспечение последовательности химерной нуклеиновой кислоты, содержащей функционально связанные компоненты:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из граммотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина; и

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, способную контролировать экспрессию в рекомбинантной клетке-хозяине;

(b) введение последовательности химерной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин и выращивание клетки-хозяина для получения полипептида, содержащего домен С-доли или домен N-доли;

(c) восстановление полипептида, содержащего домен С-доли или домен N-доли, из клетки-хозяина;

и

(d) получение иммуногенной композиции.

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован.

Согласно следующим аспектам в настоящем изобретении предложены способы индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта. Соответственно в настоящем изобретении также предложен способ

индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту:

(а) иммуногена, содержащего полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина; или

(б) вектора экспрессии, который содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноген, содержащий полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий; причем иммуноген вводят или экспрессируют в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован.

Настоящее изобретение также охватывает иммуноген, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НВР, причем домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен был модифицирован, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также охватывает иммуноген, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецептора поверхности к НВР, который используют для предотвращения инфекции, например, посредством предотвращения колонизации, или для предотвращения заболевания, вызванного инфекционными грамотрицательными бактериями, включая бактерии, относящиеся к роду *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Histophilus*, *Pasteurella* или *Moraxella*. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован.

Настоящее изобретение также охватывает иммуноген, содержащий домен С-доли и/или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НВР, для применения при производстве лекарственного средства для предотвращения инфекции или заболевания, вызванных инфекционными грамотрицательными бактериями, включая бактерии, относящиеся к роду *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Histophilus*, *Pasteurella* или *Moraxella*. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован.

Иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению можно применять для получения вакцины. Соответственно в настоящем изобретении также предложена вакцинная композиция, содержащая антиген, полученный из рецепторного белка поверхности к НВР из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем белок, полученный из рецепторного белка поверхности к НВР, был модифицирован таким образом, что он, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретение также дополнительно охватывает вакцинную композицию, содержащую полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем указанный полипептид по существу не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения вакцинная композиция содержит полипептид, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НВР, причем домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен был модифицирован, и причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

В настоящем изобретении также предложены способы введения вакцины позвоночному субъекту, причем указанный способ включает введение субъекту вакцины, содержащей полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем вакцину вводят в количестве, достаточном для предотвращения или лечения заболевания, вызванного грамотрицательным видом бактерий.

Настоящее изобретение также охватывает вакцины, содержащие домен С-доли или домен N-доли рецептора поверхности к НВР, для применения при предотвращении инфекции или заболевания, вызванных инфекционными грамотрицательными бактериями, включая бактерии, относящиеся к роду *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Histophilus*, *Pasteurella* или *Moraxella*.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и по меньшей

мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован.

Другие свойства и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Следует понимать, однако, что подробное описание, хотя и указывает на предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, приведено исключительно в качестве иллюстрации, поскольку, исходя из подробного описания, специалистам в данной области техники станут очевидными различные изменения и модификации в пределах духа и объема настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

Настоящее изобретение описано ниже применительно к прилагаемым фигурам. Фигуры, приведенные в настоящей заявке, предложены с целью иллюстрации и не призваны ограничить настоящее изобретение.

На фиг. 1 представлено выравнивание полипептидных последовательностей нескольких TbpV, а именно TbpV ApH49 (SEQ ID NO: 2), TbpV *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApH87 (SEQ ID NO: 12) и TbpV AsH57 (SEQ ID NO: 28), из TbpV патогенов свиней, а также структурные модели данных белков (pdb 3HOL, 3PQS и 3PQU соответственно). Данные три белка дают хорошее представление о разнообразии последовательностей среди TbpV из патогенов свиней (фиг. 4, большие черные стрелки). В верхней части представлено выравнивание полипептидных последовательностей, в нижней части представлены структурные модели. В выравнивании последовательностей доменные структуры разграничены затенением фона и соответствующим образом подписаны. Также представлены элементы вторичной структуры, а номенклатура и нумерация β -слоев (" β 1"-" β 31") и петель ("L1"- β "L32") приведена непосредственно над выровненными последовательностями. На данной фигуре отмечены подобласти петли 8 (8a; 8b; и 8c) в связи с большим размером петли 8, различиями между вариантами TbpV и элементами вторичной структуры в некоторых вариантах петель. Также показаны области "кэпа" (cap) C-доли и N-доли, обозначенные "Область кэпа C-доли" и "Область кэпа N-доли" соответственно, и области "ручки" (handle) C-доли и N-доли, обозначенные как области "Ручки C-доли" и "Ручки N-доли" соответственно. Структурные модели трех TbpV из выравнивания в верхней части чертежа представлены в нижней части чертежа; отмечены домены третьей структурной модели (TbpV AsH57), которая представлена в идентичной ориентации с другими двумя моделями.

На фиг. 2 представлен схематичный чертеж определенных вторичных структурных свойств аминокислотной последовательности полипептида TbpV с номенклатурой, рекомендованной для данного класса белков. N- и C-конец полипептида показаны и подписаны "N" и "C" соответственно. β -слои показаны стрелками и последовательно подписаны, начиная от N-конца, от " β 1" до " β 31". Петлевые домены показаны и подписаны от "L1" до "L32". Последовательности петель полипептида TbpV из TbpV штамма H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 2) включены в настоящую заявку на патент (SEQ ID NO: 41 - SEQ ID NO: 106). Также показаны области "кэпа" C-доли и N-доли, подписанные "Область кэпа C-доли" и "Область кэпа N доли" соответственно; области ручки C-доли и ручки N-доли подписаны как "Ручка C-доли" и "Ручка N-доли".

На фиг. 3А представлено сравнение магнитуды ответа антител против интактного белка TbpV из патогена человека *Neisseria meningitidis* (штамм B16B6 -SEQ ID NO: 117) или интактного TbpV из патогена свиньи *Actinobacillus pleuropneumoniae* (штамм H49 - SEQ ID NO: 2) в различных видах-хозяевах (мышьях, кроликах или свиньях) с применением в качестве адъюванта 33% Emulsigen D. Титр антител против TbpV из *Actinobacillus pleuropneumoniae* (серый столбец) незначительно выше у мышей и кроликов, чем титр антител против TbpV из *Neisseria meningitidis* (черный столбец), но существенно ниже у свиней. Данные результаты означают, что связывание трансферрина хозяина может оказывать влияние на развитие ответа антител.

На фиг. 3В представлено сравнение магнитуды ответа антител у свиней против интактного TbpV из патогена быка *Mannheimia haemolytica* (штамм H196 -SEQ ID NO: 206) или интактного TbpV (SEQ ID NO: 2), N-доли TbpV (SEQ ID NO: 8) или C-доли TbpV (SEQ ID NO: 6) из патогена свиньи *Actinobacillus pleuropneumoniae* (штамм H49). Группы столбцов представляют образцы сыворотки, отобранные у отдельных иммунизированных свиней в день 0 (перед первой иммунизацией), в день 21 (после первой иммунизации), в день 42 (после второй иммунизации) и в день 56 (после третьей иммунизации). Сыворотку, полученную от свиньи, иммунизированной интактным TbpV из *M. haemolytica* (интактный Mh; штамм H196 - SEQ ID NO: 206), исследовали с интактным TbpV *M. haemolytica*, присоединенным к планшету для ELISA. Сыворотку, полученную от свиней, иммунизированных TbpV *A. pleuropneumoniae* (интактный Ap), N-долей TbpV (N-доля Ap) или C-долей TbpV (C-доля Ap), анализировали с интактным TbpV *A. pleuropneumoniae*, присоединенным к планшету для ELISA.

На фиг. 3С представлено сравнение перекрестной реактивности антисыворотки против полипептидного домена C-доли TbpV (SEQ ID NO: 6), полипептидного домена N-доли TbpV (SEQ ID NO: 8) и интактного TbpV (SEQ ID NO: 2) из патогена свиньи *Actinobacillus pleuropneumoniae* (штамм H49). Группа столбцов представляет реактивность сыворотки против интактного TbpV из трех различных патогенов свиней: штамма H49 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 2, черный столбец), штамма HP5 *Haemophilus parasuis* (SEQ ID NO: 115, темно-серый столбец) и штамма H87 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

(SEQ ID NO: 12, светло-серый столбец), которые были выбраны для представления антигенно разнообразных TbpB (фиг. 4). Результаты иллюстрируют реактивность сыворотки, иммунизированной интактным TbpB (первая группа слева, подписанная "Интактный"), N-долей TbpB (вторая группа слева, подписанная "N-доля"), C-долей TbpB (третья группа слева, подписанная "C-доля") или смесью N-доли и C-доли (четвертая группа слева, подписанная "N+C доли"). Приведены планки погрешностей стандартной ошибки среднего (СОС). Статистическую обработку проводили с применением дисперсионного анализа ANOVA с критерием Тьюки HSD (honest significant difference, истинное статистически значимое различие), который проводили апостериорно. Звездочки на фигуре означают специфичные пары иммунизация/белок, значительно отличающиеся от C-доли или N+C-долей, которые исследовали против H49.

На фиг. 4 представлено разнообразие последовательностей TbpB из патогенов свиней *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *A. suis* и *Haemophilus parasuis*, выделенных из свиней в Северной Америке, Европе и Азии. Наиболее правдоподобное филогенетическое дерево демонстрирует связь между 56 TbpB на основании последовательностей из собственной коллекции клинических штаммов или последовательностей, полученных из общедоступных баз данных. Последовательности TbpB разделены на 3 основные группы, типичные изоляты отмечены стрелками (SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 107-SEQ ID NO: 115). Штаммы, экспрессирующие варианты TbpB, которые использовали в анализе ELISA, результаты которого представлены на фиг. 3, отмечены большими черными звездочками: штамм H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 12), штамм H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 2) и штамм HP5 *H. parasuis* (SEQ ID NO: 115). Большие черные стрелки отмечают три TbpB, которые использовали в выравнивании, продемонстрированном на фиг. 1: штамм H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 12), штамм H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 2) и штамм H57 *A. suis* (SEQ ID NO: 28).

На фиг. 5 представлено неслучайное связывание N-доли TbpB (SEQ ID NO: 8) из H49 *A. pleuropneumoniae* с планшетами для ELISA, о котором свидетельствует существенное уменьшение связывания меченого трансферрина, когда для сенсibilизации планшета для ELISA использовали очищенный белок TbpB вместо предшественника слитого белка (т.е. мальтозасвязывающего белка (maltose binding protein, Mbp), слитого с N-долей TbpB) (левая часть чертежа А и чертежа В). Фигура также иллюстрирует, как применение N-концевого биотинилированного пептида преодолевает случайное связывание (правая часть чертежа А и чертежа В). В левой части чертежа А представлены результаты анализа с применением меченого трансферрина (Tf) для измерения связывания очищенных Mbp-N-доли TbpB или N-доли TbpB с обычными планшетами для ELISA. В правой части представлены результаты, полученные с применением рекомбинантных белков, содержащих биотинилированную N-концевую пептидную метку, которую использовали для присоединения к сенсibilизированным стрептавидином планшетами для ELISA. Чертеж В представляет собой рисунок, иллюстрирующий события, которые, как полагают, происходят в различных лунках ELISA, для соответствующих результатов, представленных непосредственно выше на чертеже А. *** указывает на статистический уровень значимости $p < 0,001$ между Mbp-N-доли и N-долей, ns - незначимо статистически.

На фиг. 6 представлены конструкция и получение мультимера, содержащего C-долю TbpB из трех различных патогенов свиней. На чертеже А представлены последовательность ДНК и белка тримера (SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40) C-долей из штамма H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 6), штамма H57 *A. suis* (SEQ ID NO: 35) и штамма H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 22) в указанном порядке. Подписи, приведенные внизу, представляют пептидную последовательность, соединяющую отдельные C-доли или предшествующую первой C-доле. На чертеже В представлены результаты анализа методом ДСН-ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) препарата тримера C-доли по сравнению с препаратами N-доли и C-доли из штамма M982 *N. meningitidis*. 1 мкл образца наносили на дорожки 1, 4 и 7; 5 мкл образца наносили на дорожки 2, 5 и 8 и 10 мкл образца наносили на дорожки 3, 6 и 9. Белки-стандарты молекулярной массы (СММ), представленные на данных гелях, составляли 93, 70, 63, 41, 30 и 22 кДа.

На фиг. 7 представлен иммунный ответ против C-доли TbpB из *A. pleuropneumoniae* (C-доля H49, SEQ ID NO: 6) по сравнению с иммунным ответом против тримера, содержащего C-доли из C-долей TbpB из H49 *A. pleuropneumoniae*, H57 *A. suis* и H87 *A. pleuropneumoniae* (тример C-долей, SEQ ID NO: 40). Группа столбцов в левой части фигуры представляет иммунный ответ против C-доли H49, группа столбцов в правой части фигуры представляет иммунный ответ против тримера C-долей. Черный столбец представляет иммунный ответ против TbpB из штамма H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 2), темно-серый столбец представляет иммунный ответ против TbpB из штамма HP5 *H. parasuis* (SEQ ID NO: 115) и светло-серый столбец представляет иммунный ответ против TbpB из штамма H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 22).

На фиг. 8 представлены петлевые области N-доли TbpB штамма H49 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (помечены "петля 1", SEQ ID NO: 42, "петля 5", SEQ ID NO: 50, "петля 8a" и "петля 8c", SEQ ID NO: 55, и "петля 12", SEQ ID NO: 63, соответственно), намеченные для уменьшения петли, и последовательности исходных и модифицированных петель. Петля 8a и петля 8c означают участки петли 8, присутствующие в TbpB из штамма H49. Чертеж А представляет собой структурную модель N-доли TbpB *Actinobacillus pleuropneumoniae*, вид сбоку (относительно прогнозируемой преобладающей ориентации на по-

верхности клетки); показаны намеченные области. Чертеж В представляет собой ту же структурную модель, вид сверху, для иллюстрации взаимодействия петель 1 и 5 с доменом "ручки" и петель 8а, 8с и 12, взаимодействующих с доменом бочки. Чертеж С представляет собой выравнивание нативных TbpB и TbpB с уменьшениями в намеченных петлевых областях. Области последовательности, кодирующие петли, выделены серым цветом и отмечены номерами петель.

На фиг. 9 продемонстрировано, что сконструированное уменьшение петли N-долей TbpB из штамма H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 10), штамма H57 *A. suis* (SEQ ID NO: 38) и штамма H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 26) не оказывает нежелательного эффекта на их продукцию или стабильность, но устраняет связывание с Tf свиней. На верхнем чертеже продемонстрировано получение интактного TbpB H49 (SEQ ID NO: 2), нативной N-доли TbpB h49 (SEQ ID NO: 8) и сконструированных N-долей TbpB из штамма H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 10), штамма H57 *A. suis* (SEQ ID NO: 38) или штамма H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 26). Указанные белки экспрессировали в виде слитых белков с N-концевым мальтозасвязывающим белком с полигистидиновой меткой и захватывали на смоле Ni-NTA (никель-нитрилацетоацетат). Связавшиеся белки высвобождали в буфере для ДСН-ПААГ и анализировали на 10% геле для ДСН-ПААГ. На среднем чертеже представлены те же препараты, захваченные на аффинной смоле, состоящей из трансферрина свиньи (pTf), присоединенного к сефарозе (pTf-Сефароза), и элюированные в буфере для ДСН-ПААГ. На нижнем чертеже представлены результаты дот-анализа материала из верхнего чертежа, элюированного с Ni-NTA смолы и нанесенного на нитроцеллюлозную смолу, который блокировали и подвергали воздействию трансферрина свиньи, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ-pTf), в блокирующем растворе, и связавшуюся ПХ обнаруживали посредством инкубации в субстрате ПХ.

На фиг. 10 представлено разнообразие последовательностей TbpB из патогена человека *Neisseria meningitidis*. На данной фигуре представлена подгруппа генов *tbpB*, секвенированных из коллекции более 100 штаммов, объединенная с обширной коллекцией последовательностей, представленных в общедоступной базе данных BIGSDB (<http://pubmlst.org/software/database/bigsgdb/> - Bacterial Isolate Genome Sequence Database, база данных геномных последовательностей изолятов бактерий). Коллекция последовательностей представляет собой всемирную коллекцию изолятов, собранную на протяжении длительного периода времени - почти 50 лет, и, следовательно, дает достаточно исчерпывающее представление об общем разнообразии TbpB. На фиг. 10А представлено разнообразие последовательностей интактных TbpB. Последовательности TbpB из штаммов, указанных стрелками, двойными стрелками или линиями, прилагаются (SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 124; SEQ ID NO: 132-SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 177 и SEQ ID NO: 178) для предоставления типичных последовательностей указанных определенных групп. В пределах данного дерева обнаружены две первичные клады, представленные группой 1 и группами 2-4, соответствующие изотипу I и изотипу II линий TbpB (22). Для первичных ветвей указаны результаты теста отношения правдоподобий, и знаком "*" отмечены ветви со 100%-ным результатом теста отношения правдоподобий. Антигены, полученные из TbpB из штамма B16B6 (SEQ ID NO: 117, черная стрелка), использовали для получения антисыворотки, результаты анализа которой представлены на фиг. 11, и проводили скрининг антисыворотки для определения реактивности против TbpB из штаммов, отмеченных серыми стрелками (SEQ ID NO: 123; и SEQ ID NO: 132-SEQ ID NO: 139), с применением анализа ELISA собственной разработки (фиг. 5). На фиг. 10В представлено разнообразие последовательностей C-долей TbpB, которые были получены из последовательностей TbpB. Последовательности C-долей TbpB из штаммов, отмеченных стрелками или линиями, прилагаются (SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125 и SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195) для предоставления типичных последовательностей. Два штамма, отмеченных двунаправленными стрелками, были включены для обеспечения более исчерпывающего представления о разнообразии C-доли, но не были доступны для анализа антисыворотки, результаты которого представлены на фиг. 11.

На фиг. 11 представлена реактивность антисыворотки, направленной против усеченного интактного TbpB (SEQ ID NO: 148, АК (аминокислоты) 43-575) и C-доли TbpB (SEQ ID NO: 119, АК 342-575), полученных из B16B6, типичного штамма изотипа I *N. meningitidis*. Антисыворотки исследовали в анализе ELISA собственной разработки (фиг. 5) против панели TbpB, которая иллюстрирует общее разнообразие последовательностей TbpB в *N. meningitidis* (стрелки, фиг. 10). Панель TbpB была получена из штаммов B16B6 (SEQ ID NO: 117), H44/76 (SEQ ID NO: 133), S3131 (SEQ ID NO: 132), M990 (SEQ ID NO: 134), M978 (SEQ ID NO: 135), M992 (SEQ ID NO: 138), P3006 (SEQ ID NO: 139), 120M (SEQ ID NO: 137), MC58 (SEQ ID NO: 136) и M982 (SEQ ID NO: 123) *N. meningitidis*. Результаты демонстрируют, что антисыворотка против C-доли характеризуется большими титрами, чем антисыворотка против всех TbpB, за исключением TbpB из B16B6 и H44/76.

На фиг. 12 представлены конструкция и получение димера, содержащего C-доли TbpB из двух различных штаммов патогена человека *Neisseria meningitidis* (SEQ ID NO: 118). На чертеже А представлена последовательность ДНК и белка для димера C-долей из штаммов B16B6 (SEQ ID NO: 118 и SEQ ID NO: 119) и M982 (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125) *N. meningitidis* в указанном порядке. В подписях внизу приведена последовательность ДНК пептидной области, соединяющей отдельные C-доли. На графике В представлены результаты анализа препарата димера C-доли методом ДСН-ПААГ по сравнению с препа-

ратами отдельных С-долей из штаммов M982 и B16B6 *N. meningitidis*.

На фиг. 13 представлен анализ иммунного ответа против димера, содержащего С-долю TbpB из двух различных штаммов патогена человека *Neisseria meningitidis* (SEQ ID NO: 150). Пары столбцов представляют сыворотку, полученную от кроликов, иммунизированных адьювантом самим по себе (наивные), С-долей B16B6 (SEQ ID NO: 119), С-долей M982 (SEQ ID NO: 125) или димером С-долей B16B6 и M982 (SEQ ID NO: 150), который представлен на фиг. 12. Белые столбцы представляют результаты нового анализа ELISA собственной разработки с иммобилизованным интактным TbpB M982 (SEQ ID NO: 123), черный столбец представляет результаты с иммобилизованным интактным белком B16B6 (SEQ ID NO: 117).

На фиг. 14 представлено уменьшение петлевых доменов С-доли полипептида TbpB M982 *N. meningitidis*. На чертеже А показаны структурные модели нативной С-доли (SEQ ID NO: 125) и модифицированной С-доли (SEQ ID NO: 129), чтобы продемонстрировать уменьшение четырех петель (L18, L21, L23 и L27). На модели слева (SEQ ID NO: 125) петли, намеченные для уменьшения, показаны черным пунктиром. На модели в центре (SEQ ID NO: 129) продемонстрированы модифицированные петлевые домены. На модели справа наложены две предыдущие структуры, чтобы продемонстрировать, что большие вариабельные петли были удалены, что не оказало влияния на общую структуру белка. Чертеж В представляет собой выравнивание полипептидных последовательностей при сравнении последовательности нативной С-доли, сконструированных С-долей с С-долями, отдельная петля которых была модифицирована, и с С-долей, в которой все четыре петли (L18, L21, L23 и L27) были модифицированы (последовательность обозначена "беспетлевая"). Области последовательности, охватывающие намеченные петли, выделены серым цветом, и номер петли указан серым шрифтом.

На фиг. 15 представлено микробное получение модифицированных С-долей M982 *N. meningitidis*, описанных на фиг. 14. С-доля дикого типа (ДТ) (SEQ ID NO: 125) соответствует модели слева на чертеже А фиг. 14. Другие образцы представляют белки с усеченными петлями L18, L21, L23 и L27 и белок с удаленными всеми четырьмя петлями ("Все петли"). Структурная модель данного белка (SEQ ID NO: 129) продемонстрирована в центре чертежа А на фиг. 14. Белки-стандарты молекулярной массы (СММ), представленные на данном геле, составляли 93, 70 и 41 кДа.

На фиг. 16 представлена иммуногенность модифицированной С-доли штамма M982 *N. meningitidis* по сравнению с нативными С-долями из штаммов M982 и B16B6. Конечные титры антисыворотки мыши определяли с применением анализа ELISA собственной разработки. Мышей иммунизировали С-долей из штамма M982 (SEQ ID NO: 125, первый столбец), С-долей TbpB из штамма B16B6 (SEQ ID NO: 119, второй столбец) или "беспетлевой" С-долей M982 (SEQ ID NO: 129, последние два столбца). Сыворотки исследовали против иммобилизованного интактного TbpB из штамма M982 (SEQ ID NO: 123) (первый и третий столбцы) или штамма B16B6 (SEQ ID NO: 117) (второй и четвертый столбцы). Результаты продемонстрировали, что модифицированная С-доля была более иммуногенной, поскольку она индуцировала более высокий титр против интактного TbpB из штамма M982, чем родительский белок С-доли (сравните столбцы 3 и 1). Неожиданно модифицированная С-доля даже индуцировала аналогичный уровень реактивности к гетерологичному TbpB B16B6, как и С-доля из данного штамма (сравните столбцы 4 и 2).

На фиг. 17 представлена конструкция гибридных белков, экспонирующих области TbpA на скелете С-доли TbpB. Чертеж А представляет собой структурную модель TbpA (SEQ ID NO: 152), на которой выделены области, выбранные для "трансплантации" на С-долю TbpB. Спираль петли 3, петля 10, петля 11 и петля "plug" (петля "plug"-домена) TbpA показаны в виде объемных заполненных областей. На чертеже В представлено выравнивание нативной С-доли ("С-доля") (SEQ ID NO: 125), беспетлевого скелета С-доли ("Беспетлевая С") (SEQ ID NO: 129) и гибридного белка с экспонированными всеми областями TbpA (SEQ ID NO: 131). В гибридном белке TbpA спираль петли 3 заменяет петлю 18 С-доли TbpB, петля 10 TbpA заменяет петлю 21 С-доли TbpB, петля 11 TbpA заменяет петлю 23 С-доли TbpB, и петля plug TbpA заменяет петлю 27 С-доли TbpB.

На фиг. 18 представлено микробное получение гибрида С-долей TbpA-TbpB, который был получен с применением стратегии, описанной на фиг. 17. На чертеже А представлено получение рекомбинантных слитых белков с N-концевым партнером слияния мальтозасвязывающего белка (Mbp), и на чертеже В представлены белки после расщепления протеазой TEV (*tobacco etch virus*, вируса гравировки табака). Белок дикого типа ("ДТ") представляет собой нативную С-долю M982 (SEQ ID NO: 125) и белок "Без петель" представляет собой С-долю с удаленными всеми четырьмя петлями (SEQ ID NO: 129), которая эффективно выступает в качестве скелета для экспонирования областей TbpA. Петля 10 означает белок с внеклеточной петлевой областью TbpA, встроенной в петлю 21 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 154). Петля 11 означает белок с внеклеточной петлевой областью TbpA, которая была встроена в петлю 23 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 156). Спираль 3 означает сегмент внеклеточной петли 3 TbpA, который был встроена в петлю 27 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 158). Петля plug означает область домена "plug" TbpA, которая была встроена в петлю 18 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 160). Белки-стандарты молекулярной массы (СММ), представленные на данных гелях, составляли 93, 70, 53, 41 и 22 кДа.

На фиг. 19 представлена иммуногенность модифицированной С-доли штамма M982 *N. meningitidis* по сравнению с модифицированной С-долей с чужеродными петлевыми областями из TbpA, сплайсиро-

ванными в модифицированные петлевые сайты. Конечные титры антисыворотки мыши определяли с применением анализа ELISA собственной разработки. Мышей иммунизировали: (i) "беспетлевой" С-долей с удаленными всеми четырьмя петлями (SEQ ID NO: 129), (ii) "беспетлевой" С-долей с петлей 10 TbpA, встроенной в петлю 21 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 154), (iii) "беспетлевой" С-долей с петлей 11 TbpA, встроенной в петлю 23 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 156), (iv) "беспетлевой" С-долей со спиралью 3 петли TbpA, встроенной в петлю 18 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 158), или (v) "беспетлевой" С-долей с петлей plug TbpA, встроенной в петлю 27 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 160). Сыворотку исследовали против гибридного антигена TbpA-TbpB, в котором "беспетлевая" С-доля содержала все четыре встроенные петли TbpA (SEQ ID NO: 131). Результаты демонстрируют, что все гибридные антигены являлись иммуногенными, по меньшей мере настолько же иммуногенными, как и "беспетлевая" С-доля.

На фиг. 20 представлены конструкция и получение гибридных белков, экспонирующих области LbpA (SEQ ID NO: 162) на скелете С-доли TbpB. Чертеж А представляет собой структурную модель LbpA, на которой выделены области, выбранные для "трансплантации" на С-долю TbpB. Спираль петли 3 LbpA окрашена темно-серым цветом, и петля 2 окрашена черным цветом. На чертеже В представлено выравнивание нативной С-доли (С-доля, SEQ ID NO: 125), беспетлевого скелета С-доли (беспетлевая С, SEQ ID NO: 129) и гибридного белка с экспонированными областями LbpA. В гибридном белке петля 2 LbpA заменяет петлю 21 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 164), спираль петли 3 LbpA заменяет петлю 18 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 166), и белки-стандарты молекулярной массы (СММ), представленные на данных гелях, составляли 100, 75, 63 и 48 кДа.

На фиг. 21 представлена конструкция "конъюгационной петли" в С-доле TbpB из патогена человека *Haemophilus influenzae*. На чертеже А представлена последовательность ДНК и белка гена, кодирующего гибридный ген с областью ДНК, кодирующей конъюгационную петлю, показанную большим шрифтом (SEQ ID NO: 167). Аминокислоты обозначены однобуквенным кодом, в котором лизин обозначен буквой К, причем 42 аминокислоты находятся в конъюгационной петле по сравнению с 24 аминокислотами в целой С-доле (SEQ ID NO: 168). На чертеже А представлена структурная модель С-доли TbpB *H. influenzae* с указанием положения для встраивания конъюгационной петли. Как показано, конъюгационная петля встроена в домен "ручки" С-доли и заменяет петлю L23 С-доли (с применением номенклатуры петель, которая используется по всей настоящей заявке) (фиг. 2). Следует отметить, что с иллюстративной целью модель была создана с конъюгационной петлей, состоящей из 11 аминокислот вместо 91 в фактическом белке.

На фиг. 22 представлены свойства связывания трансферрина сайт-специфическим мутантом белка TbpB, полученным из рекомбинантных усеченных белков TbpB из *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* и *H. parasuis*. Рекомбинантные усеченные белки TbpB экспрессировали в виде слитых белков и исследовали их активность связывания. Рекомбинантные слитые белки сначала подвергали скринингу для определения связывания с трансферрином в ходе твердофазного анализа связывания и анализа на основе аффинного захвата. Затем оценивали связывание очищенных мутантных белков с rTf методом изотермической калориметрии, поверхностного плазмонного резонанса или интерферометрии биослоя (23-25). Несколько мутаций приводили к увеличению констант аффинности (Kd) в ≥ 100 раз, такие как мутация F171A в TbpB из штамма H49 *A. pleuropneumoniae*, мутация Y174A в TbpB из штамма H49 *A. pleuropneumoniae* или мутации Y167A или W176A в TbpB из штамма HP5 *H. parasuis*. Примечательно, что все данные мутанты локализовались в петле 8.

На фиг. 23 представлена увеличенная способность сайт-специфического мутантного белка индуцировать защитный иммунный ответ у нативного хозяина. На данной фигуре способность сайт-специфического мутанта Y167A TbpB из штамма HP5 *H. parasuis* (SEQ ID NO: 174) сравнивали с TbpB дикого типа (SEQ ID NO: 115) и контролями, включающими коммерческую вакцину (Porcillus Glasser) и адьювант сам по себе. Свиной стимулировали антигеном посредством интратрахеального заражения 10 колониеобразующих единиц (КОЕ) штамма Hp5 (Нагасаки) и наблюдали клинические признаки и симптомы в течение всего эксперимента. Животных с тяжелой симптоматикой подвергали эвтаназии до окончания эксперимента. График демонстрирует кривую выживания в период времени от 24 до 108 ч с интервалами в 12 ч, а затем соединен с конечной временной точкой 14 дней.

На фиг. 24 представлен клеточный иммунный ответ, вызванный нативным и мутантным антигенами TbpB. На чертежах А и В представлен ответ В-клеток в день стимуляции антигеном (после двух ВМ, внутримышечных, иммунизаций) и через 4 дня (96 ч) после стимуляции антигеном соответственно. На чертежах С и D представлен ответ Т-хелперных клеток в день стимуляции антигеном и через 4 дня после стимуляции антигеном. Ромбы, треугольники и квадраты представляют свиней, иммунизированных нативным TbpB, мутантом Y167A TbpB и вакциной Porcillus Glasser (PG) соответственно. Количество образцов от свиней, получавших нативный TbpB и вакцину PG, отобранных на 4-й день после стимуляции антигеном, было ограниченным. Анализ проводили методом FACS (fluorescence activated cell sorting, метод сортировки флуоресцентно-активированных клеток) на мононуклеарных клетках периферической крови. Значительные различия между группами: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Фиг. 25 иллюстрирует, что иммунизация рекомбинантным усеченным TbpB, N-долей рекомбинантного усеченного TbpB или С-долей рекомбинантного TbpB из *N. meningitidis* обеспечивает защиту от

колонизации на модели гуманизированной трансгенной мыши. В эксперименте, результаты которого представлены на чертеже А, трансгенных черных мышей С57, экспрессирующих рецептор СЕАСАМ1 человека, иммунизировали рекомбинантным усеченным TbpV из штамма M982 *N. meningitidis* или адьювантом самим по себе в день 1 и день 21. Мышей заражали интраназальным путем приблизительно 1×10^7 КОЕ штамма M982 *N. meningitidis* в день 35. Квадраты и круги представляют КОЕ, выделенные из отдельных мышей через 3 дня после стимуляции антигеном (день 38). На чертеже В представлены результаты эксперимента последующего наблюдения, в котором мышей иммунизировали рекомбинантным усеченным TbpV, N-долей рекомбинантного усеченного TbpV, С-долей рекомбинантного TbpV, рекомбинантным белком, связывающим фактор Н, или адьювантом самим по себе в день 1 и день 21. Как и на чертеже А, на графике откладывали количество КОЕ штамма M982 *N. meningitidis*, выделенных через 3 дня после стимуляции антигеном из отдельных мышей.

На фиг. 26 представлено разнообразие последовательностей TbpV и С-долей TbpV из патогена человека *Neisseria gonorrhoeae*. На чертеже А (фиг. 26А) представлено разнообразие последовательностей интактных TbpV, а на чертеже В (фиг. 26В) представлено разнообразие последовательностей С-долей TbpV. Последовательности типичных TbpV и С-долей TbpV *N. meningitidis* (фиг. 10, стрелки и двойные стрелки) были включены в данный анализ для определения того, в какой степени последовательности TbpV и С-долей TbpV из *N. gonorrhoeae* представляют собой подкласс разнообразия последовательностей TbpV и С-долей TbpV, присутствующих в *N. meningitidis*. Что касается фиг. 10, типичные последовательности TbpV *N. gonorrhoeae* (SEQ ID NO: 207-SEQ ID NO: 212) и последовательности С-доли TbpV (SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 218), помеченные стрелками, включены в приложение, чтобы проиллюстрировать общее разнообразие последовательностей. Как продемонстрировано на чертеже А, существует два кластера TbpV *N. gonorrhoeae*, которые являются подветвями менингококковых TbpV изотипа 2. Существует один больший кластер, наиболее близко родственный к TbpV из менингококкового штамма H44/76, и меньший кластер, наиболее близко родственный к TbpV из штамма P3306. Дерево С-доли на чертеже В демонстрирует, что С-доли TbpV *N. gonorrhoeae* образуют кластер, отдельный от менингококковых С-долей TbpV, который наиболее близко связан с менингококковыми TbpV изотипа 2.

На фиг. 27 представлено разнообразие последовательностей TbpV и С-долей TbpV из патогена человека *Haemophilus influenzae*. На чертеже А (фиг. 27А) представлено разнообразие последовательностей интактных TbpV, а на чертеже В (фиг. 27В) представлено разнообразие последовательностей С-долей TbpV. Типичные последовательности TbpV *H. influenzae* (SEQ ID NO: 196-204), помеченные стрелками, включены в приложение, чтобы проиллюстрировать общее разнообразие последовательностей. Как продемонстрировано на чертеже А, существует три основных кластера (группы) TbpV *H. influenzae*, которые включают тип b и нетипируемые смешанные штаммы *H. influenzae*; данный факт свидетельствует, что разнообразие TbpV не связано с любым другим свойством, таким как наличие капсулы. Существует также три основные группы разнообразия С-долей.

На фиг. 28 представлено разнообразие последовательностей TbpV среди патогенов жвачных животных *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* и *Vibrio trehalosi* (также известен в данной области техники как *Pasteurella haemolytica* и *P. trehalosi* соответственно). Стрелками отмечены типичные последовательности, включенные в перечень SEQ ID NO.

На фиг. 29 представлено разнообразие последовательностей TbpV из *Moraxella catarrhalis*. Стрелками отмечены типичные последовательности TbpV из трех основных кластеров, которые включены в перечень SEQ ID NO.

На фиг. 30 представлено иллюстративное филогенетическое дерево.

В табл. 1-3 представлены комбинации 1, 2 или 3 петлевых доменов соответственно, выбранные из петлевых доменов L1-L32 полипептидов к Н1ВР, которые можно модифицировать согласно настоящему изобретению.

означает петлевой домен или комбинацию петлевых доменов, которые можно модифицировать согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения;

означает неразрешенную комбинацию петлевых доменов согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения;

означает комбинацию разрешенных петлевых доменов, однако отмеченную знаком;

где-либо еще в той же таблице согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Ниже описаны различные композиции и способы в качестве примера варианта реализации каждого заявляемого объекта настоящего изобретения. Ни один из вариантов реализации, описанных ниже, не ограничивает ни один заявляемый объект настоящего изобретения, и любой заявляемый объект настоящего изобретения может охватывать способы, процессы, композиции или системы, отличающиеся от таковых, описанных ниже. Заявляемый объект настоящего изобретения не ограничен композициями или способами, обладающими всеми свойствами любой композиции, способа, системы или процесса, описанных ниже, или свойствами, общими для нескольких или всех композиций, систем или способов, опи-

санных ниже. Возможно, что композиция, система, способ или процесс, описанные ниже, не является вариантом реализации любого заявляемого объекта настоящего изобретения. Любой объект, раскрытый в композиции, системе, способе или процессе, описанных ниже, который не заявлен в настоящем документе, может являться объектом другого защищающего документа, например, продолжающей заявки на патент, и заявители, авторы изобретения или патентовладельцы не намерены прекращать, отказываться или делать всеобщим достоянием любой такой объект посредством его раскрытия в настоящем документе.

Следует отметить, что термины, означающие степень, такие как "существенно", "по существу", "приблизительно" и "примерно", в настоящей заявке означают разумное отклонение модифицированного термина, вследствие которого конечный результат значительно не изменяется. Данные термины, означающие степень, следует истолковывать как включающие отклонение модифицированного термина, если данное отклонение не нивелирует смысл термина, который оно модифицирует.

В настоящей заявке выражение "и/или" предназначено для обозначения "включительно - или". Это означает, что выражение "X и/или Y" предназначено, например, для обозначения X или Y или их обоих. В качестве еще одного примера выражение "X, Y и/или Z" предназначено для обозначения X или Y, или Z, или любой их комбинации.

Все публикации, патенты и заявки на патент включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждая публикация была указана отдельно.

Как было указано выше, в настоящем изобретении предложены новые иммуногенные композиции и, в частности, иммуногенные композиции на основе рецепторных белков поверхности к НВР из граммотрицательного патогенного вида бактерий, такого как *Neisseria meningitidis*. Иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению являются пригодными, поскольку данные композиции можно применять для получения новых вакцинных составов для защиты людей и животных от инфекционных патогенных граммотрицательных видов бактерий. Согласно настоящему изобретению рецепторные белки поверхности к НВР согласно настоящему изобретению модифицированы таким образом, что они, по существу, не способны связываться с железосвязывающими белками хозяина. Такие модифицированные рецепторные белки поверхности к НВР демонстрируют неожиданно мощные иммуногенные свойства. Более того, иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению являются, по существу, стабильными полипептидами, и вследствие этого их можно легко производить. Кроме того, что важно, иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению неожиданно эффективны, например, благодаря индукции перекрестно-реактивного иммунного ответа и, таким образом, обеспечивают защиту от нескольких патогенных микробиологических организмов посредством введения одного эффективного вакцинного соединения. Вакцины, полученные согласно настоящему изобретению, не содержат живых организмов или неочищенных экстрактов, благодаря чему оказывают весьма ограниченный риск на здоровье.

Соответственно по меньшей мере в одном варианте реализации настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая рецепторный белок поверхности к НВР из граммотрицательного патогенного вида бактерий, причем рецепторный белок поверхности НВР был модифицирован таким образом, что он, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

В настоящем изобретении также предложена иммуногенная композиция, содержащая полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый из граммотрицательного патогенного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения домен N-доли или домен С-доли рецепторного белка поверхности к НВР содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и один из нескольких петлевых доменов из множества петлевых доменов был модифицирован.

Термины и определения.

Если не указано обратное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое общепринято понимается средним специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все патенты и заявки на патент и другие публикации, включая последовательности нуклеиновой кислоты и полипептидов из GenBank, SwissPro и других баз данных, приведенные в настоящей заявке выше или ниже, включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте в разрешенных случаях. Также следует отметить, что в настоящей спецификации и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают объекты во множественном числе, если содержание однозначно не диктует обратное. Так, например, упоминание "иммуногена" включает смесь двух или более таких агентов, упоминание "полипептида" включает упоминание смеси двух или более полипептидов, упоминание "клетки" включает две или более таких клетки и т.п.

Термины "иммуноген" и "иммуногенная композиция", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, употребляются в наиболее широком смысле для обозначения молекулы, которая содержит один или несколько эпитопов, которые будут стимулировать иммунный ответ в организме-хозяине для образования клеточного иммуногенспецифичного иммунного ответа и/или гуморального ответа антител. Иммуногены включают нуклеиновые кислоты, белки, полипептиды, пептиды и фрагменты иммуногенных белков.

Термины "вакцина" и "вакцинная композиция", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, означают любую фармацевтическую композицию, содержащую иммуноген, причем указанную композицию можно использовать для предотвращения или лечения заболевания или состояния у субъекта. Данные термины, таким образом, охватывают субъединичные вакцины, т.е. вакцинные композиции, содержащие иммуногены, которые выделены и отделены от целого организма, с которым данный иммуноген связан в природе.

Термин "позвоночный субъект" означает любого члена подтипа хордовые, в частности млекопитающих, включая, без ограничения, людей и других приматов. Данный термин не указывает на конкретный возраст. Таким образом, данный термин охватывает новорожденных, младенцев, детей и взрослых индивидуумов.

Используемые в настоящей заявке взаимозаменяемо термины "рецепторный белок поверхности к НІВР", "рецепторный полипептид поверхности к НІВР", "рецепторный белок поверхности к железосвязывающему белку хозяина" или "полипептид поверхности к железосвязывающему белку хозяина" означают любой белок или полипептид, заякоренный в мембране, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, способный взаимодействовать с железосвязывающими белками хозяина. Данный термин включает любые белки TbpB и LbpB. Рецепторные белки поверхности к НІВР после укладки в нативную трехмерную структуру состоят из двудольной структуры, содержащей домен N-доли и домен С-доли, причем каждый из домена N-доли и домена С-доли содержит множество β -слоев, собранных в β -бочку, и множество β -слоев, собранных в структуру β -слоя, прилегающую к β -бочке, которую называют доменом "ручки", причем β -слои соединены множеством петлевых доменов (что также продемонстрировано на фиг. 1). Данные термины также означают любую и все последовательности рецепторного полипептида поверхности к НІВР, включая все бактериальные рецепторные полипептиды поверхности к НІВР, включая, без ограничения, последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 107-SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 123; SEQ ID NO: 131-SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 177; SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 196-SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 206-SEQ ID NO: 212 и SEQ ID NO: 219-SEQ ID NO: 228, и последовательности, содержащие последовательность остатков аминокислот, которые (i) являются, по существу, идентичными последовательностям аминокислот, составляющим любой рецепторный белок поверхности к НІВР, изложенным в настоящей заявке; (ii) кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой рецепторный белок поверхности к НІВР, изложенной в настоящей заявке, или способной гибридизоваться по меньшей мере в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой рецепторный белок поверхности к НІВР, изложенной в настоящей заявке, но для применения синонимичных кодонов. Данные термины также включают любой полипептид-предшественник рецепторного белка поверхности к НІВР; или (iii) для которых трансферринсвязывающие белки, лактоферринсвязывающие белки или их субдомены будут использоваться в качестве матриц при введении на сервер структурного моделирования, такой как Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) или Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), в последнем случае - при выборе автоматического режима. Данные термины также включают зрелые полипептиды TbpB, а также любой предшественник рецепторного полипептида поверхности к НІВР, включая любой предшественник рецепторного полипептида поверхности к НІВР, содержащий N-концевую или другую сигнальную последовательность.

Используемые в настоящей заявке взаимозаменяемо термины "интегральный белок внешней мембраны" и "белок ИОМ (integral outer membrane, интегральный белок внешней мембраны)" означают любой интегральный белок внешней мембраны из грамотрицательного вида бактерий, включая любые белки, относящиеся к TopB-зависимому подклассу белков, которые при укладке в нативную 3-мерную структуру содержат 22-спиральный С-концевой домен бета-бочки и N-концевой домен "plug" или "cork", способный заполнять канал в С-концевом домене бета-бочки. Данный термин включает, без ограничения, как белок TbpA, так и белок LbpA. Данные термины также означают любую и все последовательности полипептида ИОМ, включая все последовательности, представленные в SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 162, а также последовательности, содержащие последовательность остатков аминокислот, которые (i) являются, по существу, идентичными последовательностям аминокислот, составляющим любой белок ИОМ, изложенной в настоящей заявке; (ii) кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой белок ИОМ, изложенной в настоящей заявке, или способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой белок ИОМ, изложенной в настоящей заявке, но для применения синонимичных кодонов. Данные термины также включают любой полипептид-предшественник белка ИОМ; или (iii) для которых 3V8X или его субдомены будут использоваться в качестве матриц при введении на сервер структурного моделирования, такой как Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) или Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), в последнем случае - при выборе автоматического режима.

Термин "домен N-доли" в настоящей заявке означает N-концевой участок рецепторного белка поверхности к Н1ВР, содержащий множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, причем некоторые из β -слоев собраны с образованием β -бочки, и прилежащую структуру β -слоя, которую называют доменом "ручки" (см. фиг. 1; остатки аминокислот с 46 по 342). Термин "домен N-доли" также включает, без ограничений, все полипептиды, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 127; SEQ ID NO: 229; SEQ ID NO: 231 и SEQ ID NO: 233.

Термин "домен С-доли" в настоящей заявке означает С-концевой участок рецепторного белка поверхности к Н1ВР, содержащий множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, причем некоторые из β -слоев собраны с образованием β -бочки, и прилежащую структуру β -слоя, которую называют доменом "ручки". Также применительно к фиг. 1 и 2 домен ручки С-доли представляет собой полипептидный домен от β -тяжа 16 и далее, вплоть до β -тяжа 23 включительно, который в случае представленных на фиг. 2 полипептидов ТbpV АрН49, АрН57 и АрН87 состоит из остатков аминокислот 344-431 и в SEQ ID NO: 2 - из остатков аминокислот с 314 по 401 (АрН49), в SEQ ID NO: 27 - из остатков аминокислот с 363 по 450 (АрН57) и в SEQ ID NO: 12 - из остатков аминокислот с 315 по 401 (АрН 87). Домен β -бочки С-доли представляет собой полипептидный домен из β -тяжа 23 и далее до С-конца полипептида, который в случае представленных на фиг. 2 полипептидов ТbpV АрН49, АрН57 и АрН87 представляет собой полипептидную цепь от остатка аминокислоты 443 и далее до С-конца, в SEQ ID NO: 2 - от остатка аминокислоты 413 и далее (АрН 49), в SEQ ID NO: 27 - от остатка аминокислоты 462 и далее (АрН 57) и в SEQ ID NO: 12 - от остатка аминокислоты 413 и далее. Следует отметить, что домен ручки С-доли и домен β -бочки С-доли могут быть соединены короткой петлей (на фиг. 1 и 2 обозначена "L24") Также следует отметить, что термин "домен С-доли" в настоящей заявке конкретно призван включить не только домен β -бочки С-доли, но также и домен "ручки", образующий структуру β -слоя, как правило, состоящий из приблизительно 90 или более остатков аминокислот и расположенный ближе к N-концу относительно структуры β -бочки С-доли. Термин "домен С-доли" в настоящей заявке также включает, без ограничений, все полипептиды, представленные в SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 230; SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 234-SEQ ID NO: 278 и SEQ ID NO: 288-SEQ ID NO: 292.

Термин "петлевой домен" означает полипептидные последовательности в рецепторном белке поверхности к Н1ВР, которые соединяют два β -слоя. Данные полипептидные последовательности могут значительно различаться длиной от нескольких остатков аминокислот до 150 или более остатков аминокислот.

Термины "ТbpV", "белок ТbpV", "полипептид ТbpV", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, означают любую и все последовательности трансферринсвязывающего белка В, включая все бактериальные полипептиды ТbpV и полипептиды, содержащие последовательность остатков аминокислот, которая является (i) по существу, идентичной последовательностям аминокислот, составляющим любой полипептид ТbpV, изложенной в настоящей заявке, включая, без ограничения, SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 107-SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 123; SEQ ID NO: 131-SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 177; SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 196-SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 206-SEQ ID NO: 212 и SEQ ID NO: 219-SEQ ID NO: 228, или (ii) кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой полипептид ТbpV, изложенной в настоящей заявке, или способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой полипептид ТbpV, изложенной в настоящей заявке, но для применения синонимичных кодонов. Данные термины также включают зрелые полипептиды ТbpV, а также любой предшественник ТbpV, включая любой pre-ТbpV или ТbpV, содержащий N-концевую или другую сигнальную последовательность.

Термины "LbpV", "белок LbpV", "полипептид LbpV", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, означают любую и все последовательности лактоферринсвязывающего белка В, включая все бактериальные полипептиды LbpV и полипептиды, содержащие последовательность остатков аминокислот, которая является (i) по существу, идентичной последовательностям аминокислот, составляющим любые полипептиды LbpV, изложенным в настоящей заявке, включая, без ограничения, SEQ ID NO: 285, или (ii) кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой полипептид LbpV, изложенной в настоящей заявке, или способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой полипептид LbpV, изложенной в настоящей заявке, но для применения синонимичных кодонов. Данные термины также включают любой предшественник LbpV, включая pre-LbpV.

Термины "ТbpA", "белок ТbpA", "полипептид ТbpA", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, означают любую и все последовательности трансферринсвязывающего белка А, вклю-

чая все бактериальные полипептиды TbpA и полипептиды, содержащие последовательность остатков аминокислот, которая является (i) по существу, идентичной последовательностям аминокислот, составляющим любой полипептид TbpA, изложенным в настоящей заявке, включая, без ограничения, SEQ ID NO: 152, или (ii) кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой полипептид TbpA, изложенной в настоящей заявке, или способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой полипептид TbpA, изложенной в настоящей заявке, но для применения синонимичных кодонов. Данные термины также включают любой предшественник TbpA, включая pre-TbpA.

Термины "LbpA", "белок LbpA", "полипептид LbpA", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, означают любую и все последовательности лактоферринсвязывающего белка A, включая все бактериальные полипептиды LbpA и полипептиды, содержащие последовательность остатков аминокислот, которая является (i) по существу, идентичной последовательностям аминокислот, составляющим любой из полипептидов LbpA, изложенным в настоящей заявке, включая, без ограничения, SEQ ID NO: 162, или (ii) кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой полипептид LbpA, изложенной в настоящей заявке, или способной гибридизоваться, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей любой полипептид LbpA, изложенной в настоящей заявке, но для применения синонимичных кодонов. Данные термины также включают любой предшественник LbpA, включая pre-LbpA.

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты" в настоящей заявке означает последовательность мономеров нуклеозидов или нуклеотидов, состоящую из существующих в природе оснований, сахаров и межсахаридных (скелетных) связей. Данный термин также включает модифицированные или замещенные последовательности, содержащие не существующие в природе мономеры или их участки. Последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут являться последовательностями дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или последовательностями рибонуклеиновой кислоты (РНК) и могут содержать существующие в природе основания, включая аденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил. Последовательности могут также содержать модифицированные основания. Примеры таких модифицированных оснований включают аза- и дезазаденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил, а также ксантин и гипоксантин.

Используемые в настоящей заявке взаимозаменяемо термины "последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рецепторный белок поверхности к НІВР" и "последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рецепторный полипептид поверхности к НІВР" означают любую и все последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рецепторный белок поверхности к НІВР, включая любой рецепторный белок поверхности к НІВР и любые последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют предшественники рецепторного белка поверхности к НІВР, включая, без ограничения, последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 116; SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 173. В настоящей заявке термин "предшественник рецепторного белка поверхности к НІВР" означает молекулу рецепторного белка поверхности к НІВР, дополнительно содержащую N-концевую сигнальную последовательность, которая облегчает экспорт полипептидной цепи через цитоплазматическую мембрану. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рецепторный белок поверхности к НІВР, также включают любую и все последовательности нуклеиновой кислоты, которые (i) кодируют полипептиды, которые являются, по существу, идентичными последовательностям рецепторных белков поверхности к НІВР, изложенным в настоящей заявке; или (ii) гибридизируются с любой последовательностью нуклеиновой кислоты рецепторного белка поверхности к НІВР, изложенной в настоящей заявке, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях гибридизации, или которые будут гибридизоваться с ней, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях, но для применения синонимичных кодонов.

Используемые в настоящей заявке взаимозаменяемо термины "последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок ІОМ" и "последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид ІОМ" означают любую и все последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие белок ІОМ, включая любой белок ІОМ и любые последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют предшественники белка ІОМ, включая, без ограничения, последовательности, представленные в SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 161. В настоящей заявке термин "предшественник белка ІОМ" означает молекулу белка ІОМ, дополнительно содержащую N-концевую сигнальную последовательность, которая облегчает экспорт полипептидной цепи через цитоплазматическую мембрану. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие белок ІОМ, также включают любую и все последовательности нуклеиновой кислоты, которые (i) кодируют полипептиды, которые являются, по существу, идентичными последовательностям белков ІОМ, изложенным в настоящей заявке; или (ii) гибридизируются с любыми последовательностями нуклеиновой кислоты белка ІОМ, изложенными в настоящей заявке, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях гибридизации, или которые будут гибридизоваться с данными последовательностями, по меньшей мере, в умеренно жестких условиях, но для применения синонимичных кодо-

85% идентичны и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичны, например на 96, 97, 98 или 99% идентичны. Для определения процента идентичности между двумя полипептидными последовательностями аминокислотные последовательности таких двух последовательностей выравнивают с применением, например, способа выравнивания Нидлмана и Вунша (26), доработанного Смитом и Ватерманом (27), так, чтобы получить совпадение наивысшего порядка между двумя последовательностями, и определяют количество идентичных аминокислот в двух последовательностях. Предпочтительный и широко применяемый способ точного выравнивания двух полипептидов включает алгоритм Clustal W (28), применяемый с матрицей замен BLOSUM 62 (29) с использованием штрафа за введение пропуска ("gap opening penalty") 10 и штрафа за удлинение пропуска ("gap extension penalty") 0,1. Данный подход позволяет обнаружить выравнивания, получающие наибольший результат, между двумя последовательностями, причем по меньшей мере 50% общей длины одной из двух последовательностей вовлечено в выравнивание. Способы расчета процента идентичности между двумя выровненными последовательностями аминокислот являются общепринятыми в данной области техники и включают, например, способы, описанные Carillo и Lipton (30) и описанные в руководстве Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects. Как правило, для таких расчетов применяют компьютерные программы. Компьютерные программы, которые можно использовать для данной цели, включают, но не ограничены указанными, GCG (31) BLASTP, BLASTN и FASTA (32).

Под "по меньшей мере, умеренно жесткими условиями гибридизации" подразумевают, что выбирают условия, которые стимулируют селективную гибридизацию между двумя комплементарными молекулами нуклеиновой кислоты в растворе. Гибридизация может возникать по всей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты или на ее участке. Длина гибридизуемого участка, как правило, составляет по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30, 40 или 50) нуклеотидов. Специалисты в данной области техники понимают, что стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты или гибридов определяют по T_m , которая в буферах, содержащих натрий, является функцией концентрации иона натрия и температуры ($T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 (\text{Log}10[\text{Na}^+]) + 0,41(\%(G+C) - 600/1)$ или аналогичное уравнение). Соответственно параметры условий промывки, которые определяют стабильность гибрида, представляют собой концентрацию иона натрия и температуру. Для обнаружения молекул, которые являются аналогичными, но не идентичными, известной молекуле нуклеиновой кислоты, можно предположить, что 1% несовпадения приведет к снижению T_m приблизительно на 1°C , например, если проводится поиск молекул нуклеиновой кислоты, обладающих $>95\%$ идентичности, температура конечной промывки будет уменьшена приблизительно на 5°C . На основе данных соображений специалисты в данной области техники могут легко выбрать соответствующие условия гибридизации. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения выбирают жесткие условия гибридизации. В качестве примера для достижения жесткой гибридизации можно использовать следующие условия: гибридизация в $5\times$ растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC)/ $5\times$ растворе Денхардта/1,0% додецилсульфате натрия (SDS) при T_m (на основе уравнения, приведенного выше) -5°C с последующей промывкой $0,2\times\text{SSC}/0,1\%$ SDS при температуре 60°C . Умеренно жесткие условия гибридизации включают этап промывки в $3\times\text{SSC}$ при температуре 42°C . Следует понимать, однако, что эквивалентной жесткости можно достичь с применением альтернативных буферов, солей и температур. Дополнительные указания относительно условий гибридизации можно найти в руководстве Green and Sambrook, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012 (33).

Термин "химерный" в настоящей заявке в контексте последовательностей нуклеиновой кислоты означает по меньшей мере две связанные последовательности нуклеиновой кислоты, которые в природе не являются связанными. Химерные последовательности нуклеиновой кислоты включают связанные последовательности нуклеиновой кислоты разного природного происхождения. Например, последовательность нуклеиновой кислоты, составляющую бактериальный промотор, связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты полипептида TbpV или рецепторного белка поверхности к HBP, считают химерной, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид TbpV, в которой определенные участки были удалены и заменены участками полипептида TbpA, считают химерной. Химерные последовательности нуклеиновой кислоты также могут содержать последовательности нуклеиновой кислоты того же природного происхождения, при условии, что данные последовательности не связаны в природе. Например, последовательность нуклеиновой кислоты, составляющая промотор, полученный из конкретного типа клеток, может быть связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, полученный из данного того же типа клеток, но в норме не связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, составляющей промотор. Химерные последовательности нуклеиновой кислоты также включают последовательности нуклеиновой кислоты, содержащие любую существующую в природе последовательность нуклеиновой кислоты, связанную с любой не существующей в природе последовательностью нуклеиновой кислоты.

Под термином "по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина" подразумевают, что способность железосвязывающего белка хозяина связываться с рецепторным белком

поверхности к НВР уменьшается таким образом, что значение константы связывания (K_d) или константы диссоциации связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина (т.е. железосвязывающим белком хозяина, присутствующим в организме-хозяине) и модифицированным рецепторным белком поверхности к НВР по меньшей мере в 10 раз выше, чем значение константы связывания связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и его комплементарным нативным рецепторным белком поверхности к НВР. Другими словами, модифицированные белки обладают в 10 раз меньшей аффинностью связывания нативного железосвязывающего белка хозяина, чем нативный рецепторный белок. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения относительная аффинность связывания нативного железосвязывающего белка хозяина модифицированным белком в 30 раз ниже, чем аффинность связывания нативным рецепторным белком поверхности к НВР, и согласно наиболее предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения относительная аффинность связывания нативного железосвязывающего белка хозяина модифицированным белком в 100 раз ниже, чем аффинность связывания нативным рецепторным белком поверхности к НВР. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения константа связывания между модифицированным рецепторным белком поверхности к НВР и нативным железосвязывающим белком хозяина составляет по меньшей мере 300 нМ. Предпочтительно константа связывания составляет по меньшей мере 500 нМ и наиболее предпочтительно по меньшей мере 1 мкМ.

Термин "по существу, свободный" в настоящей заявке представляет собой термин степени, означающий, что композиция не содержит значительных количеств соединения, от которого композиция, как говорят, по существу свободна. Если композиция, по существу, свободна от соединения, например, по существу, свободна от домена N-доли, такая композиция содержит предпочтительно менее 5,0% такого соединения, более предпочтительно менее 1,0% такого соединения и наиболее предпочтительно менее 0,1% такого соединения.

Иммуногенные композиции.

Как было указано выше, по меньшей мере в одном варианте реализации настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая рецепторный белок поверхности к НВР из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем рецепторный белок поверхности к НВР был модифицирован таким образом, что он, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Термин "модифицированный" в сочетании с рецепторным белком поверхности к НВР предназначен для обозначения ненативного рецепторного белка поверхности к НВР, из которого был удален по меньшей мере один остаток аминокислоты или в котором по меньшей мере один остаток аминокислоты был заменен другим, или для обозначения рецепторного белка поверхности к НВР, который был разделен на два или более отдельных полипептида. Таким образом, модифицированные рецепторные белки поверхности к НВР включают, без ограничений, усеченные рецепторные белки поверхности к НВР (например, домен N-доли или домен C-доли рецепторного белка поверхности к НВР); рецепторные белки поверхности к НВР, из которых были удалены один или несколько остатков аминокислот (например, рецепторный белок поверхности к НВР, из которого были удалены одна или несколько аминокислот из петлевых доменов в пределах домена N-доли или домена C-доли); рецепторные белки поверхности к НВР, в которые были встроены дополнительные аминокислоты (например, рецепторные белки поверхности к НВР, в которые были добавлены одна или несколько аминокислот к петлевым доменам в пределах домена N-доли или домена C-доли); мультимерные или удлиненные полипептиды к НВР (например, димеры и тримеры, а также димеры и тримеры домена N-доли или домена C-доли); рецепторные белки поверхности к НВР, которые были модифицированы посредством сайт-направленного мутагенеза для изменения одной или нескольких аминокислот; и смеси двух или более полипептидов рецепторных белков поверхности к НВР (например, смесь, содержащая отдельные домены N-доли и домены C-доли рецепторного белка поверхности к НВР). Модифицированные рецепторные белки поверхности к НВР согласно настоящему изобретению, по существу, не способны связываться с нативным железосвязывающим белком хозяина.

Как было указано выше, согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая или состоящая из полипептида, содержащего домен C-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Согласно следующим аспектам в настоящем изобретении предложен полипептид, содержащий домен C-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, причем домен C-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован, и причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

Согласно настоящему изобретению можно использовать любой полипептид или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую такой полипептид, содержащий или состоящий из домена C-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемого из грамотрицательного

патогенного вида бактерий.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых используют нативный домен С-доли, полипептид, содержащий нативный домен С-доли, не содержит и не является химически связанным посредством пептидной связи с нативным доменом N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР и, таким образом, представляет собой выделенный нативный домен С-доли, т.е. нативный домен С-доли, отделенный от нативного домена N-доли. Таким образом, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложены препараты, содержащие домен С-доли рецепторного полипептида поверхности к НІВР, свободный или, по существу, свободный от домена N-доли рецепторного полипептида поверхности к НІВР, или его участки. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых используют нативный домен N-доли, полипептид, содержащий нативный домен N-доли, используемый в настоящей заявке, не содержит и не является химически связанным посредством пептидной связи с нативным доменом С-доли рецепторного белка поверхности к НІВР и, таким образом, представляет собой выделенный нативный домен N-доли, т.е. домен N-доли, отделенный от нативного домена С-доли. Таким образом, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложены препараты, содержащие домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НІВР, свободный или, по существу, свободный от домена С-доли рецепторного полипептида поверхности к НІВР, или его участки. Однако согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения можно использовать смесь нативного домена С-доли или его участков и нативного домена N-доли или его участков, при условии, однако, что домен N-доли и домен С-доли не являются химически связанными, т.е. не соединены химическим способом пептидной связью. Таким образом, настоящее изобретение включает иммуногенную композицию, содержащую смесь полипептидов, которые содержат домен N-доли, и полипептида, содержащего домен С-доли, причем домен N-доли и домен С-доли не связаны физическим способом.

В качестве источника полипептидов согласно настоящему изобретению можно использовать любой рецепторный белок поверхности к НІВР или полипептид TbpV, получаемый или полученный из любого грамотрицательного вида бактерий, включая, но не ограничиваясь указанными, любой патогенный вид или штамм бактерий и включая, но не ограничиваясь указанными, любой вид бактерий, относящийся к семействам бактерий Pasteurellaceae, Moxarellaceae или Neisseriaceae, а также вид бактерий, относящийся к роду бактерий Actinobacillus, Neisseria, Haemophilus, Mannheimia, Histophilus, Pasteurella или Moraxella. Полипептиды также включают любые полипептиды, получаемые или полученные из любого рецепторного белка поверхности к НІВР, или любые полипептиды, получаемые или полученные из любого полипептида TbpV, получаемого или полученного из следующих видов бактерий: Actinobacillus pleuropneumoniae (12, 34), Actinobacillus suis, Haemophilus influenzae (35, 36), Haemophilus parasuis (37), Haemophilus somnus (также известен в данной области техники как Histophilus somnus) (38), Mannheimia haemolytica (также известен в данной области техники как Pasteurella haemolytica) (39), Moraxella catarrhalis (40), Moraxella bovis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis (41, 42), Mannheimia glucosida (также известен в данной области техники как Pasteurella haemolytica) и Bibersteinia trehalosi (также известен в данной области техники как Pasteurella trehalosi).

Примеры полипептидов домена С-доли и домена N-доли, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, также включают любой домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 230; SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 234-SEQ ID NO: 278 и SEQ ID NO: 288-SEQ ID NO: 292, и любой домен N-доли, представленный в SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 127; SEQ ID NO: 229; SEQ ID NO: 231 и SEQ ID NO: 233, а также включают любой домен С-доли или домен N-доли, который может быть получен из полипептида к НІВР или из полипептида TbpV, включая, без ограничения, полипептиды, представленные в SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 107-SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 123; SEQ ID NO: 131-SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 177; SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 196-SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 206-SEQ ID NO: 212 и SEQ ID NO: 219-SEQ ID NO: 228, или который может быть получен с применением последовательностей нуклеиновой кислоты, кодируемых SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 116; SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 173. С применением данных последовательностей нуклеиновой кислоты и полипептидных последовательностей специалисты в данной области техники могут легко обнаружить дополнительные новые последовательности рецепторных белков поверхности к НІВР и TbpV, а также доменов С-доли или доменов N-доли. Например, можно провести скрининг библиотек экспрессируемых последовательностей, библиотек кДНК и геномных библиотек, а также можно провести поиск аналогичных последовательностей в базах данных, содержащих информацию о последовательностях.

Иммуногенные препараты согласно настоящему изобретению после введения позвоночному субъекту вызывают иммунный ответ у такого позвоночного субъекта в форме стимуляции продукции антител позвоночным субъектом. Согласно настоящему изобретению такие антитела являются реактивными против по меньшей мере одного грамотрицательного штамма бактерий. Предпочтительно, однако, антитела являются перекрестно-реактивными и/или перекрестно-защитными против множества штаммов или ви-

дов бактерий, и предпочтительно такая перекрестная реактивность и/или перекрестная защита достигается в хозяине, который экспрессирует один или несколько железосвязывающих белков хозяина, таких как трансферрин или лактоферрин. Термин "перекрестно-реактивный" в настоящей заявке означает способность иммунного ответа, вызванного иммуногенной композицией, полученной из одного штамма бактерий, стимулировать продукцию антител, способных дополнительно реагировать с отличным штаммом бактерий или с другим видом. Термин "перекрестно-защитный" в настоящей заявке означает способность иммунного ответа, вызванного иммуногенной композицией, полученной из одного штамма бактерий, предотвращать или ослаблять инфекцию или заболевание, вызванные по меньшей мере одним дополнительным штаммом бактерий или видом бактерий. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению являются перекрестно-реактивными и/или перекрестно-защитными против множества штаммов бактерий или видов бактерий, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 видов бактерий или штаммов бактерий. Перекрестная реактивность, как считают, является показателем перекрестной защиты. Специалисты в данной области техники понимают, что вышеуказанный аспект настоящего изобретения облегчает производство вакцины и позволяет получить одно иммуногенное соединение, т.е. иммуногенное соединение, получаемое из одного рецепторного белка поверхности к НВР, которое обеспечивает защиту против нескольких инфекционных штаммов бактерий или видов бактерий.

Иммуногенные препараты согласно настоящему изобретению вызывают неожиданно эффективный иммунный ответ у позвоночных субъектов и в особенности у позвоночных субъектов, экспрессирующих железосвязывающие белки хозяина, такие как трансферрин и лактоферрин, что увеличивает эффективность иммунного ответа, вызванного при использовании иммунизирующих препаратов с применением нативного белка к НВР. Одним из аспектов эффективного иммунного ответа является магнитуда иммунного ответа. Предпочтительно титр антител, полученных с применением иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению, превышает титр антител против нативного белка к НВР по меньшей мере в 2 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 10 раз.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют смеси, содержащие по меньшей мере два полипептида, причем каждый полипептид содержит или состоит из домена С-доли; или используют смеси, содержащие по меньшей мере два полипептида, причем каждый полипептид содержит или состоит из домена N-доли; или используют смеси, содержащие по меньшей мере три полипептида, которые содержат или состоят по меньшей мере из двух доменов С-доли и по меньшей мере одного домена N-доли; или используют смеси, содержащие по меньшей мере три полипептида, которые содержат или состоят по меньшей мере из двух доменов N-доли и по меньшей мере одного домена С-доли. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере два полипептида являются получаемыми или полученными из граммотрицательного рода или вида бактерий, способного инфицировать один и тот же вид позвоночного. Таким образом, по меньшей мере два полипептида будут выбраны из, например, двух доменов С-доли полипептида ТbpV, причем оба домена С-доли являются получаемыми или полученными из полипептида ТbpV, полученного или получаемого из штамма *Actinobacillus*, способного инфицировать свиней, или, например, из двух доменов С-доли полипептида ТbpV, причем оба домена С-доли являются получаемыми или полученными из полипептида ТbpV, полученного или получаемого из штамма *Haemophilus*, способного инфицировать коров. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых используют по меньшей мере два домена С-доли, смеси предпочтительно свободны или, по существу, свободны от доменов N-доли или их участков. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых используют по меньшей мере два домена N-доли, смеси предпочтительно свободны или, по существу, свободны от доменов С-доли или их участков.

Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют смеси по меньшей мере двух полипептидов, каждый из которых содержит или состоит из домена С-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемого или полученного из граммотрицательного вида бактерий. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения смеси предпочтительно свободны от доменов N-доли или их участков. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют любые два домена С-доли, получаемые или полученные из рецепторных полипептидов поверхности к НВР, представленных в SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 107-SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 123; SEQ ID NO: 131-SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 177; SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 196-SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 206-SEQ ID NO: 212 и SEQ ID NO: 219-SEQ ID NO: 228; или используют любые два домена С-доли, получаемые или полученные из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 116; SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 173. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют любые два домена С-доли, которые выбраны из доменов С-доли, представленных в SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195 и SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 230; SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 234-SEQ ID NO: 278 и SEQ ID

NO: 288-SEQ ID NO: 292.

Согласно следующим особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из рецепторного белка поверхности к НІВР, причем по меньшей мере один домен С-доли является получаемым или полученным из вида бактерий, относящегося к роду бактерий *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pasteurella* и *Bibersteinia*.

Согласно следующим особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем по меньшей мере один домен С-доли является получаемым или полученным из рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемого или полученного из *Actinobacillus pleuropneumoniae*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 22, или причем по меньшей мере один домен С-доли является получаемым или полученным из рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемого или полученного из *Actinobacillus suis*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 34.

Согласно следующим особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем по меньшей мере один домен С-доли является получаемым или полученным из рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемого или полученного из *Mannheimia haemolytica*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 234, или причем по меньшей мере один домен С-доли является получаемым или полученным из рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемого или полученного из *Mannheimia glucosida*.

Согласно следующим особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем по меньшей мере один домен С-доли является получаемым или полученным из рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемого или полученного из *Neisseria gonorrhoeae*, предпочтительно один из доменов С-доли, представленных в SEQ ID NO: 213 - SEQ ID NO: 218, или причем по меньшей мере один домен С-доли является получаемым или полученным из рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемого или полученного из *Neisseria meningitidis*, предпочтительно один из доменов С-доли, представленных в SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 129; SEQ ID NO: 130; SEQ ID NO: 131; SEQ ID NO: 152; SEQ ID NO: 154; SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 160; SEQ ID NO: 164; SEQ ID NO: 166; SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195 и SEQ ID NO: 235-SEQ ID NO: 278.

Согласно следующим особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем по меньшей мере один домен С-доли является получаемым или полученным из рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемого или полученного из *Bibersteinia trehalosi*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 292.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из рецепторного полипептида поверхности к НІВР, причем оба из двух доменов С-доли являются получаемыми или полученными из двух видов бактерий, которые выбраны из *Actinobacillus pleuropneumoniae*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 22, *Actinobacillus suis*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 34, и *Haemophilus parasuis*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 294.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из рецепторного полипептида поверхности к НІВР, причем один из двух доменов С-доли является получаемым или полученным из *Neisseria gonorrhoeae*, предпочтительно один из доменов С-доли, представленных в SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 218, и другой домен С-доли является получаемым из *Neisseria meningitidis*, предпочтительно один из доменов С-доли, представленных в SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 129; SEQ ID NO: 130; SEQ ID NO: 131; SEQ ID NO: 152; SEQ ID NO: 154; SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 160; SEQ ID NO: 164; SEQ ID NO: 166; SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195 и SEQ ID NO: 235-SEQ ID NO: 278.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из рецепторного полипептида поверхности к НІВР, причем один из двух доменов С-доли является получаемым или полученным из *Mannheimia haemolytica*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 234, и другая С-доля является получаемой или полученной из *Bibersteinia trehalosi*, предпочтительно домен С-доли, представленный в SEQ ID NO: 292.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из полипептида ТbpV, причем оба из двух доменов С-доли являются получаемыми или полученными из одного или из двух видов бактерий, и причем полипептиды ТbpV или полученные из них домены С-доли являются антигенно различными. Домены ТbpV или С-доли предпочтительно получены из видов бактерий или штаммов бактерий, способных к обмену вариантов ТbpV. Термин "антигенно различный" в настоящей заявке в отношении двух полипептидов ТbpV или доменов С-доли полипептидов ТbpV означает, что два полипептида ТbpV

или два домена С-доли полипептидов TbpV при использовании для конструирования филогенетического дерева с применением типичного количества полипептидов TbpV или полипептидов доменов С-доли относятся к различным ветвям или группам филогенетического дерева. Согласно настоящему изобретению можно сконструировать филогенетическое дерево с любым количеством полипептидов TbpV или доменов С-доли, однако предпочтительно филогенетическое дерево конструируют с применением по меньшей мере 25 полипептидов TbpV или полипептидов домена С-доли, более предпочтительно по меньшей мере 30, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 полипептидов TbpV или полипептидов домена С-доли, и предпочтительно филогенетическое дерево конструируют таким образом, что оно содержит по меньшей мере 2 порядка узлов выше корневого уровня, более предпочтительно филогенетическое дерево содержит по меньшей мере 3, 4 или 5 порядков узлов выше корневого уровня, наиболее предпочтительно содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 порядков узлов выше корневого уровня (как дополнительно поясняется ниже и на фиг. 30). Антигенно различные полипептиды TbpV или полипептиды домена С-доли предпочтительно относятся к различным ветвям, которые (i) расходятся от узла, расположенного по меньшей мере на 2 порядка ниже от узла наивысшего порядка в филогенетическом дереве (например, если узлом наивысшего порядка в филогенетическом дереве является узел 9-го порядка, антигенно различные полипептиды представляют собой полипептиды, расходящиеся от узла 7-го порядка или узла меньшего порядка, т.е. узла 6-го, 5-го, 4-го, 3-го, 2-го или 1-го порядка; и/или (ii) расходятся от узла 1-го, 2-го или 3-го порядка филогенетического дерева. Для облегчения конструирования филогенетических деревьев с применением полипептидов TbpV или полипептидов домена С-доли можно использовать некоторые компьютерные программы, включая (i) компьютерные программы, осуществляющие выравнивания последовательности, например программу с применением алгоритма выравнивания M-Coffee, которая выполняется на сервере сайта T-Coffee (<http://www.tcoffee.org/>) (43); (ii) компьютерные программы, редактирующие выравнивания, такие как Geneious Pro (44); (iii) компьютерные программы, автоматически чистящие выравнивания, такие как GBlocks (45); (iv) компьютерные программы, выбирающие эволюционную модель, совместимую с выравниванием, такие как ProtTest v3.2 (Dattiba et al., 2011); и (iv) компьютерные программы, создающие филогенетические деревья, такие как программы, использующие метод наибольшего правдоподобия, PhyML (46), работающие с применением модели GTR (general time reversible, общей обратимости времени) (47) (48, 49), или другой модели, такой как модель JTT+I+G+F или модель WAG+G=F, или программы, такие как PHYLIP и RAUP (университета Вашингтона). Каждая из данных программ предпочтительно сконструирована таким образом, что ветви дерева считают статистически значимыми. Отмечается, однако, что более дистально расположенные ветви могут быть менее статистически значимыми; таким образом, предпочтительным является выбор штаммов, относящихся к группам, на основании узлов наименьшего порядка.

На фиг. 30 с иллюстративной целью представлено филогенетическое дерево 100, содержащее корень 120, промежуточные ветви (примерами которых являются 130, 131, 140, 141, 142 и 143), и в общей сложности 38 дистальных ветвей (примерами которых являются дистальные ветви 150, 151, 152, 153, 154 и 155), причем каждая дистальная ветвь представляет родственный полипептид, полученный из 1 из 38 штаммов бактерий (штаммы 1-38 (110)). Каждая ветвь отходит от узла (примерами которых являются узлы 161, 171, 172, 181, 182, 183 и 184). Таким образом, например, ветвь 130 отходит от узла 161, и ветвь 143 отходит от узла 172. Узел (161), расположенный наиболее проксимально к корню дерева (120), более конкретно называют узлом 161 первого порядка; узлы 171 и 172 более конкретно называют узлами 171 и 172 2-го порядка; узлы 181, 182, 183 и 184 более конкретно называют узлами 181, 182, 183 и 184 3-го порядка и следующие узлы с соответствующими исправлениями можно назвать узлами 4-го, 5-го, 6-го, 7-го и т.д. порядка. На фиг. 30 показаны следующие четыре группы (группа 1 (105), полипептиды штаммов бактерий (110) 1-17; группа 2 (106), полипептиды штаммов бактерий (110) 18-24; группа 3 (107), полипептиды штаммов бактерий (110) 25-30 и группа 4 (108), полипептиды штаммов бактерий (110) 26-38). Полипептиды штаммов бактерий, относящиеся к группе 1 (105) или группе 2 (106), принадлежат к ветви (131), отходящей от узла первого порядка (161) филогенетического дерева (100). Аналогично, полипептиды штаммов бактерий, относящиеся к группе 3 (107) или группе 4 (108), принадлежат к ветви (131), отходящей от узла первого порядка (161) филогенетического дерева (100). Таким образом, полипептиды всех штаммов бактерий, относящихся к группе 1 (105) или группе 2 (106), являются антигенно различными с полипептидами всех штаммов бактерий, относящихся к группе 3 (107) или группе 4 (108). Полипептиды штаммов бактерий, относящихся к группе 1 (105) или группе 2 (106), относятся к группам, отходящим от узла 2-го порядка (172) филогенетического дерева (100). Полипептиды штаммов бактерий, относящихся к группе 1 (105), согласно настоящему изобретению также являются антигенно различными со штаммами бактерий, которые относятся к группе 2 (106). Следует отметить, что филогенетические деревья могут быть представлены в различном формате, например, в прямоугольной форме, как, например, на фиг. 30, или в круглой форме, как на фиг. 10. Примеры филогенетических деревьев, сконструированных с применением полипептидов TbpV или С-долей или полипептидов TbpV, предложены на фиг. 4 (содержит штаммы *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* и *Haemophilus parasuis*), фиг. 10 (содержит штаммы *Neisseria meningitidis*), фиг. 26 (содержит штаммы *Neisseria meningitidis* и *Neisseria gonorrhoeae*), фиг. 27 (содержит штаммы *Haemophilus influenzae*), фиг. 28 (содержит штаммы *Mannheimia*

haemolytica и *Bibersteinia trehalosi*) и фиг. 29 (содержит штаммы *Moraxella catharrhalis*).

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV, причем оба из двух доменов С-доли являются получаемыми или полученными из *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* и *Haemophilus parasuis*. Применительно к филогенетическому дереву, представленному на фиг. 4, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем первый домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штаммов бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* или *Haemophilus parasuis*, относящихся к филогенетической группе 1, филогенетической группе 2 или филогенетической группе 3, представленной на фиг. 4, и причем второй домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* или *Haemophilus parasuis*, относящихся к филогенетической группе, представленной на фиг. 4, отличной от филогенетической группы, из которой выбран первый домен С-доли. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере три домена С-доли, причем используют первый домен С-доли, относящийся к штаммам бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* или *Haemophilus parasuis*, которые относятся к филогенетической группе 1, представленной на фиг. 4, используют второй домен С-доли, относящийся к штаммам бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* или *Haemophilus parasuis*, которые относятся к филогенетической группе 2, представленной на фиг. 4, и используют третий домен С-доли, относящийся к штаммам бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* или *Haemophilus parasuis*, которые относятся к филогенетической группе 3, представленной на фиг. 4. Таким образом, в качестве конкретного примера домен С-доли из H57 *Actinobacillus suis* (филогенетическая группа 1; черная стрелка на фиг. 4) можно объединить с доменом С-доли из H87 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (филогенетическая группа 2; черная стрелка на фиг. 4) и доменом С-доли из H49 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (филогенетическая группа 3; черная стрелка на фиг. 4).

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из белка TbpV, причем оба из двух доменов С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria meningitidis*. Применительно к филогенетическому дереву, представленному на фиг. 10А, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем первый домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Neisseria meningitidis*, относящегося к филогенетической группе 1, филогенетической группе 2, филогенетической группе 3 или филогенетической группе 4, представленной на фиг. 10А, и причем второй домен С-доли получен из любого из штаммов *Neisseria meningitidis*, относящихся к филогенетической группе, представленной на фиг. 10А, отличной от филогенетической группы, из которой выбран первый домен С-доли. Таким образом, исключительно в качестве примера домен С-доли TbpV, полученный из штамма V16B6 *Neisseria meningitidis* (филогенетическая группа 1; черная стрелка на фиг. 10А), можно объединить с доменом С-доли TbpV из штамма M982 (филогенетическая группа 4; черная стрелка на фиг. 10А). Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере три домена С-доли, причем домены С-доли выбирают из штаммов, относящихся к трем различным группам, представленным на фиг. 10А (например, домен С-доли, который выбран из каждой из филогенетической группы 1, филогенетической группы 2 и филогенетической группы 3). Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере четыре домена С-доли, причем используют первый домен С-доли, относящийся к штамму бактерий *Neisseria meningitidis*, который относится к группе 1, представленной на фиг. 10А, используют второй домен С-доли, относящийся к штамму бактерий *Neisseria meningitidis*, который относится к группе 2, представленной на фиг. 10А, используют третий домен С-доли, относящийся к штамму бактерий *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 3, представленной на фиг. 10А, и используют четвертый домен С-доли, относящийся к штамму бактерий *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 4, представленной на фиг. 10А. Таким образом, исключительно в качестве конкретного примера может быть выбран домен С-доли TbpV из штаммов V16B6 (филогенетическая группа 1; черная стрелка на фиг. 10А), VZ169 (филогенетическая группа 2; черная стрелка на фиг. 10А), S3131 (филогенетическая группа 3; черная стрелка на фиг. 10А) и M982 (филогенетическая группа 4; черная стрелка на фиг. 10А) *Neisseria meningitidis*.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV, причем один из двух доменов С-доли является получаемым или полученным из *Neisseria meningitidis*, а другая из С-долей является получаемой или полученной из *Neisseria gonorrhoeae*. Применительно к филогенетическому дереву, представленному на фиг. 26В, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем первый домен С-доли является полученным из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Neisseria gonorrhoeae*, который относится к филогенетической группе 3, представленной на фиг. 26В, и причем

второй домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 1 или группе 2, представленной на фиг. 26В. Более предпочтительно используют по меньшей мере три домена С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV, причем два домена С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria meningitidis*, а другая С-доля является получаемой или полученной из *Neisseria gonorrhoeae*. Предпочтительно домен С-доли выбран из штамма бактерий *Neisseria gonorrhoeae*, который относится к филогенетической группе 3, представленной на фиг. 26В, а второй домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 2, представленной на фиг. 26В, и третий домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 1, представленной на фиг. 26В. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере четыре домена С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV, причем три домена С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria meningitidis*, а другой домен С-доли является получаемым или полученным из *Neisseria gonorrhoeae*. Предпочтительно домен С-доли выбран из штамма бактерий *Neisseria gonorrhoeae*, который относится к филогенетической группе 3, представленной на фиг. 26В, второй и третий домены С-доли получены из любого домена С-доли, которые выбраны из штамма *Neisseria meningitidis*, который относится к двум различным подгруппам филогенетической группы 2 (например, филогенетической подгруппе 2.1 и филогенетической подгруппе 2.2), представленной на фиг. 26В, и четвертый домен С-доли является полученным из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 1, представленной на фиг. 26В. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере четыре домена С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV, причем два домена С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria meningitidis*, а другие две С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria gonorrhoeae*. Предпочтительно два домена С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Neisseria gonorrhoeae*, относятся к двум различным филогенетическим подгруппам филогенетической группы 3 (например, подгруппе 3.1 и подгруппе 3.2), представленной на фиг. 26В, третий и четвертый домены С-доли являются полученными из штамма *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 1 и филогенетической группе 2 соответственно. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере пять доменов С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV, причем три домена С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria meningitidis*, а другие две С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria gonorrhoeae*. Предпочтительно два домена С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Neisseria gonorrhoeae*, относятся к двум различным филогенетическим подгруппам филогенетической группы 3 (например, к подгруппе 3.1 и подгруппе 3.2), представленной на фиг. 26В, третий и четвертый домены С-доли получены из штамма *Neisseria meningitidis*, который относится к двум различным филогенетическим подгруппам филогенетической группы 2 (например, к подгруппе 2.1 и подгруппе 2.2), представленной на фиг. 26В, и пятый домен С-доли относится к штамму *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 1, представленной на фиг. 26В. Согласно следующему предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере шесть доменов С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV. Согласно данному варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один домен С-доли является полученным или получаемым из *Neisseria meningitidis* и по меньшей мере один домен С-доли является полученным или получаемым из *Neisseria gonorrhoeae*, другие С-доли являются полученными или получаемыми из штаммов, которые являются антигенно различными согласно фиг. 26В. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения три домена С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria meningitidis*, а другие три С-доли являются получаемыми или полученными из *Neisseria gonorrhoeae*. Применительно к фиг. 26В предпочтительно три домена С-доли, полученные из штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, относятся к трем антигенно различным группам, и три домена С-доли, полученные из *Neisseria meningitidis*, относятся к трем антигенно различным штаммам.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV, причем один из двух доменов С-доли является получаемым или полученным из *Neisseria meningitidis*, а другая из С-долей является получаемой или полученной из *Neisseria gonorrhoeae*. Применительно к филогенетическому дереву, представленному на фиг. 26А, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем первый домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Neisseria gonorrhoeae*, который относится к филогенетической группе 3 или филогенетической группе 1, представленной на фиг. 26А, и причем второй домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма *Neisseria meningitidis*, который относится к филогенетической группе 2, группе 4 или группе 5, представленной на фиг. 26А.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения исполь-

зуют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из белка TbpV, причем оба из двух доменов С-доли являются получаемыми или полученными из *Haemophilus influenzae*. Применительно к филогенетическому дереву, представленному на фиг. 27А и 27В, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем первый домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Haemophilus influenzae*, который относится к филогенетической группе 1, филогенетической группе 2 или филогенетической группе 3, представленной на фиг. 27А или 27В, и причем второй домен С-доли получен из любого из штаммов *Haemophilus influenzae*, который относится к филогенетической группе, представленной на фиг. 27А или 27В, отличной от филогенетической группы, из которой выбран первый домен С-доли. Таким образом, исключительно в качестве примера домен С-доли TbpV, полученный из штамма H216 *Haemophilus influenzae* (филогенетическая группа 3; черная стрелка на фиг. 27В), можно объединить с доменом С-доли TbpV из штамма H214 (филогенетическая группа 1; черная стрелка на фиг. 27В). Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере три домена С-доли, причем домены С-доли выбирают из штаммов, которые относятся к трем различным группам, представленным на фиг. 27А и 27В (т.е. домен С-доли выбран из каждой из филогенетической группы 1, филогенетической группы 2 и филогенетической группы 3). Таким образом, исключительно в качестве конкретного примера можно выбрать домен С-доли TbpV из штаммов H216 (филогенетическая группа 3; черная стрелка на фиг. 27В), H214 (филогенетическая группа 1; черная стрелка на фиг. 27В) и H011 (филогенетическая группа 2; черная стрелка на фиг. 27В) *Haemophilus influenzae*.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из белка TbpV, причем оба из двух доменов С-доли являются получаемыми или полученными из *Mannheimia haemolytica*. Применительно к филогенетическому дереву, представленному на фиг. 28, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем первый домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Mannheimia haemolytica*, который относится к филогенетической группе 1, представленной на фиг. 28, и причем второй домен С-доли получен из любого из штамма *Mannheimia haemolytica*, который относится к филогенетической группе 3.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из полипептида TbpV, причем один из двух доменов С-доли является получаемым или полученным из *Bibersteinia trehalosi*, а другая из С-долей является получаемой или полученной из *Mannheimia haemolytica*. Применительно к фиг. 28 согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем первый домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Bibersteinia trehalosi*, который относится к филогенетической группе 2, представленной на фиг. 28, и причем второй домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма *Mannheimia haemolytica*, который относится к филогенетической группе 1 или группе 3, представленной на фиг. 28.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, получаемых или полученных из белка TbpV, причем оба из двух доменов С-доли являются получаемыми или полученными из *Moraxella catharrhalis*. Применительно к филогенетическому дереву, представленному на фиг. 29, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере два домена С-доли, причем первый домен С-доли получен из любого из доменов С-доли, которые выбраны из штамма бактерий *Moraxella catharrhalis*, который относится к филогенетической группе 1, филогенетической группе 2 или филогенетической группе 3, представленной на фиг. 29, и причем второй домен С-доли получен из любого из штаммов *Moraxella catharrhalis*, который относится к филогенетической группе, представленной на фиг. 29, отличной от филогенетической группы, из которой выбран первый домен С-доли. Таким образом, исключительно в качестве примера домен С-доли TbpV, полученный из штамма AAC34279.1 *Moraxella catharrhalis* (филогенетическая группа 3; черная стрелка на фиг. 29), можно объединить с доменом С-доли TbpV из штамма AAD12263.1 (филогенетическая группа 1; черная стрелка на фиг. 29). Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения используют по меньшей мере три домена С-доли, причем домены С-доли выбирают из штаммов, которые относятся к трем различным группам, представленным на фиг. 29 (т.е. домен С-доли выбран из каждой из филогенетической группы 1, филогенетической группы 2 и филогенетической группы 3). Таким образом, исключительно в качестве конкретного примера можно выбрать домен С-доли TbpV из штаммов AAC34279.1 (филогенетическая группа 3; черная стрелка на фиг. 29), AAD12263.1 (филогенетическая группа 1; черная стрелка на фиг. 29) и 003664398.1 (филогенетическая группа 2; черная стрелка на фиг. 29) *Moraxella catharrhalis*.

Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения вышеуказанные смеси полипептидов, содержащие или состоящие из доменов С-доли, представляют собой домены С-доли, получаемые или полученные из полипептидов TbpV, включая, без ограничения, домены С-

доли, представленные в SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 230; SEQ ID NO: 232 и SEQ ID NO: 234-SEQ ID NO: 278.

Вышеуказанные смеси доменов С-доли можно получить посредством смешивания препаратов, содержащих отдельные домены С-доли, или посредством получения слитых полипептидов, содержащих два или более домена С-доли, рекомбинантным способом.

Как было указано выше, иммуногенные препараты согласно настоящему изобретению предпочтительно являются перекрестно-реактивными и/или перекрестно-защитными. Хотя, как было указано выше, составы, содержащие домены С-доли сами по себе, могут являться перекрестно-реактивными и/или перекрестно-защитными, смеси доменов С-доли являются в особенности предпочтительными, поскольку данные смеси можно применять для получения иммуногенных составов, которые существенно расширяют перекрестную реактивность и/или перекрестную защиту против широкого диапазона штаммов бактерий и/или видов и позволяют получить составы вакцин, обеспечивающих защиту от инфекции или заболевания, передающихся множеством видов бактерий или штаммов бактерий.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий домен С-доли и/или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НІВР, получают таким образом, что петлевой домен, соединяющий два β-слоя в пределах домена С-доли или домена N-доли, является модифицированным, и указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Термин "модифицированный" в настоящей заявке в сочетании с петлевым доменом означает петлю, в которой по меньшей мере один остаток аминокислоты был удален или заменен. Таким образом, полученная в результате петля в пределах домена С-доли или домена N-доли может являться усеченной либо согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения остаток или остатки аминокислот могут быть заменены одним или несколькими альтернативными остатками аминокислот. На фиг. 1 и 2 представлены петлевые домены типичных рецепторных белков поверхности к НІВР. На фиг. 8 и 14 представлены примеры уменьшения петли в домене N-доли и домене С-доли соответственно. Согласно настоящему изобретению по меньшей мере один из петлевых доменов, соединяющих два β-слоя в пределах домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка мембраны, связывающего НІВР, является модифицированным для удаления по меньшей мере одного остатка аминокислоты из петлевых доменов, и полученный в результате полипептид, содержащий модифицированный домен N-доли или домен С-доли, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения удалено большее количество остатков аминокислот, например из петлевого домена удалено по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 остатков аминокислот. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения петлевой домен удален полностью. Любой из петлевых доменов может быть выбран для модификации согласно настоящему изобретению при условии, что такая модификация приводит к получению полипептида, который, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Таким образом, относительно типичного полипептида TbpV свиньи согласно фиг. 1 согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых один петлевой домен является модифицированным, такой петлевой домен может быть выбран из любого из петлевых доменов L1-L32 (примерами которых являются полипептидные последовательности петель L1-L32 *Actinobacillus pleuropneumoniae*: SEQ ID: NO 42; SEQ ID: NO 44; SEQ ID: NO 46; SEQ ID: NO 48; SEQ ID: NO 50; SEQ ID: NO 52; SEQ ID: NO 54; SEQ ID: NO 56; SEQ ID: NO 58; SEQ ID: NO 60; SEQ ID: NO 62; SEQ ID: NO 64; SEQ ID: NO 66; SEQ ID: NO 68; SEQ ID: NO 70; SEQ ID: NO 72; SEQ ID: NO 74; SEQ ID: NO 76; SEQ ID: NO 78; SEQ ID: NO 80; SEQ ID: NO 82; SEQ ID: NO 84; SEQ ID: NO 86; SEQ ID: NO 88; SEQ ID: NO 90; SEQ ID: NO 92; SEQ ID: NO 94; SEQ ID: NO 96; SEQ ID: NO 98; SEQ ID: NO 100; SEQ ID: NO 102; SEQ ID: NO 104 и SEQ ID: NO 106 соответственно, которые кодируются последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID: NO 41; SEQ ID: NO 43; SEQ ID: NO 45; SEQ ID: NO 47; SEQ ID: NO 49; SEQ ID: NO 51; 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; SEQ ID: NO 75; SEQ ID: NO 77; SEQ ID: NO 79; SEQ ID: NO 81; SEQ ID: NO 83; SEQ ID: NO 85; SEQ ID: NO 87; SEQ ID: NO 89; SEQ ID: NO 91; SEQ ID: NO 93; SEQ ID: NO 95; SEQ ID: NO 97; SEQ ID: NO 99; SEQ ID: NO 101; SEQ ID: NO 103 и SEQ ID: NO 105, соответственно), как далее представлено в табл. 1. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых два петлевых домена являются модифицированными, такие два петлевых домена могут являться любыми двумя петлевыми доменами, которые выбраны из петлевых доменов L1-L32 (снова со ссылкой на типичный полипептид TbpV согласно фиг. 1), представленных в табл. 2 ниже. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых три петлевых домена являются модифицированными, такие три петлевых домена могут являться любыми тремя петлевыми доменами, которые выбраны из петлевых доменов L1-L32 (снова со ссылкой на типичный полипептид TbpV на фиг. 1), представленных в табл. 3 ниже. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых четыре петлевых домена являются модифицированными, такие четыре петлевых домена могут являться любыми тремя петлевыми доменами, которые выбраны из комбинации петлей, представленной в табл. 3, с добавле-

нием одного дополнительного петлевого домена, который выбран из петлевых доменов L1-L32 (снова со ссылкой на типичный полипептид TbpB на фиг. 1). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения в общей сложности 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 петлевых домена могут являться модифицированными. Специалисту в данной области техники очевидно, что точное количество модифицированных петлевых доменов может варьировать и может быть выбрано из любых из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 петлевых доменов, выбранных из петель L1-L32, в каждом из данных вариантов реализации настоящего изобретения, способом, аналогичным выбору петлевых доменов, описанному относительно вариантов реализации, в которых были модифицированы 2 или 3 петлевых домена. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения одна или все петли L18, L21, L23 и L27 (примерами которых являются SEQ ID NO: 76; SEQ ID NO: 82; SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 96 *Actinobacillus pleuropneumoniae* соответственно) домена С-доли являются модифицированными. Согласно следующим особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения одна или все петли L1, L5, L8 и L12 (примерами которых являются SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 64 *Actinobacillus pleuropneumoniae* соответственно) домена N-доли являются модифицированными. Петлевые домены, которые можно модифицировать, являются петлевыми доменами, которые соединяют два β -слоя, собранных в пределах домена β -бочки или домена "ручки" β -слоя домена С-доли или домена N-концевой доли, или являются петлевыми доменами, которые соединяют два собранных β -слоя, или представляют собой комбинацию вышеуказанных доменов. Для усечения петлевого домена в пределах домена С-доли или домена N-концевой доли полипептид можно получить таким образом, что петлевой домен будет полностью удален и необязательно заменен одной или несколькими связывающими аминокислотами, что приводит к более или менее непосредственному соединению между двумя β -слоями, или таким образом, что участок или участки петлевого домена будут удалены. Согласно настоящему изобретению предпочтительно, что, по меньшей мере, половина остатков аминокислот по меньшей мере из одного из петлевых доменов домена С-доли или домена N-доли была удалена. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна половина всех остатков аминокислот петлевого домена была удалена. Таким образом, в таких вариантах реализации настоящего изобретения, в которых петлевой домен содержит, например, 40 остатков аминокислот, по меньшей мере 20 остатков аминокислот петлевого домена будут удалены. Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения петлевой домен является модифицированным таким образом, что по меньшей мере 60, 70, 80 или 90% остатков аминокислот петлевого домена удалены. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот петлевых доменов сохранены после усечения, и согласно еще одним вариантам реализации настоящего изобретения до 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% петлевых доменов сохранены после усечения. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых петлевой домен является модифицированным таким образом, что удален только участок петлевого домена, удаленные остатки аминокислот могут быть расположены на N-терминальном конце петлевого домена, на С-терминальном конце петлевого домена или между N- и С-концом. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых множество петлевых доменов домена С-доли или домена N-доли являются модифицированными, такие уменьшения петель могут включать удаление идентичного количества остатков аминокислот из каждой петли, например можно удалить 10 остатков аминокислот из каждой петли в пределах домена С-доли или домена N-доли, или уменьшение петли может включать удаление различных количеств остатков аминокислот из каждой петли, например 10 остатков из одной петли и 20 остатков из другой петли.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения остатки аминокислот в пределах петлевых доменов домена С-доли и/или домена N-доли заменены другими, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, и полученный в результате полипептид содержит модифицированный домен С-доли или домен N-доли и, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. На фиг. 22 представлены примеры замен оснований в петлевых областях домена N-доли различных полипептидов TbpB, а на фиг. 23 представлено снижение связывания Tf в связи с данными заменами оснований. Таким образом, например, в любой из петель L1-L32 можно заменить один или несколько остатков аминокислот. Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения один или несколько остатков аминокислот заменены в петлевом домене L1, L3, L5 или L8 домена N-доли (примерами которого являются SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 56 *Actinobacillus pleuropneumoniae* соответственно). Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан) в пределах петлевого домена L8 заменены алифатическими аминокислотами (глицином, валином, лейцином, изолейцином). Данные аминокислоты представляют собой поверхностно-доступные ароматические остатки аминокислот, в иных случаях находящиеся, как правило, в катионной области поверхности. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения выбирают полипептид TbpB *Haemophilus parasuis*, и для получения модифицированного полипептида TbpB

в полипептид TbpB вводят одну или несколько из следующих мутаций: Y93A (SEQ ID NO: 170; SEQ ID NO: 171); Y117A (SEQ ID NO: 172; SEQ ID NO: 173); Y167A (SEQ ID NO: 174; SEQ ID NO: 175) или W176A (SEQ ID NO: 176; SEQ ID NO: 177), и согласно более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения выбирают полипептид TbpB *Actinobacillus pleuropneumoniae*, и для получения модифицированного полипептида TbpB в полипептид вводят одну или несколько следующих мутаций: F171A (SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4); Y95A (SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14); Y121A (SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16); Y174A (SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18) или R179E (SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20), и согласно более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения выбирают полипептид TbpB *Actinobacillus suis*, и для получения модифицированного полипептида TbpB в полипептид вводят одну или несколько следующих мутаций: F63A (SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30) или F152A (SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32) Настоящее изобретение охватывает каждый из вышеуказанных модифицированных полипептидов и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие данные полипептиды, а также иммуногенные композиции и вакцинные композиции, содержащие данные полипептиды.

Уменьшение размера одного или нескольких петлевых доменов или модификацию аминокислот в петлевом домене полипептидов к НВР согласно настоящему изобретению предпочтительно осуществляют таким образом, что полученный в результате полипептид является конформационно стабильным. Под термином "конформационно стабильный" подразумевают, что после модификации размера петли или замены остатка аминокислоты конформационное состояние или конформация полипептида остается, по существу, той же. Конформационное состояние петлевого домена, который является модифицированным, может являться более или менее измененным. Детерминанты конформационного состояния или конформации полипептида включают первичную структуру полипептида, отраженную его аминокислотной последовательностью, вторичную структуру полипептида (например, α -спираль, β -слой и т.п.), третичную структуру полипептида (т.е. трехмерную укладку полипептидной цепи) и четвертичную структуру (т.е. взаимодействие полипептида с другими субъединицами белка). На конформацию белка могут также влиять факторы окружающей среды, такие как pH, осмолярность, ионная сила и концентрация соли. При разработке уменьшения петли можно исходить из выравнивания и сравнения нескольких гетерологичных последовательностей, сравнения трехмерных конформационных структур нескольких гетерологичных полипептидов, известных в данной области техники, и применения консервативных замен аминокислот (например, комбинаций, таких как gly, ala; val, ile; leu, met; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; cys, met и phe, trp, tyr). Более того, конформационное состояние белка можно проанализировать методом функционального анализа (например, связывания железосвязывающего белка хозяина) или посредством физических способов, таких как рентгеноструктурная кристаллография или ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения для модификации выбирают по меньшей мере один петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий самую длинную петлю. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых такая петля является полностью модифицированной, модификация, как правило, будет включать удаление по меньшей мере 25 остатков аминокислот и может привести к удалению 150 или более остатков аминокислот.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один петлевой домен из домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий самую длинную петлю (т.е. содержащий больше всего остатков аминокислот) домена С-доли или домена N-доли, является модифицированным. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий самую длинную петлю из домена С-доли или домена N-доли, является модифицированным, и для модификации выбирают второй петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий вторую наиболее длинную петлю. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один петлевой домен из домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий самую длинную петлю, и второй петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий вторую наиболее длинную петлю, выбирают для модификации, и для модификации выбирают третий петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий третью наиболее длинную петлю. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий самую длинную петлю, и второй петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий вторую наиболее длинную петлю, выбирают для модификации, и для модификации выбирают третий петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий третью наиболее длинную петлю, и для модификации выбирают четвертый петлевой домен домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, содержащий четвертую наиболее длинную петлю. Вышеуказанные варианты реализации более подробно описаны в примерах 3 и 4 настоящей заявки.

В настоящем изобретении неожиданно было обнаружено, что полипептид, по существу, состоящий из домена С-доли или домена N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, можно легко получить, например, в системе продукции на основе микроорганизмов, когда один или несколько петлевых доменов являются модифицированными, и модифицированный полипептид является, по существу, конформационно стабильным.

Согласно настоящему изобретению модифицированный полипептид домена С-доли или домена N-доли можно использовать сам по себе в качестве иммуногена, или полипептид можно модулировать для введения в него дополнительных модификаций. Модификации в модифицированный домен С-доли или домен N-доли полипептида, которые могут быть введены согласно настоящему изобретению, включают получение N-концевых или С-концевых полипептидных удлинений нативного или модифицированного полипептида домена С-доли или домена N-доли. Такие N-концевые и С-концевые полипептидные удлинения включают добавление к домену С-доли второго полноразмерного полипептида домена С-доли, тем самым обеспечивая получение димера домена С-доли, добавление к домену N-доли второго полноразмерного полипептида домена N-доли, тем самым обеспечивая получение димера домена N-доли, или добавление, содержащее участок полипептида домена С-доли или участок полипептида домена N-доли. Мультимеры могут быть собраны с применением одного и того же мономерного полипептида (т.е. гомодимеры, гомотримеры и т.д.) либо могут быть собраны с применением различных полипептидов, например домена С-доли или домена N-доли, полученных из различных вариантов (т.е. гетеродимеры, гетеротримеры и т.д.). Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения собраны гетеромультимерные белки, представляющие различные патогены или патогенные штаммы. Таким образом, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения получают гетеромультимерный полипептид, содержащий домены С-доли или домены N-доли, которые выбраны из группы, состоящей из доменов С-доли или доменов N-доли *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* и *Haemophilus parasuis*. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения домены С-доли или домены N-доли выбраны из группы, состоящей из доменов С-доли или доменов N-доли H49 *A. pleuropneumoniae*, H57 *A. suis* и H87 *A. pleuropneumoniae*. Согласно более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения получают гетеромультимерный полипептид, содержащий домены С-доли, которые выбраны по меньшей мере из двух доменов С-доли TbpV или доменов N-доли, выбранных из штаммов *Neisseria meningitidis*. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения штаммы выбирают из M982 *N. meningitidis* или B16B6 *N. meningitidis*. Гетеромультимерные белки могут обладать иммуногенностью к различным патогенам. Согласно более предпочтительным вариантам реализации в настоящем изобретении предложены (i) первый полипептид, содержащий домен N-доли или домен С-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из грамтрицательного патогенного вида бактерий, причем домен N-доли или домен С-доли содержит множество β-слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов домена N-доли или домена С-доли был модифицирован, связанный со (ii) вторым полипептидом, содержащим рецепторный белок поверхности к НВР или его участок, получаемый из грамтрицательного вида бактерий. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения участок рецепторного белка поверхности к НВР представляет собой домен N-доли или домен С-доли. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения участок белка поверхности к НВР представляет собой домен N-доли или домен С-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из грамтрицательного патогенного вида бактерий, причем домен N-доли или домен С-доли содержит множество β-слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов домена N-доли или домена С-доли был модифицирован.

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения получают мультимерный полипептид, причем такой мультимерный белок содержит множество N- и С-концевых удлинений, включая добавление к домену С-доли второго, третьего, четвертого, пятого, шестого или седьмого полноразмерного полипептида домена С-доли, что обеспечивает получение мультимера домена С-доли, или добавление к домену N-доли второго, третьего, четвертого, пятого, шестого или седьмого, полноразмерного полипептида домена N-доли, что обеспечивает получение димера домена N-доли, или добавление, содержащее участок полипептида домена С-доли или участок полипептида домена N-доли. Таким образом, например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домены С-доли представляют собой по меньшей мере два или по меньшей мере три домена С-доли, получаемые из полипептида TbpV, получаемого из *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* и *Haemophilus parasuis*. Согласно такому варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены С-доли TbpV из H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 5), H57 *A. suis* (SEQ ID NO: 33) и H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 21), может быть связана с образованием последовательности химерной нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 39), кодирующей один полипептид (SEQ ID NO: 40), охватывающий три С-доли (SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 22). Соответственно согласно следующим вариантам реализации в настоящем изобретении предложены (i) первый полипептид, содержащий домен N-доли или до-

мен С-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый или полученный из грамтрицательного патогенного вида бактерий, причем домен N-доли или домен С-доли содержит множество β-слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов домена N-доли или домена С-доли был модифицирован, связанный со (ii) множеством полипептидов, каждый из которых содержит рецепторный белок поверхности к НІВР или его участок, получаемый из грамтрицательного вида бактерий. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения участок рецепторного белка поверхности к НІВР представляет собой домен N-доли или домен С-доли. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения участок белка поверхности к НІВР представляет собой домен N-доли или домен С-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый или полученный из грамтрицательного патогенного вида бактерий, причем домен N-доли или домен С-доли содержит множество β-слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов домена N-доли или домена С-доли был модифицирован.

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения после удаления одной или нескольких аминокислот из одного или нескольких петлевых доменов С-доли или N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР данные остатки заменяют одним или несколькими альтернативными остатками аминокислот. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения альтернативные остатки аминокислот содержат гетерологичную полипептидную антигенную детерминанту, способную индуцировать иммунный ответ в позвоночном организме-хозяине. Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения альтернативные остатки аминокислот содержат две или более гетерологичные полипептидные антигенные детерминанты, способные индуцировать иммунный ответ в позвоночном организме-хозяине. Гетерологичные антигенные детерминанты могут являться перекрестно-реактивными с иммунной точки зрения в отношении одного и того же или различных патогенных организмов. Очевидно, что модифицированный домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР согласно настоящему изобретению можно использовать в качестве скелета для получения и презентирования одной или нескольких антигенных детерминант. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения одна или несколько петлевых областей домена С-доли или домена N-доли TbpB заменены одним или несколькими полипептидными участками, получаемыми или полученными из белка IOM, включая трансферринсвязывающий белок ("TbpA") или лактоферринсвязывающий белок A ("LbpA"). Полипептиды LbpA и TbpA, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, включают последовательности, представленные в SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 152. Участки полипептидов LbpA и TbpA, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, включают последовательности, представленные в SEQ ID NO: 286 и SEQ ID NO: 287. Данные фрагменты можно использовать для конструирования последовательности химерной нуклеиновой кислоты и полипептидов, включая последовательности, представленные в SEQ ID. NO: 163; SEQ ID. NO: 164; SEQ ID. NO: 165; SEQ ID. NO: 166, SEQ ID. NO: 167 и SEQ ID. NO: 168. Данный вариант реализации настоящего изобретения более подробно описан в примерах 7 и 8 настоящей заявки. Согласно более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения один или несколько петлевых доменов С-доли или N-доли TbpB заменены полипептидной последовательностью, обогащенной лизином, как описано в примере 9 ниже.

Согласно всем вариантам реализации настоящего изобретения, описанным выше, которые включают рецепторный полипептид поверхности к НІВР, содержащий домен N-доли, предпочтительно, что домен N-доли модифицирован таким образом, что N-концевой якорный полипептид или его значительная часть удален из домена N-доли. Длина якорного полипептида может варьировать в зависимости от рецепторного полипептида поверхности к НІВР, но, как правило, составляет от 40 до 75 аминокислот, и якорный полипептид расположен на N-терминальном конце зрелого полипептида к НІВР. Таким образом, применительно к фиг. 1 длина якорного полипептида, изображенного на фигуре зрелого полипептида TbpB, составляет 43 аминокислоты. Соответственно согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, включающим полипептид к НІВР, содержащий домен N-доли, длина якорного полипептида уменьшена по меньшей мере на 10 остатков аминокислот, предпочтительно по меньшей мере на 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 остатков. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых для уменьшения длины выбирают участок якорного полипептида, предпочтительно удаляют непрерывный участок N-конца якорного полипептида, например 10 концевых остатков аминокислот якорного пептида, однако другие участки якорного полипептида могут быть также удалены. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид TbpB, в котором был усечен заякоривающий пептид, включает SEQ ID NO: 279-SEQ ID NO: 283. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что вышеуказанные варианты реализации настоящего изобретения являются в особенности желательными, поскольку удаление якорного полипептида уменьшает агрегацию модифицированного рецепторного полипептида поверхности к НІВР, что облегчает получение полипептида, но при этом не оказывает существенного влияния на иммуногенные свойства полипептида. Таким образом, данную модификацию полипептида к НІВР можно использовать в сочетании с лю-

быми модифицированными пептидами, которые, по существу, не способны связываться с железосвязывающим белком хозяина, изложенным в настоящей заявке, включая описанные в настоящей заявке полипептиды к НВР, содержащие домен N-доли или домен С-доли, содержащий модифицированный петлевой домен, и полипептиды к НВР, содержащие домен N-доли или С-доли, одна аминокислота в котором была заменена таким образом, что полипептид к НВР, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

Как было указано выше, согласно настоящему изобретению рецепторный белок поверхности к НВР является модифицированным таким образом, что он, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Связывание железосвязывающего белка хозяина с модифицированным рецепторным белком поверхности к НВР можно оценить с применением любого химического или биохимического анализа, способного оценить такое связывание, включая, например, твердофазный анализ связывания, анализ аффинного захвата или биофизический анализ. Общие методологии проведения данных анализов известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в публикациях (12, 23-25, 50, 51). При проведении данных анализов разницу характеристик связывания между нативным рецепторным белком поверхности к НВР и нативным железосвязывающим белком хозяина, а также модифицированным рецепторным белком поверхности к НВР и нативным железосвязывающим белком хозяина можно легко определить, а также можно оценить серии модифицированных рецепторных белков поверхности к НВР для определения того, способны ли данные белки связываться с железосвязывающим белком хозяина. Можно определить различные характеристики связывания, включая константу связывания (K_d). Как было указано выше, K_d , характеризующая связывание между железосвязывающим белком хозяина и модифицированными рецепторными белками поверхности к НВР согласно настоящему изобретению, по меньшей мере в 2 раза превышает K_d , характеризующую связывание между железосвязывающим белком хозяина и нативным рецепторным белком поверхности к НВР. Пример способа анализа для определения константы связывания с применением трансферрина хозяина описан в примере 11 настоящей заявки ниже.

Настоящее изобретение также охватывает способ обнаружения модифицированного рецепторного белка поверхности к НВР, причем указанный способ включает:

- (i) обеспечение модифицированного рецепторного белка поверхности к НВР и нативного рецепторного белка поверхности к НВР;
- (ii) определение характеристик связывания между модифицированным рецепторным белком поверхности к НВР и железосвязывающим белком хозяина для получения характеристик связывания модифицированного рецепторного белка поверхности к НВР;
- (iii) определение характеристик связывания между нативным рецепторным белком поверхности к НВР и железосвязывающим белком хозяина для получения характеристик связывания нативного рецепторного белка поверхности к НВР;
- (iv) сравнение характеристик связывания модифицированного рецепторного белка поверхности к НВР с характеристиками нативного рецепторного белка поверхности к НВР; и
- (v) обнаружение рецепторного белка поверхности к НВР, демонстрирующего характеристики связывания, которые являются, по существу, модулированными относительно характеристик связывания нативного рецепторного белка поверхности к НВР.

"Являются, по существу, модулированными" в настоящей заявке означает, что силы связывающего взаимодействия между модифицированными рецепторными белками поверхности к НВР и железосвязывающим белком хозяина, по существу, слабее, чем силы связывающего взаимодействия между нативными рецепторными белками поверхности к НВР и железосвязывающим белком хозяина. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения характеристика связывания, которую используют, представляет собой K_d , которая характеризует связывающее взаимодействие рецепторного белка поверхности к НВР и железосвязывающего белка хозяина, причем значение K_d связывающего взаимодействия между модифицированными рецепторными белками поверхности к НВР и железосвязывающим белком хозяина по меньшей мере в 2 раза выше по значению, чем K_d связывающего взаимодействия между нативными рецепторными белками поверхности к НВР и железосвязывающим белком хозяина. Также следует отметить, что вышеуказанный способ можно использовать для проведения скрининга множества различных кандидатов рецепторных белков поверхности к НВР, одновременно или последовательно, и обнаружения среди скринированных кандидатов рецепторных белков поверхности к НВР, которые демонстрируют более или менее выраженную модуляцию характеристик связывания относительно нативных рецепторных белков поверхности к НВР.

Настоящее изобретение также охватывает способ получения модифицированного рецепторного белка поверхности к НВР для применения в качестве вакцины, причем указанный способ включает:

- (i) обеспечение модифицированного рецепторного белка поверхности к НВР и нативного рецепторного белка поверхности к НВР;
- (ii) определение характеристик связывания между модифицированным рецепторным белком поверхности к НВР и железосвязывающим белком хозяина для получения характеристик связывания модифицированных рецепторных белков поверхности к НВР;

(iii) определение характеристик связывания между нативным рецепторным белком поверхности к НВР и железосвязывающим белком хозяина для получения характеристик связывания нативного рецепторного белка поверхности к НВР;

(iv) сравнение характеристик связывания модифицированного рецепторного белка поверхности к НВР с характеристиками связывания нативного рецепторного белка поверхности к НВР;

(v) обнаружение рецепторного белка поверхности к НВР, демонстрирующего характеристики связывания, которые являются, по существу, модулированными относительно характеристик связывания нативного рецепторного белка поверхности к НВР; и

(vi) получение модифицированного рецепторного белка поверхности к НВР, демонстрирующего характеристики связывания, которые являются, по существу, модулированными относительно характеристик связывания нативного рецепторного белка поверхности к НВР, для применения в качестве вакцины.

Согласно вышеуказанному способу обнаруженный рецепторный белок поверхности к НВР, демонстрирующий, по существу, модулированные характеристики связывания относительно характеристик связывания нативного рецепторного белка поверхности к НВР, можно применять для получения иммуногенных составов, например, посредством получения рецепторного белка поверхности к НВР рекомбинантным способом, выделения белка поверхности к НВР и получения вакцинного состава, содержащего рецепторный белок поверхности к НВР.

Согласно следующим вариантам реализации настоящее изобретение включает способы оценки перекрестной реактивности антител против вариантов рецепторного белка поверхности. Соответственно настоящее изобретение также включает способ оценки перекрестной реактивности антител против вариантов рецепторного белка поверхности, причем указанный способ включает:

(i) обеспечение множества последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих рецепторные белки поверхности;

(ii) определение вариаций последовательности нуклеиновой кислоты среди множества рецепторных белков поверхности;

(iii) выбор варианта участка рецепторного белка поверхности;

(iv) связывание последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей N-концевой или C-концевой участок варианта рецепторного белка поверхности, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, восприимчивый к ферментативному биотинилированию, и последовательностью нуклеиновой кислоты, способной контролировать экспрессию в клетке-хозяине, для образования последовательности химерной нуклеиновой кислоты;

(v) введение последовательности химерной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин и экспрессию последовательности химерной нуклеиновой кислоты для получения слитого полипептида, содержащего N-концевой или C-концевой участок варианта рецепторного белка поверхности, слитый с пептидом, восприимчивым к биотинилированию;

(vi) получение лизатов клеток из клеток-хозяев;

(vii) нанесение экстрактов клеток на сенсibiliзированный стрептавидином материал подложки для иммуноанализа; и

(viii) нанесение антител на материал подложки для иммуноанализа, промывку вещества подложки для иммуноанализа и нанесение меченых вторых конъюгатов с целью оценки перекрестной реактивности между антителом и вариантом участка рецепторного белка поверхности.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид, восприимчивый к биотинилированию, дополнительно может содержать последовательность нуклеиновой кислоты достаточной длины, позволяющую после экспрессии проводить удлинение полипептида для такого слияния полипептида, при котором рецепторный белок поверхности находится на отдалении от вещества подложки для иммуноанализа, и в результате является полностью доступным для связывания антител. Сенсibiliзированный стрептавидином материал подложки для иммуноанализа может являться любыми материалом подложки, включая, например, планшет для ELISA.

Согласно следующим вариантам реализации настоящее изобретение включает способы оценки перекрестно-реактивных или защитных свойств вариантов антител против рецепторного белка поверхности, причем указанный способ включает:

(i) обеспечение множества последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих рецепторные белки поверхности;

(ii) определение вариации последовательности нуклеиновой кислоты среди множества рецепторных белков поверхности;

(iii) обеспечение клетки-хозяина, содержащей контр-селектируемый маркер, способный заменять последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рецепторный белок поверхности;

(iv) амплификацию методом ПЦР множества вариантов участков одной или нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих рецепторный белок поверхности, для получения множества ПЦР-продуктов, кодирующих варианты рецептора поверхности, причем амплификацию методом ПЦР проводят способом, который позволяет осуществлять встраивание ПЦР-продуктов в клетки-

хозяева, содержащие контр-селектируемый маркер, и причем ПЦР-продукты содержат уникальную чужеродную последовательность нуклеиновой кислоты для обнаружения каждого ПЦР-продукта;

(v) введение и экспрессию множества ПЦР-продуктов в клетки-хозяева, содержащие контр-селектируемый маркер, для обеспечения библиотеки антигенных вариантов HIVP; и

(vi) применение всей библиотеки или ее части в иммунологическом анализе *in vivo* или *in vitro* для анализа перекрестно-реактивных или перекрестно-защитных свойств библиотеки или ее части.

Иммунный анализ *in vivo* или *in vitro* может являться любым анализом, включая любой анализ ELSA, функциональный иммунологический анализ или модель инфекции на животных.

Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ оценки эффективности вакцины для предотвращения колонизации верхних дыхательных путей млекопитающих штаммом грамотрицательных бактерий, экспрессирующим вариант рецепторного белка поверхности, причем указанный способ включает:

(i) обеспечение (a) линии трансгенных мышей, экспрессирующих рецептор SEACAM млекопитающих из вида-хозяина патогена, на который направлена вакцина, и (b) линии мышей, идентичных с генетической точки зрения линии трансгенных мышей, но не экспрессирующих рецептор SEACAM;

(ii) демонстрацию того, что грамотрицательный штамм бактерий, экспрессирующий вариант рецепторного белка поверхности, способен колонизировать верхние дыхательные пути линии трансгенных мышей и не способен колонизировать верхние дыхательные пути линии мышей, не экспрессирующих рецептор SEACAM;

(iii) определение того, приводит ли иммунизация антигенами, полученными из рецепторного белка поверхности, к отсутствию колонизации верхних дыхательных путей трансгенных мышей, инфицированных грамотрицательным штаммом бактерий, экспрессирующим вариант рецепторного белка поверхности;

(iv) определение того, приводит ли введение антисыворотки из животных, иммунизированных антигенами, полученными из рецепторного белка поверхности, к отсутствию колонизации верхних дыхательных путей у нетрансгенных иммунизированных мышей, инфицированных грамотрицательным штаммом бактерий, экспрессирующих вариант рецепторного белка поверхности;

(v) получение библиотеки, содержащей участки рецепторного белка поверхности из грамотрицательного штамма бактерий, и применение библиотеки на модели колонизации верхних дыхательных путей животных для оценки колонизации верхних дыхательных путей животных, стимулированных вариантами рецептора поверхности; и

(vi) необязательно, выделение и получение ДНК, полученной из библиотеки, которая использовалась для стимулирования животного, и/или из образцов, полученных из стимулированных животных в соответствующие периоды времени после воздействия, и определение соотношения штаммов, экспрессирующих различные варианты рецептора.

После прочтения настоящего описания изобретения среднему специалисту в данной области техники, в целом, будет понятно, что согласно настоящему изобретению можно изготовить и получить серии различных модулированных полипептидов, все из которых являются модифицированными рецепторными белками поверхности к HIVP, причем модификация проведена таким образом, что модифицированный рецепторный белок поверхности к HIVP, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина. Все данные модулированные полипептиды и способы получения таких модулированных полипептидов включены в объем композиций и способов, предложенных в настоящей заявке.

Модифицированные полипептиды домена С-доли или домена N-доли удобно получать посредством обеспечения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рецепторный белок поверхности к HIVP, и модулирования нативной последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что полипептиды, содержащие модифицированный домен С-доли или домен N-доли, экспрессируются в рекомбинантном организме-хозяине, например в микробной клетке. Модуляции в последовательности нуклеиновой кислоты могут быть осуществлены с применением множества методик модификации нуклеиновой кислоты, которые, как правило, известны специалистам в данной области техники, включая, например, сайт-направленный мутагенез, целевой мутагенез, случайный мутагенез, добавление органических растворителей, перетасовку генов или комбинацию данных и других методик, известных специалисту в данной области техники, причем каждая методология разработана для нацеливания на петлевые домены домена С-доли или домена N-доли таким образом, что петлевой домен в данных доменах становится модифицированным. В качестве альтернативы модулированные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие модифицированные по размеру полипептиды домена С-доли или домена N-доли, можно получить *ab initio* с применением методик синтеза генов. Общие методики для получения и модификации последовательности нуклеиновой кислоты доступны специалисту в данной области техники, например, из руководства Green and Sambrook, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (33).

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы получения иммуногенной композиции. Соответственно в настоящем изобретении предложен способ получения иммуногенной композиции, включающий:

(a) обеспечение последовательности химерной нуклеиновой кислоты, содержащей функционально связанные компоненты:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к HIVP, получаемый из граммотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид был модифицирован таким образом, что он, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина; и

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, способную контролировать экспрессию в рекомбинантной клетке-хозяине;

(b) введение последовательности химерной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин и выращивание клетки-хозяина для получения полипептида, содержащего домен С-доли или домен N-доли;

(c) восстановление полипептида, содержащего домен С-доли или домен N-доли, из клетки-хозяина; и

(d) получение иммуногенной композиции.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован, и причем полипептид был модифицирован таким образом, что он, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен способ получения иммуногенной композиции, включающий:

(a) обеспечение последовательности химерной нуклеиновой кислоты, содержащей функционально связанные компоненты:

(i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий первый домен С-доли или первый домен N-доли рецепторного белка поверхности к HIVP, получаемый из граммотрицательного вида бактерий;

(ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий второй домен С-доли или второй домен N-доли рецепторного белка поверхности к HIVP, получаемый из граммотрицательного вида бактерий; и

(iii) последовательность нуклеиновой кислоты, способную контролировать экспрессию в рекомбинантной клетке-хозяине;

(b) введение последовательности химерной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин и выращивание клетки-хозяина для получения полипептида, содержащего первый и второй домены С-доли или первый и второй домены N-доли;

(c) восстановление полипептида, содержащего первый и второй домены С-доли или первый и второй домены N-доли, из клетки-хозяина; и

(d) получение иммуногенной композиции.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения первая и вторая нуклеиновые кислоты функционально связаны таким образом, что позволяют получить гетеромультимерный слитый полипептид, содержащий первый и второй домены С-доли или первый и второй домены N-доли, и причем указанный гетеромультимерный слитый полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина.

Согласно настоящему изобретению последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рецепторный белок поверхности к HIVP, связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, способной контролировать экспрессию рецепторного белка поверхности к HIVP в клетке-хозяине. Соответственно в настоящем изобретении также предложена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рецепторный белок поверхности к HIVP, связанная с промотором, способным контролировать экспрессию в клетке-хозяине. Последовательности нуклеиновой кислоты, способные контролировать экспрессию в клетках-хозяевах, которые можно использовать в настоящей заявке, включают любой промотор транскрипции, способный контролировать экспрессию полипептидов в клетках-хозяевах. Как правило, если выбирают бактериальный хозяин согласно настоящему изобретению, используют промоторы, полученные из бактериальных клеток, если в качестве хозяина выбирают грибок, тогда будут использовать промотор грибов, если в качестве хозяина выбирают клетку растения, будут использовать промотор растения, и т.д. Дополнительные элементы нуклеиновой кислоты, способные контролировать экспрессию в клетке-хозяине, включают терминаторы транскрипции, энхансеры и т.п., все из которых могут быть введены в химерные последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению химерные последовательности нуклеиновой кислоты, содержащие промотор, способный контролировать экспрессию в клетке-хозяине, связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к HIVP, получаемый из граммотрицательного вида бактерий, причем домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифициро-

ван, можно встроить в рекомбинантный вектор экспрессии, который обеспечивает надлежащую экспрессию в клетке-хозяине. Соответственно настоящее изобретение включает рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий функционально связанные компоненты:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, способную контролировать экспрессию в клетке-хозяине; и

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый или полученный из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид был модифицирован таким образом, что он, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина,

причем вектор экспрессии является подходящим для экспрессии в клетке-хозяине. Термин "подходящий для экспрессии в клетке-хозяине" означает, что рекомбинантный вектор экспрессии содержит последовательность химерной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, связанную с генетическими элементами, необходимыми для осуществления экспрессии в клетке-хозяине. Генетические элементы, которые в этой связи могут быть введены в вектор экспрессии, включают область термినации транскрипции, одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих гены-маркеры, одну или несколько точек начала репликации и т.п. Генетические элементы обычно являются функционально связанными, как известно специалисту в данной области техники, посредством связывания, например, промотора в направлении транскрипции 5'-3' с кодирующей последовательностью. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения вектор экспрессии также содержит генетические элементы, необходимые для встраивания вектора или его участка в геном клетки-хозяина. Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован.

В соответствии с настоящим изобретением вектор экспрессии может также содержать ген-маркер. Гены-маркеры, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, включают все гены, позволяющие отличать трансформированные клетки от нетрансформированных клеток, включая все селективируемые и скринируемые гены-маркеры. Ген-маркер может представлять собой маркер устойчивости, такой как маркер устойчивости к антибиотикам, например канамицину или ампициллину. Скринируемые маркеры, которые можно применять для обнаружения трансформантов посредством визуального осмотра, включают β -галактозидазу, β -глюкуронидазу (GUS) (патенты США №№ 5268463 и 5599670) и зеленый флуоресцентный белок (GFP, green fluorescent protein) (52).

Клетка-хозяин, которую можно особенно удобно использовать, представляет собой *Escherichia coli*. Получение векторов *E. coli* можно осуществить с применением общеизвестных методик, таких как расщепление рестриктазами, лигирование, безлигазное клонирование, гель-электрофорез, секвенирование ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и другие методологии. Широкое множество клонирующих векторов доступно для осуществления необходимых этапов, требуемых для получения рекомбинантного вектора экспрессии, включая векторы собственной разработки, сконструированные авторами настоящего изобретения. Среди векторов с системой репликации, функциональной в *E. coli*, присутствуют векторы, такие как серии векторов pUC или pET, и т.д. Как правило, данные клонирующие векторы содержат маркер, позволяющий проводить селекцию трансформированных клеток. Последовательности нуклеиновой кислоты могут быть введены в данные векторы, и векторы могут быть введены в *E. coli* посредством получения компетентных клеток, электропорации или с применением других методологий, хорошо известных специалисту в данной области техники. *E. coli* можно выращивать в соответствующей среде, такой как бульонная среда Лурия (Luria-Broth medium), и собирать. Рекомбинантные векторы экспрессии можно легко выделить из клеток после сбора и лизиса клеток. Общие указания относительно получения рекомбинантных векторов и выращивания рекомбинантных организмов также можно найти, например, в руководстве Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, Third Ed (33).

Получение рекомбинантных белков может осуществляться на всем протяжении роста штамма *E. coli*, предпочтительно посредством индукции экспрессии после периода роста для достижения значительной биомассы. Данный подход приводит к получению полипептида, содержащего домен С-доли или домен N-доли или домен С-доли или домен N-доли с модифицированными петлями. Затем полипептид можно восстановить, выделить и отделить от других компонентов клетки-хозяина посредством множества различных методик очистки белка, включая, например, металл-хелатную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на основе гидрофобного взаимодействия, обращенно-фазовую хроматографию, гель-фильтрацию и т.д. Дополнительные общие указания относительно очистки белков можно, например, найти в руководстве *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications* (53). Термин "восстановленный" в настоящей заявке означает, что полипептиды были получены в более или менее чистой форме. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, по существу, иммуногенный полипептид, содержащий домен С-доли рецепторного белка поверхности к НВР, получаемый из грамотрица-

тельного вида бактерий, причем домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован, можно получить согласно настоящему изобретению. Таким образом, полипептиды к НІВР, полученные согласно настоящему изобретению, можно получить, по существу, в чистой форме. Под "по существу, чистой" формой подразумевают, что иммуногенный белок отделен от других компонентов клетки-хозяина. В соответствии с настоящим изобретением иммуногенный белок является чистым по меньшей мере на 95% и более предпочтительно является чистым по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99%. В качестве альтернативы можно получить относительно неочищенные фракции, содержащие полипептид к НІВР, например, клетки, содержащие полипептиды, лизаты клеток, содержащие полипептиды, или фракции клеток, содержащие полипептид.

Согласно следующим вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта. Иммунный ответ можно вызвать посредством доставки иммуногенного белка или посредством доставки вектора экспрессии, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенный белок. Соответственно в настоящем изобретении также предложен способ индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту:

(а) иммуногена, содержащего полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина; или

(b) вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген, содержащий полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина; и причем иммуноген вводят или экспрессируют в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта.

В настоящем изобретении также предложено применение:

(а) иммуногена, содержащего полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина; или

(b) вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген, содержащий полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина;

для индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта.

В настоящем изобретении также предложено применение:

(а) иммуногена, содержащего полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина; или

(b) вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген, содержащий полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина;

при производстве лекарственного средства для индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта.

В настоящем изобретении также предложен:

(а) иммуноген, содержащий полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина; или

(b) вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген, содержащий полипептид, который содержит домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного вида бактерий, причем указанный полипептид, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком хозяина;

для индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере два домена С-доли или по меньшей мере два домена N-доли. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере три домена С-доли или по меньшей мере три домена N-доли.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован таким образом, что домен С-доли или домен N-доли, по существу, не способен связываться с железосвязывающим белком

хозяина.

Настоящее изобретение также охватывает иммуноген, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НІВР, причем домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен был модифицирован, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также охватывает иммуноген, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НІВР, причем домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен был модифицирован, для применения при предотвращении инфекции или заболевания, вызванных инфекционными грамотрицательными бактериями, включая бактерии, относящиеся к роду *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Histophilus*, *Pasteurella* или *Moraxella*.

Настоящее изобретение также охватывает иммуноген, содержащий домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НІВР, причем домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен был модифицирован, для применения при производстве лекарственного средства для предотвращения инфекции или заболевания, вызванных инфекционными грамотрицательными бактериями, включая бактерии, относящиеся к роду *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Histophilus*, *Pasteurella* или *Moraxella*.

Вакцинные препараты.

В настоящем изобретении также предложены вакцинные препараты. Таким образом, в настоящем изобретении также предложена вакцинальная композиция, содержащая антиген, полученный из рецепторного белка поверхности к НІВР из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем белок, полученный из рецепторного белка поверхности к НІВР, был модифицирован таким образом, что он по существу не способен связываться с железом-связывающим белком хозяина. Вакцинные композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат вакцину, содержащую полипептид, который содержит рецепторный белок поверхности к НІВР, домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НІВР, получаемый из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем указанный полипептид является модифицированным таким образом, что он по существу не способен связываться с железом-связывающим белком хозяина. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения вакцинный препарат содержит смесь доменов С-доли, относящихся к двум различным видам бактерий или к двум различным штаммам бактерий. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере два или по меньшей мере три домена N-доли или домена С-доли. Согласно следующим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения указанные по меньшей мере два или по меньшей мере три домена N-доли или домена С-доли образуют гетеромультимер. Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из множества петлевых доменов был модифицирован.

Вакцинные препараты согласно настоящему изобретению содержат иммуногенные полипептиды к НІВР в более или менее чистой форме. Таким образом, согласно настоящему изобретению можно получить по существу чистые полипептиды к НІВР и применять для получения вакцинных составов. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения можно получить более неочищенные препараты полипептида к НІВР и применять для получения вакцинных составов. Таким образом, например, в таких вариантах реализации настоящего изобретения для получения вакцинных составов можно применять клетки, лизаты клеток или фракции клеток, содержащие полипептиды к НІВР.

Для усиления иммунного ответа у субъекта композиции, предложенные в настоящей заявке, предпочтительно дополнительно содержат адьюванты, такие как фармакологические средства, цитокины или т.п. Подходящие адьюванты включают любое вещество, усиливающее иммунный ответ субъекта на иммуногенные полипептиды согласно настоящему изобретению. Неограничивающие примеры адьювантов включают цитокины, например ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-6, а также включают неорганические соли, например гидроксид алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция; масляные эмульсии, например минеральное масло, MF59, QS-21, Montamide ISA51 и ISA-720; Isocom, например ISCOMATRTX; производные микроорганизмов, например MPLA, белок, активирующий макрофаги, 2, вирусомы, LT/CT, CpG; природные полимеры, например полисахариды; и синтетические полимеры, например полиангидриды и полиэферы, обзор которых приведен в публикации Wilson-Welder et al. (54). Адьюванты можно вводить, например, в форме белков или других макромолекул одновременно, перед или после введения антигенов-полипептидов.

Дозы иммуногенных белков для субъектов-людей, как правило, варьируют от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 20 мг, предпочтительно от 10 мкг до приблизительно 3 мг. Однако точное необходимое количество будет варьировать в зависимости от возраста и общего состояния субъекта-реципиента, который получает лечение, тяжести состояния, лечение которого проводят, конкретного

доставляемого препарата, сайта введения, а также других факторов. Соответствующее терапевтически эффективное количество легко может определить специалист в данной области техники. Таким образом, "терапевтически эффективное количество" композиций согласно настоящему изобретению представляет собой количество, достаточное, чтобы вызвать лечение или предотвращение симптомов заболевания или состояния, или предотвращение колонизации патогенными бактериями, и будет находиться в относительно широком диапазоне, который можно определить посредством общепринятых исследований.

Вакцинные препараты, содержащие иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению, также предпочтительно содержат носители, вспомогательные вещества и вспомогательные средства, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, буферные вещества, поддерживающие pH, и т.п., которые могут присутствовать во вспомогательном веществе или носителе. Данные носители, вспомогательные вещества и вспомогательные средства, как правило, представляют собой фармацевтические средства, не вызывающие иммунного ответа у субъекта-реципиента, которые можно вводить без излишней токсичности. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают, но не ограничены указанными, жидкости, такие как вода, солевой раствор, полиэтиленгликоль, гиалуроновая кислота, глицерол и этанол. В препараты могут быть также включены фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, фосфаты, сульфаты и т.п.; а также соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, бензоаты и т.п. Также предпочтительно, хотя и не обязательно, что препарат содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, которое выступает в качестве стабилизатора, в частности, с целью стабилизировать полипептиды согласно настоящему изобретению. Примеры подходящих носителей, которые также выступают в качестве стабилизаторов для пептидов, включают, без ограничений, декстрозу, сахарозу, лактозу, сорбитол, инозитол, декстран и т.п. фармацевтической степени чистоты. Другие подходящие носители включают, снова без ограничений, крахмал, целлюлозу, фосфаты натрия или кальция, лимонную кислоту, глицин, полиэтиленгликоли (ПЭГ) и комбинации указанных веществ.

Вакцинные препараты согласно настоящему изобретению можно использовать для предотвращения инфекции или заболевания, вызванных инфекционными грамотрицательными бактериями, включая, без ограничения, бактерии, относящиеся к роду *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Histophilus*, *Pasteurella* или *Moraxella*, включая, без ограничений, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Neisseria meningitidis*. Вакцинные препараты можно использовать для иммунизации любого позвоночного субъекта, включая любой позвоночный субъект, экспрессирующий железо-связывающие белки хозяина, и включая, без ограничения, любого млекопитающего субъекта, включая любого субъекта-человека, субъекта-свинью, субъекта-быка, субъекта-лошадь, субъекта-овцу, субъекта-козу, субъекта-собаку, субъекта-кошку, субъекта-зайца, а также любого субъекта-жвачное животное и субъекта-мышь. Другие позвоночные субъекты, которых можно иммунизировать, включают любого субъекта-птицу и субъекта-рыбу. Вакцинные препараты согласно настоящему изобретению могут демонстрировать усиленный перекрестно-реактивный и/или перекрестно-защитный иммунологический ответ в реципиентном организме-хозяине. Также следует отметить, что вакцинные препараты согласно настоящему изобретению могут предотвращать инфекцию и/или колонизацию инфекционными грамотрицательными бактериями, включая бактериальную колонизацию дыхательных путей или половых путей позвоночного субъекта.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину, содержащую рецепторный белок поверхности к НРВ, домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НРВ, причем домен С-доли или домен N-доли содержит множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен был модифицирован, для применения при предотвращении инфекции или заболевания, вызванных инфекционными грамотрицательными бактериями, включая бактерии, относящиеся к роду *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Histophilus*, *Pasteurella* или *Moraxella*.

Исследование вакцинных препаратов.

Согласно настоящему изобретению эффективность вакцинных препаратов согласно настоящему изобретению можно оценить, например, посредством определения титра антител, присутствующих в сыворотке крови субъектов, иммунизированных препаратом вакцины, например, посредством проведения анализа методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Соответственно, настоящее изобретение также включает способ оценки эффективности вакцинного препарата, содержащего домен С-доли или домен N-доли рецепторного белка поверхности к НРВ, получаемый из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем указанный полипептид является модифицированным таким образом, что он по существу не способен связываться с железо-связывающим белком хозяина, причем указанный способ включает:

(а) введение позвоночному субъекту вакцинного препарата, содержащего рецепторный белок поверхности к НРВ, или домен С-доли или домен N-доли рецепторного полипептида поверхности к НРВ, получаемый из грамотрицательного патогенного вида бактерий, причем указанный полипептид является модифицированным таким образом, что он по существу не способен связываться с железо-связывающим белком хозяина;

- (b) получение сыворотки крови от позвоночного субъекта; и
- (c) анализ сыворотки крови на наличие антител против рецепторных полипептидов поверхности к НВР.

Сыворотку крови позвоночного животного можно проанализировать после введения одной или нескольких (например, 2, 3, или 4) доз вакцинного препарата. Анализы, такие как анализы ELISA, можно проводить с применением изолятов рецепторного белка поверхности к НВР из одного или нескольких различных штаммов или видов микроорганизмов. Анализы ELISA могут включать связывание рецепторного полипептида поверхности к НВР с белком-носителем, таким как мальтоза-связывающий белок. Если анализируют реактивность антитела против нескольких изолятов рецепторного белка поверхности к НВР, возможно оценить перекрестную реактивность вакцинного препарата.

Режимы вакцинации.

Как очевидно специалистам в данной области техники в свете идей настоящей спецификации, вакцинацию вышеописанными полипептидами или последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими такие полипептиды (ДНК-вакцинами), можно осуществлять в одной дозе, непрерывно или периодически в течение всего курса лечения. Способы определения наиболее эффективных способов и доз введения хорошо известны специалисту в данной области техники и будут варьировать в зависимости от вектора доставки, природы композиции, конкретной искомой профилактики или терапии, клеточ-мишеней и субъекта, который получает лечение. Одно и несколько введений можно осуществлять с применением уровня и схемы доз, выбранных соответствующим медицинским персоналом.

Введения вышеописанных фармацевтических препаратов можно осуществлять в одной дозе, непрерывно или периодически в течение всего курса лечения. Доставка наиболее часто будет осуществляться с применением обычной иглы и шприца для жидких композиций и жидких суспензий, содержащих композиции в форме частиц. Кроме того, в данной области техники известны различные жидкие безыгольные инъекторы, которые можно применять для введения настоящих композиций. Путь доставки вакцины может варьировать. Таким образом, вакцины согласно настоящему изобретению можно доставлять внутривенным, подкожным, внутримышечным, интравагинальным, интраперитонеальным, интраназальным, пероральным путями или посредством других чресслизистых путей введения. Способы определения наиболее эффективных способов и доз введения хорошо известны специалисту в данной области техники и будут варьировать в зависимости от вектора доставки, композиции терапии, клеточ-мишеней и субъекта, который получает лечение. Одно и несколько введений можно осуществлять с применением уровня и схемы доз, выбранных лечащим врачом или ветеринаром.

Примеры

Ниже приведены примеры конкретных вариантов реализации настоящего изобретения для осуществления настоящего изобретения. Примеры предложены исключительно с иллюстративной целью и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо способом.

Пример 1. Иммунный ответ на домен С-доли TbpV, домен N-доли TbpV и их смесь.

В данном примере приведена иллюстрация значения применения субдоменов рецепторных белков TbpV для получения более желательного иммунного ответа. Под "более желательным иммунным ответом" авторы настоящего изобретения подразумевают магнитуду ответа антитела и перекрестную реактивность антитела в отношении вариантов белков TbpV.

На фиг. 3А представлены результаты первого эксперимента данного примера, в котором различных видов-хозяев (мышей, кроликов и свиней) иммунизировали интактными TbpV из патогена человека *Neisseria meningitidis* (штамм B16B6 - SEQ ID NO: 117) или из патогена свиньи *Actinobacillus pleuropneumoniae* (штамм H49 - SEQ ID NO: 2). Сыворотку иммунизированных животных исследовали против иммунизирующего антигена в анализе ELISA собственной разработки (см. ниже). Результаты иллюстрируют, что магнитуда (титр) ответа антител свиньи на TbpV из патогена свиньи *A. pleuropneumoniae* (серый столбец) была существенно ниже, чем у других видов-хозяев, по сравнению с TbpV из патогена человека *N. meningitidis* (черный столбец). Данный результат свидетельствует, что связывание трансферрина хозяина влияло на развитие ответа антител против TbpV.

Второй эксперимент (фиг. 3В) включал иммунизацию свиней интактным TbpV из патогена быка *Mannheimia haemolytica* (штамм H196 - SEQ ID NO: 206) или интактным TbpV (SEQ ID NO: 2), N-долей TbpV (SEQ ID NO: 8) или С-долей TbpV (SEQ ID NO: 6) из патогена свиньи *Actinobacillus pleuropneumoniae* (штамм H49). На фиг. 3В представлен иммунный ответ отдельных свиней (группы столбцов) до иммунизации (белый столбец), после первой иммунизации (светло-серый столбец), после второй иммунизации (темно-серый столбец) и после третьей иммунизации (черный столбец). Следует отметить, что титры выражены в форме двоичного логарифма, чтобы при оценке титра отразить использованные двукратные разведения. У большинства свиней после третьей иммунизации наблюдались высокие титры антител (от 26000 до 256000), но у нескольких свиней, иммунизированных интактным TbpV или N-долей TbpV из *A. pleuropneumoniae*, наблюдались существенно уменьшенные титры (от 5300 до 8000). Наблюдение, что у двух из четырех свиней, иммунизированных интактным TbpV, и у трех свиней, иммунизированных N-долей TbpV, наблюдались существенно уменьшенные титры, свидетельствует, что связывание трансферрина хозяина влияет на развитие ответа антитела только в подпопуляции животных.

Третий эксперимент, продемонстрированный в данном примере (фиг. 3С), был разработан для оценки способности сыворотки против интактного TbpB и его субдоменов реагировать с различными типичными TbpB из патогенов свиней с целью оценки перекрестной реактивности антисыворотки. Свиней иммунизировали интактным TbpB (SEQ ID NO: 2), доменом С-доли TbpB (SEQ ID NO: 6), доменом N-доли TbpB (SEQ ID NO: 8) или смесью N-доли TbpB и С-доли TbpB. Сыворотку исследовали против (i) интактного TbpB из штамма H49 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 2), (ii) интактного TbpB из штамма HP5 *Haemophilus parasuis*, (SEQ ID NO: 115) или (iii) интактного TbpB из штамма H87 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 12).

Результаты, представленные на фиг. 3С, демонстрируют, что домен С-доли TbpB из штамма H49 *A. pleuropneumoniae* вызывает больший перекрестно-реактивный иммунный ответ, чем интактный TbpB (более высокий титр против гетерологичного TbpB из штамма H87) или N-доля TbpB (более высокие титры против штаммов H87 и HP5). TbpB, которые использовали в данном анализе, были разработаны для иллюстрации общего разнообразия последовательностей и структурного разнообразия, представленного в клинических изолятах *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* и *Haemophilus parasuis*, выделенных из свиней по всему миру (SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 107 - SEQ ID NO: 115) (фиг. 4). Таким образом, в данном примере авторы настоящего изобретения не ограничивали анализ одним патогеном свиньи, но нацелили исследование на три различных патогена свиней, которые являются проблемой мирового промышленного свиноводства. Тот факт, что данные патогены характеризуются общим механизмом получения железа из хозяина, обеспечивает уникальную возможность разработать вакцину из общего антигена - TbpB, направленную на три данных патогена. Полученные результаты свидетельствуют, что с применением в качестве антигена одного или нескольких доменов С-доли возможно получить перекрестно-реактивный ответ широкого диапазона против патогенов свиней со всего мира и, таким образом, можно рассматривать применение вакцинации для устранения данных патогенов во всем мире.

Неожиданно усиленная перекрестная реактивность, вызванная доменом С-доли, сохранялась, даже когда С-долю смешивали с N-долей в иммунизирующей смеси (фиг. 3С, "N+C доля"). Данные результаты свидетельствуют, что антигены с меньшими вариабельными петлевыми областями ("С-доля" по сравнению с "N-долей", фиг. 1) способны индуцировать больший перекрестно-реактивный ответ антитела, и что данная усиленная способность индуцировать перекрестно-реактивный иммунный ответ сохраняется, даже когда С-долю объединяют с другими антигенами в иммунизирующей смеси. Более конкретно данные результаты свидетельствуют, что тенденция N-доли индуцировать более штаммспецифичный иммунный ответ способна исключительно эффективно ингибироваться индукцией перекрестно-реактивного иммунного ответа С-долей, когда С-доля физическим способом связана с N-долей. Другими словами, неожиданно было установлено, что предрасположенность N-доли индуцировать более специфичный иммунный ответ, по существу, уменьшается, когда N-долю смешивают с С-долей. По имеющейся информации данный феномен не был описан ранее.

Полученные результаты также свидетельствуют, что существует уменьшенный ответ против интактного TbpB и N-доли TbpB по сравнению с С-долей (фиг. 3В, 3С), который может свидетельствовать, что связывание трансферрина хозяина - черта, присущая исключительно интактному TbpB и N-доле TbpB, - может модулировать иммунный ответ у свиней.

Важно отметить, что в отличие от ранее опубликованных исследований авторы настоящего изобретения для измерения уровней антител не использовали стандартный метод ELISA, поскольку обнаружили значительную неточность стандартного метода ELISA. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что в отличие от распространенного предположения очищенные белки не обязательно связываются с планшетом для ELISA случайным образом, что приводит к потенциальной серьезной погрешности или неточности при оценке связывания антитела с эпитопами на поверхности белка. В частности, авторы настоящего изобретения отметили, что TbpB, и в особенности N-доля TbpB, фактически связывается с твердой поверхностью планшета для ELISA в одной ориентации, скрывая область "кэпа" N-доли, в результате чего связывание трансферрина не может быть обнаружено (фиг. 5). Напротив, рекомбинантный слитый белок с партнером N-концевым мальтозасвязывающим белком (Mbp), который являлся предшественником очищенной N-доли TbpB, был эффективным в связывании трансферрина (фиг. 5). Данный феномен наблюдался в случае N-долей TbpB из патогенов человека, свиньи и крупного рогатого скота и, в меньшей степени, интактных TbpB. Поскольку данные белки в достаточной степени отличаются последовательностью (<30% общей идентичности последовательности), этот факт свидетельствует, что данное свойство не является уникальным для конкретного белка, но могут существовать варьирующие степени, в которых неслучайное связывание оказывает влияние на твердофазный анализ связывания.

Чтобы преодолеть данную неточность, авторы настоящего изобретения разработали способ связывания рекомбинантных белков с планшетами для ELISA, сенсублизованными стрептавидином, посредством остатка биотина, который добавляли ферментативным способом к N-концу в ходе экспрессии белка в цитоплазме. Как показано на фиг. 5, добавление биотинилированного ферментативным способом N-концевого пептида восстанавливало способность N-доли TbpB связываться с трансферрином. Данный подход может являться более эффективным для экспонирования области связывания трансферрина по сравнению с результатами, полученными с N-долей Tbp, слитой с Mbp, как показано на левой и правой

частях фигуры. Данный новый и инновационный формат анализа ELISA использовали во всех анализах ELISA, проведенных авторами настоящего изобретения, для контроля реактивности антител, поскольку данный формат обеспечивал полный и равный доступ ко всем эпитопам белка-мишени, тем самым обеспечивая истинное сравнение при оценке степени перекрестной реактивности.

Рекомбинантные антигены для экспериментов по иммунизации были получены в цитоплазме *E. coli* с применением вектора экспрессии T7 собственной разработки, кодирующего N-концевую полигистидиновую метку, мальтозасвязывающий белок и сайт расщепления протеазой вируса гравировки табака (TEV). Рекомбинантные слитые белки выделяли методом хроматографии Ni-NTA (никель-нитрилацетоацетат), антигены высвобождали посредством расщепления (TEV) и очищали с применением комбинации хроматографии на основе Ni-NTA и Q-Сефарозы.

Мышей FVB (альбиносы, гаплотип MHC H2q, получены из питомника Charles River), новозеландских белых кроликов возрастом 3 месяца и свиней породы большой белый Ландрас, скрещивание F1, возрастом 51 день использовали для экспериментов по иммунизации, результаты которых представлены на фиг. 3А. Очищенные рекомбинантные белки смешивали с фосфатным буферным раствором и 33% (фиг. 3А) или 20% (фиг. 3В, 3С) Emulsigen D (MVP Technologies) до конечной концентрации 25 мкг в 0,1 мл для мышей, 50 мкг в 0,5 мл для кроликов и 100 мкг в 2 мл для свиней. По три инъекции вводили подкожно мышам и кроликам и подкожно (фиг. 3А) или внутримышечно (фиг. 3В, 3С) свиньям. Животных иммунизировали в день 0, 21, 42, конечный забор крови проводили в день 56.

Сыворотку, отобранную в неделю 8, исследовали против типичных белков методом твердофазного анализа ELISA собственной разработки. Рекомбинантные слитые белки, которые использовали в анализе ELISA, были получены в цитоплазме *E. coli* с применением вектора экспрессии T7 собственной разработки, кодирующего N-концевую оптимизированную последовательность биотинилирования, полигистидиновую метку, мальтозасвязывающий белок и сайт расщепления протеазой вируса гравировки табака (TEV). Данные белки биотинилировали *in vivo* по N-концевой последовательности биотинилирования так, чтобы белки можно было наносить на сенсibiliзированные стрептавидином планшеты для ELISA.

Неочищенных экстрактов, полученных в экспериментах по экспрессии белка небольшого масштаба в течение ночи с вектором экспрессии для биотинилированных слитых белков, было достаточно для насыщения планшетов для ELISA согласно ранее проведенным экспериментам по оптимизации. Разведения антисыворотки, представляющей интерес, готовили в 2,5%-м обезжиренном молоке в фосфатном буферном растворе (ФБР) и наносили на планшеты в течение 1 ч при комнатной температуре. После удаления и промывки первичное антитело обнаруживали с применением конъюгированных с ПХ антител козы против IgG мыши, против IgG кролика или против IgG свиньи в разведении 1:100000 (1:25000 для антител против IgG свиньи) в течение одного часа при комнатной температуре. Титр выражен в виде величины, обратной последнему разведению, с $A_{450} > 0,3$ (более среднего значения, плюс три стандартных отклонения анализа фона в лунках без добавления сыворотки).

Расчет СОС (стандартной ошибки среднего) проводили с применением дисперсионного анализа ANOVA с критерием Тьюки HSD (истинное статистически значимое различие), который проводили апостериорно. Статистическая обработка показала, что для всех образцов сыворотки H49 значительно отличался от H87, и что N-доля значительно отличалась от С-доли или N+С-доли. Звездочки на фиг. 3С обозначают конкретные пары иммунизация/белок, значительно отличающиеся от С-доли или N+С-доли, которые исследовали против H49.

Пример 2. Получение тримера С-доли TbpV из патогена свиньи.

В данном примере авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что три рекомбинантных сконструированных С-доли, которые представляют широкое разнообразие TbpV, присутствующих в трех патогенах свиней, могут быть связаны вместе с сохранением антигенности. Сконструированные С-доли, которые использовали в данном эксперименте, были получены из *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* и *Haemophilus parasuis* (фиг. 4). Таким образом, гены, кодирующие С-доли TbpV из штаммов H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 6), H57 *A. suis* (SEQ ID NO: 35) и H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 22), были связаны с образованием гена, кодирующего один полипептид, охватывающий три С-доли (SEQ ID NO: 40), см. чертеж А на фиг. 6. Существуют относительно короткие пептиды, соединяющие вторичные структурные элементы С-доли (отмечены подчеркиванием) в данном тримере С-доли. Связывающие пептиды состоят из подлинной межпетлевой последовательности отдельных доменов С-доли. На чертеже В фиг. 6 представлено получение тримера С-доли и сравнение с препаратами рекомбинантной сконструированной N-доли и С-доли TbpV из штамма M982 патогена человека *N. meningitidis*. Результаты свидетельствуют, что тример С-доли получен в подходящем количестве и является стабильным. Однако препарату, представленному на фиг. 6, требуется дополнительная очистка перед применением в экспериментах по иммунизации.

Поскольку значительные препятствия для получения стабильного тримера С-доли отсутствовали, тример С-доли получали и очищали для проведения эксперимента по иммунизации для определения того, сохраняет ли данный тример иммуногенность. Как продемонстрировано на фиг. 7, тример С-доли был способен индуцировать иммунный ответ против трех типичных TbpV; данный результат свидетельствует, что объединение трех отдельных С-долей, по существу, не изменяет их иммунологических свойств.

Полученные результаты также свидетельствуют, что один белковый антиген может быть способен индуцировать иммунный ответ, способный противостоять большинству, если не всем штаммам патогенов свиньи *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* и *Haemophilus parasuis*, демонстрируя потенциальную перспективу для разработки перекрестно-защитных вакцин свиней широкого диапазона.

Пример 3. Уменьшение петлевых областей в N-доле TbpV *A. Pleuropneumoniae*.

В данном примере петлевые области домена N-доли трех типичных TbpV из патогенов свиней модифицировали для определения их влияния на индукцию перекрестно-реактивного иммунного ответа. Три типичных TbpV получали из штамма H57 *A. suis* (SEQ ID NO: 28), штамма H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 12) и штамма H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 2). Были выбраны данные конкретные TbpV, поскольку, помимо того, что данные TbpV иллюстрируют разнообразие последовательностей, для них были доступны структурные данные высокого разрешения; штамма H57 *A. suis* (3PQU.pdb), штамма H87 *A. pleuropneumoniae* (3PQS.pdb) и штамма H49 *A. pleuropneumoniae* (3HOL.pdb). Процесс уменьшения петли привел к суммарной потере 74 аминокислот (297 - 224) в N-доле TbpV из штамма H57 *A. suis* (SEQ ID NO: 36, 38), 45 аминокислот (248 - 203) в N-доле TbpV из штамма H87 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 24, 26) и 27 аминокислот (274-247) в N-доле TbpV из штамма H49 *A. pleuropneumoniae* (SEQ ID NO: 8, 10). Схема уменьшения петли для штамма H49 *A. pleuropneumoniae* с иллюстративной целью более подробно описана ниже. В каждом случае первая указанная SEQ ID относится к последовательности N-доли TbpV и вторая SEQ ID относится к сконструированному уменьшению петли.

Для разработки уменьшения петли структуру TbpV из штамма H49 (3HOL.pdb) накладывали на структуру TbpV из штамма H87 (3PQS.pdb) при одновременной визуализации выравнивания нескольких последовательностей ряда типичных TbpV из патогенов свиней. Посредством исследования структуры и областей вариации были обнаружены несколько областей для потенциального уменьшения петли, которые согласно прогнозированию не нарушают общую структуру N-доли. Данные области включают петли 1, 5, 8a, 8c и 12 согласно стандартной номенклатуре (фиг. 2) и приведены на фиг. 8 на структурных моделях N-доли TbpV, вид сбоку (чертеж А) и вид сверху (чертеж В). Уменьшение петли было разработано для минимизации потенциального нарушения общей укладки и структуры N-доли посредством выбора соответствующих замен аминокислот, необходимых в дополнение к удалению аминокислот. Аминокислотная последовательность исходной N-доли (верхняя последовательность) и модифицированной N-доли (нижняя последовательность) приведены на выравнивании последовательностей на фиг. 8, чертеж С, где петлевые области выделены серым цветом и показаны серым шрифтом. Последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность, продемонстрированную на чертеже С, оптимизировали для экспрессии в штамме *E. coli*, а затем синтезировали.

Аналогичную стратегию использовали для получения уменьшения петли для N-долей TbpV из штамма H87 *A. pleuropneumoniae* и штамма H57 *A. suis*, поскольку данные N-доли иллюстрируют значительное разнообразие последовательностей и структурное разнообразие TbpV из патогенов свиней (фиг. 4), и соответствующие структуры являются доступными (3PQS.pdb и 3PQU.pdb) (12). Возможность получения сконструированных антигенов, которые в совокупности могут индуцировать перекрестно-реактивный ответ против областей N-доли большинства, если не всех клинических изолятов, обладает значительным потенциалом для увеличения эффективности вакцины, направленной на три патогена свиней.

Полученные в результате гены клонировали в вектор экспрессии собственной разработки, который кодирует N-концевую полигистидиновую область, мальтозасвязывающий белок и сайт расщепления протеазой TEV (вируса гравировки табака), предшествующие кодируемой последовательности клонированной N-доли. Плазмиду экспрессии для сконструированной версии N-доли TbpV из штамма H49 *A. pleuropneumoniae* трансформировали в экспрессионный штамм ER256 *E. coli*, который несет хромосомную копию гена РНК-полимеразы T7, встроенную ниже промотора *lacZ*. Анализ экспрессии генов небольшого масштаба проводили с применением самоиндуцируемой среды (55), которая характеризуется репрессией *lac*-промотора глюкозой и индукцией лактозой. Таким образом, с применением конкретного соотношения глюкозы к лактозе в среде экспрессию РНК-полимеразы T7 оптимально начинают в середине логарифмического роста. После выращивания в течение ночи клетки лизировали с применением шариковой мельницы для лизиса клеток, рекомбинантные белки захватывали с применением смолы Ni-NTA или смолы Tf свиньи-Сефароза, промывали, и связавшиеся белки элюировали в буфере для ДСН-ПААГ.

Как продемонстрировано на фиг. 9, уменьшение петли в N-доле TbpV из штамма H49 *A. pleuropneumoniae*, штамма H57 *A. suis* или штамма H87 *A. pleuropneumoniae* привело к получению стабильных белков, то есть не препятствовало общей укладке N-доли и обеспечило получение материала, подходящего для иммунизации. На верхнем чертеже представлены рекомбинантные белки, полученные в эксперименте по экспрессии небольшого масштаба, которые захватывали на смоле Ni-NTA с интактными TbpV и N-долями TbpV дикого типа в качестве контролей. Результаты также показали, что в отличие от белка дикого типа мутантные белки больше были, по существу, не способны связываться с трансферрином свиньи (Tf). Таким образом, как продемонстрировано на среднем чертеже, сконструированные N-доли не захватывались Tf свиньи-Сефарозой. На нижнем чертеже материал, представленный на верхнем

чертеже, использовали в ходе твердофазного анализа связывания с применением конъюгированного с ПХ трансферрина свиньи, и в отличие от контролей сконструированные N-доли не демонстрировали какой-либо активности связывания. Авторы настоящего изобретения предполагают, что данные белки будут характеризоваться усиленной иммуногенностью в нативном хозяине - свиньях. Таким образом, данный пример демонстрирует, что возможны стратегии удаления антигенно вариабельных областей в N-доле белков TbpV, и что такое удаление может привести к увеличенной иммуногенности.

Пример 4. Перекрестная реактивность C-долей TbpV *N. meningitidis*.

В данном примере продемонстрировано применение сконструированных производных TbpV из патогена человека *Neisseria meningitidis* согласно настоящему изобретению. На первом этапе авторы настоящего изобретения исследовали разнообразие TbpV из *N. meningitidis* и убедились, что получают репрезентативный ряд TbpV для оценки перекрестной реактивности. На фиг. 10 представлено общее разнообразие TbpV штаммов *N. meningitidis*, которые были собраны по всему миру в течение длительного периода времени, а также дополнительные последовательности из *Neisseria Bacterial Isolate Genome Sequence Database* (BIGSDB <http://pubmlst.org/neisseria/X56>) (41). Последовательности типичного ряда TbpV (SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 123; SEQ ID NO: 132-SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 177 и SEQ ID NO: 178) из штаммов, отмеченных на фиг. 10A стрелками, двойными стрелками или линиями, включены в настоящую заявку для характеристики разнообразия последовательностей в каждой группе. Существует четыре основные филогенетические группировки TbpV *N. meningitidis*. Группа 1 включает штаммы, содержащие TbpV изотипа I. TbpV изотипа I, как правило, являются меньшими (приблизительно 65-70 кДа) по сравнению с TbpV изотипа II (80-85 кДа). Сравнение последовательностей посредством выравнивания нескольких последовательностей позволило выяснить, что различие размеров в значительной степени объясняется тем, что в TbpV изотипа II C-доля является большей. TbpV изотипа II разделяют на три основные филогенетические группы (группы 2-4, фиг. 10A).

Филогенетическое дерево, иллюстрирующее разнообразие последовательностей C-долей TbpV (фиг. 10B), подтверждает вывод о том, что последовательности C-доли в значительной степени отвечают за идентификацию двух изотипов TbpV. Члены Группы 2 на фиг. 10A не образуют одну группу на филогенетическом дереве C-доли, но распределены по всему дереву на фиг. 10B; это свидетельствует, что группа 2 в значительной степени определяется последовательностями N-доли. Данный вывод говорит о том, что, если иммунологическую перекрестную реактивность планируют определять реактивностью против C-доли, конкретные представители группы 2 не будут требоваться. Напротив, стрелки и линии, которые использовали для указания на ряд последовательностей TbpV для иллюстрации общего разнообразия TbpV, не в достаточной степени представляют общее разнообразие C-доли, и поэтому для обеспечения максимально всестороннего представления разнообразия C-доли были выбраны два дополнительных штамма. Последовательности C-доли из штаммов, отмеченных стрелками, двойными стрелками или линиями, включены в настоящую заявку для обеспечения типичного примера разнообразия последовательностей (SEQ ID NO: 87; SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 147-SEQ ID NO: 163).

Чтобы ответить на вопрос, могут ли вакцины, нацеленные на TbpV из *N. meningitidis*, индуцировать иммунный ответ, направленный против *N. gonorrhoeae*, авторы настоящего изобретения провели анализ разнообразия последовательностей TbpV и C-долей TbpV из *N. gonorrhoeae*. В анализ были включены последовательности типичных TbpV и C-долей TbpV из исследования *N. meningitidis* (фиг. 10; SEQ. ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 123; SEQ ID NO: 132-SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 177 и SEQ ID NO: 178). Как продемонстрировано на фиг. 26A, TbpV *N. gonorrhoeae* наиболее близко связаны с TbpV изотипа 2 и образуют две подгруппы в пределах кластера изотипа 2 *N. meningitidis*. Это свидетельствует, что при применении стратегий на основе сайт-специфических мутантов рекомбинантного TbpV в качестве предпочтительных антигенов вакцины можно достичь перекрестной защиты широкого диапазона в первую очередь с использованием антигенов, полученных из менингококковых TbpV. Фиг. 26B демонстрирует, что, в отличие от ситуации с интактными TbpV, C-доли TbpV *N. gonorrhoeae* отличаются от подгруппы C-долей из *N. meningitidis*. Таким образом, при применении стратегий на основе C-долей для обеспечения перекрестной защиты широкого диапазона будут необходимы C-доли из штаммов *N. gonorrhoeae*.

Для сравнения способности усеченных TbpV и C-доли TbpV индуцировать перекрестно-реактивный ответ антител рекомбинантные усеченные TbpV и C-долю TbpV, полученные из штамма B16B6 *N. meningitidis* (отмечен черной стрелкой на фиг. 10), были выбраны для иммунологического анализа. Рекомбинантные усеченные TbpV и C-долю TbpV из штамма B16B6 использовали для иммунизации кроликов, и перекрестную реактивность полученной сыворотки исследовали с применением нового анализа ELISA собственной разработки (фиг. 5). Важно отметить, что множество последовательностей C-долей, включенных в настоящую заявку, начинаются сразу после окончания последнего бета-тяжа домена бочки N-доли, и, таким образом, включают линкерную область между N-долей и C-долей (L15, фиг. 2). Таким образом, для экспериментов по иммунизации возможно получить стабильные и функциональные C-доли с N-концевыми усечениями, в которых удалена область L15 (14 аминокислот в C-доле B16B6).

Типичный ряд TbpV, полученных из штаммов, распределенных по всему филогенетическому дереву (черные и серые стрелки, фиг. 10), был выбран для оценки перекрестной реактивности сыворотки. Два

дополнительных TbpV, отмеченных двумя двунаправленными стрелками, следовало включить в анализ, чтобы обеспечить более полный охват, но данные TbpV не были доступны во время проведения анализа.

Белки экспрессировали в векторе экспрессии собственной разработки с N-концевой последовательностью биотинилирования и наносили на сенсibiliзированные стрептавидином планшеты для ELISA. Сыворотку от кроликов, иммунизированных сконструированной C-долей и усеченным TbpV, полученными из штамма B16B6, исследовали для определения способности распознавать панель вариантов TbpV. Антисыворотка против усеченного TbpV характеризуется большими титрами против гомологичного TbpV (B16B6), чем антисыворотка против C-доли, и незначительно большими или эквивалентными титрами против TbpV из одного из гетерологичных штаммов (H44/76). Однако антисыворотка против C-доли характеризуется большими титрами антител против TbpV из всех других гетерологичных штаммов, чем данная антисыворотка против TbpV. Таким образом, C-доля превосходит интактный TbpV по своей способности стимулировать перекрестно-реактивные антитела.

В данном эксперименте по иммунизации рекомбинантные антигены получали, как описано выше, и использовали для иммунизации кроликов (новозеландский белый кролик, возраст 3 месяца, самки) подкожно в тазовую область с применением 50 мкг очищенного антигена в адьюванте 20% Emulsigen D (VSA). Кроликов иммунизировали в моменты времени 0, 3 и 6 недель.

Сыворотку, которую отбирали в неделю 8, исследовали против типичных белков посредством твердофазного анализа ELISA собственной разработки. Рекомбинантные слитые белки, которые использовали в анализе ELISA, были получены, как описано выше. Рекомбинантные белки, которые исследовали в анализе ELISA собственной разработки, представляли собой усеченные версии интактных TbpV (отсутствуют первые 19-36 аминокислот) из штаммов *N. meningitidis*; (i) B16B6 (SEQ ID NO: 117), (ii) H44/76 (SEQ ID NO: 133), (iii) S3131 (SEQ ID NO:132), (iv) M990 (SEQ ID NO:134), (v) M978 (SEQ ID NO:135), (vi) M992 (SEQ ID NO:138), (vii) P3006 (SEQ ID NO:139), (viii) 120M (SEQ ID NO:137), (ix) MC58 (SEQ ID NO:136) и (x) M982 (SEQ ID NO: 123).

Неочищенных экстрактов, полученных в экспериментах по экспрессии белка небольшого масштаба в течение ночи с вектором экспрессии для биотинилированных слитых белков, было достаточно для насыщения планшетов для ELISA согласно ранее проведенным экспериментам по оптимизации. Разведения антисыворотки, представляющей интерес, готовили в 2,5% обезжиренном молоке в фосфатном буферном растворе (ФБР) и наносили на планшеты в течение 1 ч при комнатной температуре. Первичное антитело обнаруживали посредством конъюгированных с ПХ антител козы против IgG кролика в разведении 1:100000 в течение 1 ч при комнатной температуре, титр выражали в виде обратной величины последнего разведения с $A_{450} > 0,3$.

Пример 5. Получение димера C-долей TbpV *N. meningitidis*.

Результаты, представленные на фиг. 11, демонстрируют, что домен C-доли TbpV из патогена человека *N. meningitidis* способен индуцировать усиленный перекрестно-реактивный ответ по сравнению с интактным TbpV. В данном примере авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что возможно получить один полипептид, охватывающий две C-доли, который является стабильным и иммуногенным. Две C-доли происходят из штаммов с антигенно различными TbpV, штаммов B16B6 и M982, которые представляют два изоформа TbpV (фиг. 10). На чертеже А фиг. 12 представлен сконструированный единый ген, кодирующий две типичных C-доли TbpV (SEQ ID NO: 150), которые использовали в экспериментах по иммунизации, описанных в примере 4. На чертеже В фиг. 12 представлено получение димера C-доли по сравнению с препаратами отдельных составляющих C-долей TbpV. Наблюдались приемлемые уровни получения димера C-доли, который представляется относительно стабильным, но перед его применением в экспериментах по иммунизации будет необходима дополнительная очистка.

Фиг. 13 свидетельствует, что димер, состоящий из C-долей TbpV из штаммов M982 и B16B6 *N. meningitidis*, способен индуцировать эффективный иммунный ответ против интактных TbpV обоих видов.

Пример 6. Уменьшение петлевых областей C-доли *N. meningitidis*.

В данном примере авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что возможно, по существу, уменьшить петлевые области C-долей *N. meningitidis*. Такое уменьшение полезно тем, что позволяет получить производное, в котором отсутствуют большие петлевые области и которое можно использовать в качестве удобного "скелета" для экспонирования эпитопов из других антигенов или других патогенов, и которое также может демонстрировать желаемые иммунологические свойства.

В данном примере петлевые области домена C-доли из штамма M982 *N. meningitidis* модифицировали для удаления в общей сложности 82 аминокислот из больших подвижных петлевых областей. Структурные модели нативной C-доли и сконструированной C-доли с существенным уменьшением четырех больших подвижных петель приведены на чертеже А фиг. 14. Четыре петли, намеченные для уменьшения, не были устранены на структуре белка на основе кристаллографии (3VE2.pdb); это свидетельствует, что существует вариация в конформации петель, в результате чего на модели слева на чертеже А петли представлены пунктирными линиями.

Стратегия удаления петли была разработана посредством исследования подробной структуры (3VE2.pdb) одновременно с оценкой вариабельности последовательности при выравнивании последова-

тельностей выбранных С-долей. Однако обеспечение наиболее эффективного моста между петлями без потенциального нарушения структуры было доминирующим критерием для выбора мостикообразующих аминокислот. Выравнивание последовательностей нативной С-доли (SEQ ID NO: 125), сконструированные производные, в каждом из которых отсутствовали намеченные петли, и "беспетлевая" С-доля с удаленными всеми четырьмя петлями (SEQ ID NO: 129) продемонстрированы на чертеже В фиг. 14.

С применением подхода сращивания перекрывающимися расширениями (splicing by overlap extension, SOEing) (57) получали гены, кодирующие отдельные делеции петель и "беспетлевую" С-долю с удаленными всеми четырьмя петлями. Подход SOEing осуществляли в плазмиде экспрессии, используемой для получения рекомбинантной С-доли из M982 *N. meningitidis*, так, чтобы можно было легко оценить стабильность полученных в результате сконструированных белков. Вектор кодирует N-концевую полигистидиновую метку, ген, кодирующий мальтозасвязывающий белок, и сайт расщепления протеазой TEV (вируса гравировки табака), предшествующие встроенному гену, кодирующему С-долю TbpV. Плазмиду экспрессии трансформировали в экспрессионный штамм ER2566 *E. coli*, который несет хромосомную копию гена РНК-полимеразы T7, встроенную в ген *lacZ*, и, таким образом, находится под контролем *lac*-промотора. Анализ экспрессии небольшого масштаба осуществляли с применением самоиндуцируемой среды (55). После выращивания в течение ночи клетки собирали и лизировали, фракцию супернатанта после центрифугирования наносили на смолу Ni-NTA, промывали, и связавшиеся белки элюировали в буфере для ДСН-ПААГ.

Как продемонстрировано на фиг. 15, выходы рекомбинантных С-долей с существенным уменьшением петли 18, петли 21, петли 23 или петли 27 были сравнимы с выходом нативного белка С-доли (ДТ); данный результат говорит о том, что удаление отдельных петель не оказывает отрицательного эффекта на стабильность белка. Фиг. 15 также свидетельствует, что удаление 81 аминокислот во всех четырех петлях не влияет на уровень продукции белка, что говорит о том, что удаление всех четырех петель не препятствует общей укладке С-доли. Важно упомянуть, что "беспетлевую" С-долю было легко получить и очистить в подходящем количестве, и что была получена кристаллическая структура очищенной "беспетлевой" С-доли. Это свидетельствует, что сконструированные антигены можно легко получить, по существу, в стабильной форме с уровнями продукции, подходящими для коммерческого применения. Таким образом, данный пример демонстрирует не только то, что стратегии удаления антигенно вариабельных областей возможны, но и что полученный в результате белок может быть подходящим в качестве скелета для экспонирования эпитопа, поскольку на укладку коровой структуры не влияют вариации размера и природы петель.

Наконец, как продемонстрировано на фиг. 16, "беспетлевая" С-доля (SEQ ID NO: 129, последние два столбца) является иммуногенной и способной индуцировать мощный ответ антител против интактного (нативного) антигена TbpV (SEQ ID NO: 123). Данная фигура демонстрирует, что беспетлевая С-доля в действительности индуцировала большие титры антител против TbpV из штамма M982 *N. meningitidis* у мышей, чем исходный антиген С-доли TbpV (SEQ ID NO: 125) (сравните 3-й и 1-й столбцы на фигуре). Удивительно наблюдение, что "беспетлевая" С-доля индуцировала аналогичные уровни антител против гетерологичных TbpV из штамма V16B6, что и нативная С-доля TbpV из V16B6, несмотря на то, что последовательности данных долей являются совершенно различными (фиг. 10). Сравнение 2-го и 4-го столбцов на фиг. 16 свидетельствует, что данные два белка вызывают аналогичный уровень антител против интактного TbpV из штамма V16B6.

В данных экспериментах мышей-самок FvV иммунизировали 25 мкг очищенного белка антигена с 20% Emuligen D в день 0, 21 и 42, и сыворотку, отобранную в день 56, анализировали для определения конечного титра с применением анализа ELISA собственной разработки. С-доля TbpV V16B6, С-доля TbpV M982 или модифицированный TbpV M982 ("беспетлевой") использовали для иммунизации четырех мышей каждый. Конечные титры анализировали против биотинилированного интактного белка TbpV M982 или V16B6. Титры определяли при соотношении 1:100000 с применением антител козы против IgG H+L мыши, конъюгированных с пероксидазой. Конечные титры определяли в виде обратного значения последнего разведения, при котором положительный сигнал может быть надежно обнаружен. Каждую сыворотку анализировали в трех повторах; результаты представлены в виде среднего значения для всех мышей с данным вариантом лечения +/- СОС.

Пример 7. Встраивание участков TbpA в сконструированную С-долю TbpV.

В данном примере ДНК, кодирующую сегменты внеклеточной поверхностной петли интегрального белка внешней мембраны трансферринсвязывающего белка А, TbpA, сплайсировали в ген, кодирующий модифицированную или "беспетлевую" С-долю TbpV из штамма M982 *N. meningitidis*, получая гены, кодирующие различные гибридные белки TbpA-TbpV. Причиной сплайсинга выбранных областей TbpA в скелет С-доли TbpV является то, что данные области обеспечивают более эффективные способы получения по сравнению с интактным белком TbpA и обеспечивают способность специфично нацеливаться на поверхностные области TbpA для индукции антител.

Ген, кодирующий модифицированную С-долю полипептида TbpV (SEQ ID NO: 97), полученный в примере 6, использовали в качестве отправной точки (см. также: чертеж А фиг. 14 (средняя модель)). Кодирующие сегменты ДНК из различных поверхностных петель TbpA (фиг. 17, чертеж А) сплайсиро-

вали в сайты, в которых из полипептида С-доли TbpB были удалены большие петли (фиг. 17, чертеж В). Участки из бета-бочки внеклеточных петель 3, 10 и 11 TbpA (58) (представленные объемно и подписанные области на чертеже А) встраивали в модифицированные петлевые области 18, 21 и 23 сконструированной С-доли TbpB (чертеж В). Аналогично, сегмент из N-концевой области plug, встроенный между доменами С1 и С2 трансферрина человека в структуре TbpA-трансферрина (петля plug, чертеж А), был встроен в модифицированную петлю 27 модифицированной С-доли TbpB.

Сборку петель TbpA на С-доли TbpB осуществляли с применением подхода сращивания перекрывающимися расширениями (SOEing) (57). Подход SOEing осуществляли в плазмиде экспрессии, использовавшейся для получения рекомбинантной С-доли из M982 *N. meningitidis*, так, чтобы можно было легко оценить стабильность полученных в результате сконструированных белков. Вектор кодирует N-концевую полигистидиновую метку, ген, кодирующий мальтозасвязывающий белок, и сайт расщепления протеазой TEV (вируса гравировки табака), предшествующие встроенному гену, кодирующему С-долю TbpB. Плазмиды экспрессии трансформировали в экспрессионный штамм ER2566 *E. coli*, который несет хромосомную копию гена РНК-полимеразы T7, встроенную в ген *lacZ*, и, таким образом, находится под контролем *lac*-промотора. Анализ экспрессии небольшого масштаба осуществляли с применением самоиндуцируемой среды (55). После выращивания в течение ночи клетки собирали и лизировали, фракцию супернатанта после центрифугирования наносили на смолу Ni-NTA, промывали, и связавшиеся белки элюировали в буфере для ДСН-ПААГ.

Как продемонстрировано на чертеже А фиг. 18, встраивание чужеродных сегментов TbpA в петли модифицированной С-доли TbpB привело к получению стабильного рекомбинантного белка. Рекомбинантные белки, представленные на чертеже А фиг. 18, содержали N-концевую полигистидиновую метку, партнер слияния мальтозасвязывающий белок и сайт расщепления протеазой TEV (вируса гравировки табака). Чертеж В фиг. 18 демонстрирует высвобождение С-долей дикого типа и мутантных С-долей из партнера слияния рекомбинантного белка посредством расщепления протеазой TEV. Результаты демонстрируют, что встраивание сегментов чужеродного белка, по существу, не влияет на стабильность сконструированной С-доли; это свидетельствует, что чужеродные сегменты не препятствуют нормальной укладке коровых структурных элементов С-доли. Значение данных результатов состоит в том, что С-доля, как представляется, является стабильным и универсальным белковым скелетом для экспонирования чужеродных эпитопов, которые можно в конечном итоге использовать для экспонирования эпитопов из множества антигенов и антигенных вариантов, что обеспечивает дополнительную стратегию получения сконструированных антигенов, обладающих способностью индуцировать перекрестный-защитный иммунный ответ широкого диапазона.

Наконец, как продемонстрировано на фиг. 19, модифицированные С-доли TbpB, содержащие области TbpA, сплайсированные в областях, в которых были уменьшены или удалены большие петли, являются иммуногенными. Данная фигура демонстрирует, что гибридные белки С-доли TbpA-TbpB вызывали титры антител, равные или превышающие титры, вызванные родительской модифицированной ("беспетлевой") С-долей. А именно белки, экспонирующие области из петли 10 и петли 11 из TbpA, характеризовались максимальными титрами (2-й и 3-й столбцы на фиг. 19).

В данном эксперименте самок мышей FvB иммунизировали 25 мкг очищенного белкового антигена с 20% Emulissen D в день 0, 21 и 42, и сыворотку, отобранную в день 56, анализировали для определения конечного титра с применением анализа ELISA собственной разработки. Трех мышей иммунизировали "беспетлевой" С-долей с удаленными всеми четырьмя петлями (SEQ ID NO: 97). Пять мышей использовали для иммунизации каждым из четырех других гибридных антигенов: (i) "беспетлевой" С-долей с петлей 10 TbpA, встроенной в петлю 21 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 154), (ii) "беспетлевой" С-долей с петлей 11 TbpA, встроенной в петлю 23 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 156), (iii) "беспетлевой" С-долей со спиралью петли 3 TbpA, встроенной в петлю 27 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 158), или (iv) "беспетлевой" С-долей с петлей plug TbpA, встроенной в петлю 18 С-доли TbpB (SEQ ID NO: 160). Сыворотку исследовали против биотинилированной рекомбинантной формы модифицированной С-доли M982, демонстрирующей все четыре встроенные петли TbpA (SEQ ID NO: 131). Титры определяли при соотношении 1:100000 с применением антител козы против IgG H+L мыши, конъюгированных с пероксидазой. Конечные титры определяли в виде обратного значения последнего разведения, при котором положительный сигнал может быть надежно обнаружен. Каждую сыворотку анализировали в трех повторах; результаты представлены в виде среднего значения для всех мышей с данным вариантом лечения +/-СОС.

Пример 8. Встраивание участков LbpA в модифицированную С-долю TbpB.

В данном примере сегменты внеклеточной поверхностной петли интегрального белка внешней мембраны лактоферринсвязывающего белка А, LbpA, из штамма MC58 (SEQ ID NO: 162) сплайсировали в модифицированную С-долю TbpB из штамма M982 *N. meningitidis* (SEQ. ID NO: 129), которая была описана в примере 6. Причиной сплайсинга выбранных областей LbpA в скелет С-доли TbpB является то, что данные области обеспечивают более эффективные способы получения по сравнению с интактным белком LbpA и обеспечивают способность специфично нацеливаться на поверхностные области LbpA для индукции антител. В сочетании с примером 7 авторы настоящего изобретения способны продемонстрировать, как создание гибридных белков может обеспечить возможность индукции иммунного ответа

против трех различных белков, присутствующих на поверхности *N. meningitidis*, а также обеспечить значительное препятствие потенциальному "ускользанию вакцины", при котором антигенный вариант критичного белка-мишени способен избежать воздействия иммунного ответа, образованного против антигенов вакцины.

Поскольку доступные структуры LbpA отсутствуют, осуществляли структурное моделирование LbpA с применением 3-х доступных в интернете серверов для прогнозирования белка: SWISS MODEL, I-TASSER и PHYRE2 с целью получить наиболее соответствующую модель. Изначально проводили поиск в BLAST для обнаружения максимально соответствующего LbpA для моделирования с известной структурой TbpA (58), что позволило выяснить, что наиболее соответствующим является LbpA из штамма MC58 (SEQ ID NO: 130). Выравнивание LbpA MC58 с TbpA K454, которое проводили с применением ClustalW, выступало в качестве исходных данных способа выравнивания в SWISS MODEL. В PHYRE2 PDB ID для структуры TbpA K454 и последовательность FASTA LbpA MC58 вводили в качестве шаблона и мишени соответственно. В I-TASSER вводили только последовательность FASTA LbpA MC58. Среднее квадратичное отклонение (root-mean-square deviation, RMSD) использовали для оценки подобия различных моделей, разработанных со структурой шаблона после их наложения в Pymol (<http://www.pymol.org/>). Модель LbpA, разработанную в PHYRE2, выбирали в качестве наиболее соответствующей модели и использовали для выбора петлевых областей для получения гибридного или химерного белка (фиг. 20, чертеж А).

"Беспетлевую" С-долю полипептида TbpB, полученную в примере 6 (SEQ ID NO: 129), использовали в качестве отправной точки. Кодированные области ДНК из внеклеточной петли 3 и петли 2 LbpA встраивали между ДНК, кодирующей петлю 18 и 21 сконструированной С-доли TbpB, фланкирующие бета-слои (фиг. 20, чертеж В). Петлевые области в С-доле TbpB и соответствующие петли в LbpA для встраивания анализировали для определения расстояний с применением Pymol, чтобы убедиться, что заменяющие петли LbpA были структурированы в соответствии с параметрами расстояния, спрогнозированными для петли. Сборку петель LbpA на С-доли TbpB проводили с применением метода ПЦР SOE, как в примерах 6 и 7, и анализ последовательности подтвердил встраивание спирали 3 и петли 2 LbpA MC58 в беспетлевую С-долю TbpB M982. Разработка гибридного белка включала встраивание 15 аминокислот из области спирали 3 LbpA (последовательность белка: 383-YGTDEAEKFRDKSGV) в область петли 18 С-доли M982 (SEQ ID NO:166), и встраивание 11 аминокислот из области петли 2 LbpA (последовательность белка: LNRWVKERIEQL) в область петли 21 С-доли M982 (SEQ ID NO:164) (фиг. 20, чертеж В).

Способы трансформации рекомбинантной плазмидой и проведения предварительных исследований экспрессии описаны в примере 7. Предварительный скрининг продемонстрировал, что выходы рекомбинантного белка были высокими (слева внизу, чертеж В, фиг. 20), сопоставимыми или лучшими, чем результаты, полученные с нативной С-долей или беспетлевой С-долей, которую использовали в качестве скелета (данные не показаны). Результаты также определенно продемонстрировали, что встраивание сегментов чужеродного белка, по существу, не влияло на стабильность сконструированной С-доли; это свидетельствует, что чужеродные сегменты не препятствуют нормальной укладке коровых структурных элементов С-доли.

Пример 9. Конструирование петли для применения конъюгированных капсульных вакцин с использованием С-доли TbpB *H. influenzae*.

В большинстве конъюгированных капсульных вакцин, которые были разработаны на сегодняшний день, в качестве носителя для конъюгирования полисахаридного капсульного материала использовался один из компонентов вакцины на основе токсина. Стратегии конъюгирования капсульного полисахарида со столбнячным или дифтерийным токсином или токсинидом характеризуются рядом недостатков. Один из них заключается в возможности отрицательного влияния на индукцию эффективного иммунного ответа в связи с постоянным воздействием белков-носителей, которые также присутствуют в вакцинах, используемых для регулярной иммунизации, то есть развития иммунной толерантности. Вторым недостатком заключается в том, что носитель не имеет отношения к природному воздействию патогена, и, таким образом, не в полной мере используется преимущество вовлечения наиболее соответствующих Т-клеток хелперов при встрече с патогеном.

Конъюгированные капсульные вакцины оказались весьма успешными в предотвращении инфекции и собственно в предотвращении колонизации бактериальными патогенами, которые экспрессируют специфические капсульные полисахариды, обычно называемые серотипом или серогруппой. Однако перекрестная защита, по существу, отсутствует для бактерий, экспрессирующих другие типы капсульных полисахаридов, которые могут в конечном итоге привести к заболеваниям, вызываемым штаммами, экспрессирующими полисахариды, которые не охватываются вакциной. Обусловленная этим потребность в расширении спектра типов капсульных полисахаридов, охватываемых конъюгированными капсульными вакцинами, привела к перспективе постоянной разработки расширенного спектра вакцин и к формированию мнения о том, что окончательное решение проблемы следует возлагать на вакцины на основе белка, способные обеспечить существенную перекрестную защиту. Однако, если бы вакцина на основе белка, способная индуцировать перекрестную защиту широкого диапазона, была разработана, маловероятно,

что такая вакцина будет принята в качестве замены существующих конъюгированных капсульных вакцин. Добавление еще одной вакцины к уже установленному расписанию регулярных иммунизаций можно рассматривать как потенциальное препятствие для введения вакцин на основе белка.

В данном примере авторы настоящего изобретения сконструировали конъюгационную петлю в С-доле TbpV из *H. influenza*, которая содержит 42 остатка лизина, что существенно превышает общее количество лизинов в оставшейся части С-доли TbpV; данные остатки лизина, как прогнозируют, позволят минимизировать модификации лизинов в критических эпитопах, поскольку только данные лизины, реагирующие с активированными группами углевода, будут модифицированы, и соотношение углевода к белку можно контролировать во время процесса конъюгации.

Последовательность гена, кодирующего сконструированную С-долю TbpV из штамма H36 *H. influenza*, представлена на чертеже А фиг. 21; область ДНК, кодирующая конъюгационную петлю, отмечена шрифтом большего размера (14 по сравнению с 12) (SEQ ID NO: 167). Сайт встраивания и последовательность конъюгационной петли были разработаны с применением в качестве модели большой отрицательно заряженной петли LbpV из штамма MC58 *N. meningitidis* (59). По существу, последовательность петли LbpV использовали в качестве матрицы, и лизины использовали для замены остатков аспарагиновой или глутаминовой кислоты в петле. Конъюгационная петля была сконструирована в домене ручки С-доли TbpV между бета-слоями 22 и 23 в положении петли 23 (фиг. 2). Расположение петли продемонстрировано на чертеже В фиг. 21 с применением структурной модели С-доли *H. influenzae*, разработанной с помощью меньшей петлей (содержит 11 аминокислот), заменяющей петлю 23. Встроенные остатки приведены в виде объемных заполненных сфер. Сконструированная петля фактически содержит 91 аминокислоту, которые составляют более $\frac{1}{4}$ размера общей С-доли (352 остатка аминокислот), и петля представлена в виде выделенных остатков в целой С-доле со сконструированной петлей, представленной в SEQ ID NO: 205. Данный факт демонстрирует, что петлевой домен может вместить большее количество дополнительных аминокислот.

Включение конъюгационной области не будет ограничено встраиванием в петлевые области N-доли или С-доли, но, например, может быть обеспечено включением кластера остатков лизина на N-конце интактных петель TbpV или TbpV.

Пример 10. Получение замен аминокислот в поверхностных связывающих петлях TbpV и оценка свойств связывания Tf петлями TbpV.

Конструировали серии сайт-направленных мутантов в поверхностных петлях белка TbpV для изучения влияния данных мутаций на функциональные и иммунологические свойства. Для нацеливания на экспонированные на поверхности аминокислоты для модификации в TbpV, структуры которых, полученные методом рентгеноструктурной кристаллографии, были доступны авторам настоящего изобретения (12, 13), вводили сайт-специфические мутации. Сплайсинг с применением подхода полимеразной цепной реакции со сращиванием гена перекрывающимися расширениями (ПЦР SOE) использовали для введения мутаций в гены, кодирующие усеченные белки TbpV, полученные из патогенов свиней *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* и *H. parasuis*. Данные гены включали TbpV²⁰⁻⁵²⁸ *A. pleuropneumoniae* (аминокислоты 20-528), полученный из штамма H49 (ApH49 TbpV, SEQ ID NO: 2), и мутант F171A TbpV²⁰⁻⁵²⁸ ApH49 (SEQ ID NO: 4). Также в анализ были включены TbpV²⁶⁻⁵²⁸ *A. pleuropneumoniae* (аминокислоты 26-528), полученный из штамма H87 (ApH87 TbpV, SEQ ID NO: 12), и мутант Y95A (SEQ ID NO: 14), мутант Y121A (SEQ ID NO: 16), мутант Y174A (SEQ ID NO: 18) и мутант R179E (SEQ ID NO: 20). Также были получены TbpV²⁷⁻⁵⁷⁷ *A. suis* (аминокислоты 27-577), полученный из штамма H57 (AsH57 TbpV, SEQ ID NO: 28), мутант F63A (SEQ ID NO: 30) и мутант F152A (SEQ ID NO: 32). Наконец, также были получены TbpV²⁷⁻⁵⁷⁷ *H. parasuis* (аминокислоты 27-577), полученный из штамма Hp5 Нагасаки (Hp5 TbpV, SEQ ID NO: 115), мутант Y93A (SEQ ID NO: 170), мутант Y117A (SEQ ID NO: 172), мутант Y167A (SEQ ID NO: 174) и мутант W176A (SEQ ID NO: 176).

Рекомбинантные белки изначально были получены с N-концевым партнером слияния, содержащим полигистидиновую метку, мальтозасвязывающий белок и сайт расщепления протеазой TEV. Данный подход позволил авторам настоящего изобретения выделить рекомбинантный белок, подходящий для твердофазного анализа связывания с применением нитроцеллюлозной мембраны и меченого ферментативным способом трансферрина свиньи или посредством захвата рекомбинантного слитого белка из неочищенных экстрактов на аффинной смоле с Tf свиньи-Сефарозой (13). С применением данных анализов наблюдали мощное связывание нативными TbpV, тогда как в случае множества сайт-специфических мутантов наблюдалось уменьшенное связывание.

Несмотря на то, что из данных экспериментов возможно вывести полуколичественные константы связывания для связывания Tf свиньи, авторы настоящего изобретения решили использовать множество различных биофизических и биохимических подходов для получения более точных количественных измерений аффинности связывания. Как показано на фиг. 22, согласно данным метода изотермической калориметрии, поверхностного плазмонного резонанса или интерферометрии биослоя (23-25) константа аффинности (Kd) для нативных TbpV находилась, как правило, в диапазоне от 20 до 60 нМ, за исключением TbpV из *Actinobacillus suis*, для которого кинетика связывания являлась достаточно уникальной и характеризовалась рассчитанной Kd 120 нМ (12).

Несколько мутаций привели к увеличению константы аффинности (K_d) ≥ 100 раз, такие как мутация F171A в TbpV из штамма H49 *A. pleuropneumoniae*, мутация Y174A в TbpV из штамма H87 *A. pleuropneumoniae* или двойная мутация Y167A и W176A в TbpV из штамма HP5 *H. parasuis*. Примечательно, что все данные мутанты локализовались в петле 8.

Пример 11. Оценка иммунологических свойств производных TbpV с заменами аминокислот в поверхностных петлях связывания.

Для изучения иммунологических свойств мутантных белков, полученных из TbpV, которые были дефектны по связыванию Tf, было важно исследовать данные белки в нативном хозяине и предпочтительно непосредственно исследовать способность данных белков защищать хозяина от инфекции, вызванной целевым патогеном. С данной целью были начаты эксперименты на надежно отработанной модели инфекции *Haemophilus parasuis*, в которой не получавших молозива поросят иммунизировали, начиная с 28 дней после рождения, и стимулировали *Haemophilus parasuis* в день 63 (37, 60). На данной модели инфекции коммерческая вакцина, полученная из стимулирующего штамма (Porcillis Glasser), обеспечивала полную защиту от смерти, и рекомбинантные формы рецепторов трансферрина ранее обеспечивали 20-30% выживаемости через 15 дней после стимулирования.

Группы из пяти или шести свиней иммунизировали рекомбинантным интактным TbpV из стимулирующего штамма Hp5, сайт-направленным мутантом Y167A белка TbpV, вакциной Porcillis Glasser или адьювантом самим по себе. Свиней стимулировали антигеном со стандартной стимулирующей дозой 10^8 штамма Hp5 (Нагасаки) *H. parasuis* и наблюдали в течение 15 дней. Как продемонстрировано на фиг. 23, только 1 из пяти свиней, иммунизированных контрольной вакциной Porcillis Glasser, выжила после стимула; полученный результат свидетельствует, что в данном эксперименте использовали более вирулентный вариант штамма Hp5. Эксперименты последующего наблюдения с изолятами штамма из инфицированных свиней продемонстрировали меньшие уровни выживаемости, что подтвердило данный вывод. Несмотря на увеличенную вирулентность стимулирующего штамма, все шесть свиней, иммунизированных Y167A TbpV, выжили через 15 дней, и 5 из 6 свиней характеризовались незначительными симптомами или отсутствием симптомов, и у животных наблюдалась незначительная патология либо отсутствие патологии при вскрытии. Данный уровень защиты отличался от шести свиней, иммунизированных белком дикого типа, из которых только 3 свиньи выжили после стимула. 3 выжившие свиньи после стимуляции антигеном характеризовались значительными клиническими симптомами, и при вскрытии животных наблюдалась значительная патология. В целом, данный эксперимент продемонстрировал, что мутант Y167A белка TbpV вызывал превосходящий защитный иммунологический ответ по сравнению с белком дикого типа, и, поскольку данные два белка являются практически идентичными, за исключением свойств связывания трансферрина (фиг. 22), недостаточный иммунный ответ нативного белка может объясняться связыванием с трансферрином хозяина.

Чтобы получить дополнительное доказательство влияния, которое мутация оказывает на иммунный ответ, оценивали ответы В-клеток и Т-клеток. Образцы крови, отобранные непосредственно перед стимулом (после двух иммунизации) и через 96 ч после стимуляции антигеном, анализировали для определения адаптивного иммунного ответа. Образцы анализировали методом анализа FACS для определения субпопуляций зрелых В-клеток ($\alpha\text{IgM}^+\text{CD}21^+$) и клеток Т-хелперов ($\text{CD}4^+\text{CD}8\alpha^-$). Результаты, представленные на фиг. 24, продемонстрировали, что перед стимулом мутант Y167A антигена TbpV вызывал более мощный ответ В-клеток (чертеж А) и ответ клеток Т-хелперов (чертеж В), чем нативный антиген TbpV или коммерческая вакцина Porcillis Glasser. Через 96 ч после стимуляции антигеном ответ на мутант TbpV ($51,48 \pm 1,18\%$) был значительно выше ответа на нативный TbpV ($45,65 \pm 1,20\%$) или вакцину PG ($44,83 \pm 1,59\%$) (фиг. 24, чертеж С). Аналогичная тенденция наблюдалась и в случае ответа клеток Т-хелперов, однако разница в процентах между тремя группами являлась менее очевидной (фиг. 24, чертеж D). Однако через 96 ч только 3/6 и 2/5 выживших свиней остались в группах, иммунизированных нативным TbpV или вакциной Porcillis Glasser, и, поскольку субъекты с низкими ответами имели тенденцию погибать ранее, наблюдаемые различия между группами в момент времени 96 ч фактически являются недооцененными.

Пример 12. Иммунный ответ, направленный против производных TbpV, способен предотвращать колонизацию.

Несмотря на то, что модели инфекции предоставили возможность оценки потенциальной эффективности вакцин, такие модели редко имитируют процесс природной инфекции, при котором передача патогена обычно приводит к колонизации верхних дыхательных путей хозяина перед установлением инфекции. Конъюгированные капсульные вакцины, разработанные для предотвращения менингита, пневмонии и инвазивной инфекции, как было показано, устраняют целевые бактерии из верхних дыхательных путей (17), обеспечивая дополнительное преимущество популяционного иммунитета, защищающего неиммунизированных индивидуумов. Вследствие этого способность предотвращать колонизацию стала важной характеристикой для принятия решения о применении вакцины (18). Таким образом, может быть разумно разработать вакцины, предотвращающие колонизацию, поскольку вместе с предотвращением инфекции такие вакцины могут устранить источник патогенов, вызывающих заболевание.

Воспользовавшись преимуществом предшествующих исследований, характеризующих взаимодействие *N. meningitidis* и рецепторов CEACAM человека (61), авторы настоящего изобретения разработали трансгенную гуманизированную модель на мышах, способную поддерживать колонизацию *Neisseria meningitidis* (62). Данная модель основана на специфическом взаимодействии белков Opa *Neisseria meningitidis* с рецептором CEACAM1 человека, и данную модель потенциально можно перенести на другие патогены, которые используют данное взаимодействие природным или искусственным путем. Иммунизация трансгенных мышей конъюгированной капсульной вакциной менингококковой группы C на модели колонизации приводила к возникновению иммунитета слизистых оболочек, обеспечивающему полное подавление, или, другими словами, предотвращала колонизацию группой C *Neisseria meningitidis*, но не штаммами с другими типами капсул.

Данную модель использовали для исследования способности TbpV и его производных предотвращать колонизацию *N. meningitidis*. Поскольку трансферрин человека в данных мышах во время стадии иммунизации отсутствует, было необязательно использовать сконструированные несвязывающие TbpV, описанные в примере 11. Как продемонстрировано на фиг. 25A, у 8 из 9 мышей, иммунизированных рекомбинантным усеченным TbpV, через три дня после интраназального стимула 1×10^7 КОЕ штамма M982 *N. meningitidis* не наблюдались обнаруживаемые уровни *N. meningitidis*. У контрольных мышей, которым вводили адьювант сам по себе, у 6 из 8 мышей наблюдались обнаруживаемые уровни *N. meningitidis*. Важно упомянуть, что TbpV является первым белковым антигеном, способным, как показано, предотвращать колонизацию, и данное свойство нельзя считать общим для белковых антигенов поверхности в связи с ограниченным пониманием вовлеченных в данный процесс механизмов.

В эксперименте последующего наблюдения авторы настоящего изобретения сравнивали TbpV с другим липопротеином поверхности, фактор Н-связывающим белком, который является ключевым компонентом двух вакцин, и с отдельными субдоменами TbpV. Как продемонстрировано на фиг. 25B, С-доля была способна предотвращать колонизацию также эффективно или более эффективно, чем интактный TbpV или N-доля TbpV, которая, в свою очередь, в данном эксперименте была так же эффективна или более эффективна, чем фактор Н-связывающий белок, при индукции иммунитета, обеспечивающего полное подавление. Способность С-доли TbpV индуцировать иммунитет слизистых оболочек, обеспечивающий полное подавление, при системной иммунизации является в особенности обнадеживающим результатом, поскольку отсутствие связывания С-долей TbpV Tf означает, что С-доля TbpV будет также эффективна в нативном хозяине, и ее увеличенная способность индуцировать перекрестно-реактивный иммунный ответ (фиг. 3, фиг. 11) позволит облегчить развитие перекрестно-защитных вакцин широкого диапазона действия.

Исследования колонизации проводили, как было описано ранее (62). Группам из 8 или более мышей C57/B16, экспрессирующих трансген CEACAM-1 человека (разведенных в собственной лаборатории), вводили по 100 мкл назначенных иммунизации подкожно в дни 0 и 21. Группы получали назначенный белок (25 мкг) или контроль, не содержащий белок, с адьювантом 20% Emulsigen D (MVP Laboratories), разведенный в стерильном фосфатном буферном растворе (ФБР) (Gibco) до объема 100 мл на инъекцию.

В день 35 мышам проводили обезболивание изофлураном (Baxter) и заражали дважды перевитой на животных культурой штамма M982 *N. meningitidis* посредством интраназальной инстиляции. Для получения инокулама штаммы бактерий для инфекции выращивали в течение ночи на агаре GC (Beckton Dickinson); полученные в течение ночи колонии собирали в 1 мл ФБР, содержащего 1 mM MgCl₂ (ФБР/Mg), и измеряли оптическую плотность при длине волны 600 для корректировки количества бактерий. Культуры корректировали таким образом, чтобы каждый итоговый инокулум объемом 10 мкл содержал приблизительно 1×10^7 колониеобразующих единиц. Плотность дозы колонизации подтверждали посредством высевания серийных разведений на агар GC.

Через три дня после инфекции (день 38) мышей подвергали эвтаназии посредством асфикции диоксидом углерода. Тяжесть колонизации анализировали промыванием трахеи 250 мкл ФБР/Mg с последующим непосредственным отбором мазка из носового хода аппликатором с полиэфирным наконечником (Puritan Medical Products), ресуспендировали в 500 мкл ФБР/Mg. После выращивания в течение ночи на агаре GC с добавлением ингибитора VCNT (Veston Dickinson) для предотвращения роста назальной флоры образцы нумеровали. Эксперименты на животных проводили согласно руководствам этического комитета при работе с животными университета Торонто.

Пример 13. Вакцинный состав, содержащий смеси TbpV или их участки.

Поскольку патогены, которые содержат TbpV, обитают исключительно в конкретном хозяине (людях, свиньях, крупном рогатом скоте и/или родственных жвачных животных) и поскольку TbpV способен предотвращать колонизацию (фиг. 25), перекрестно-защитная вакцина широкого диапазона действия на основе сконструированных антигенов, направленных на TbpV, обладает потенциалом устранения патогена.

Для расширения эффективности вакцинного состава против спектра грамотрицательных патогенов можно объединить TbpV или их участки, например домен С-доли, полученные из различных видов бак-

терий или штаммов. В данном примере авторы настоящего изобретения предлагают предпочтительные комбинации полипептидов TbpV или их комбинаций для применения при получении вакцинных составов.

Важным фактором для обнаружения эффективных комбинаций полипептидов TbpV является степень, в которой различные штаммы, виды и роды способны легко обмениваться генами tbpV, таким образом, выступая в качестве потенциального хранилища вариантов TbpV, не охватываемых вакциной. Одним из важных факторов, влияющих на горизонтальный обмен генов tbpV, является природа последовательности сигнала захвата (uptake signal sequence, USS), которая неотъемлемо присутствует в данных видах, трансформируемых природным путем (63, 64). Данные бактерии преимущественно захватывают ДНК, содержащую специфичную USS, и встраивают данную ДНК в свой геном, обеспечивая высокоэффективный механизм для встраивания антигенных вариантов своих поверхностных антигенов.

В случае *Neisseria meningitidis* авторам настоящего изобретения была доступна обширная коллекция штаммов, которая в достаточной мере представляла общее разнообразие последовательностей (фиг. 10A). Существует особенно крупная коллекция последовательностей данного патогена со всего мира, находящаяся в общедоступных базах данных, которая представляет собой весьма всеобъемлющую оценку разнообразия последовательностей. Поскольку другие патогены человека, которые содержат TbpV и в норме обитают в верхних дыхательных путях человека (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*), не содержат в геномной ДНК USS, специфичную к *Neisseria*, данные патогены не представляют собой готовое хранилище вариантов антигена. Таким образом, настоящий пример включает вакцинный состав, содержащий комбинацию сконструированных антигенов TbpV, которая содержит по меньшей мере два полипептида TbpV или их участок (например, домен С-доли), полученных из штаммов *Neisseria meningitidis*, которые выбраны из двух различных филогенетических кластеров, представленных на фиг. 10A. Такой вакцинный состав потенциально способен индуцировать перекрестно-реактивный (фиг. 11) и перекрестно-защитный ответ антител, и потенциально данный состав можно использовать для устранения *N. meningitidis* из популяции человека.

Родственный патоген, *N. gonorrhoeae*, который в норме присутствует в мочеполовом тракте человека, обладает той же USS и, таким образом, может потенциально выступать в качестве хранилища антигенной вариации в связи со случайным присутствием двух данных видов на одной и той же слизистой поверхности. Между тем анализ разнообразия последовательностей гонококковых TbpV относительно разнообразия *N. meningitidis* (фиг. 26A) свидетельствует, что гонококковые TbpV являются в значительной степени подмножеством разнообразия последовательностей, присутствующих в *N. meningitidis*; данный факт позволяет предположить, что посредством незначительного расширения подхода, предложенного авторами настоящего изобретения, набор сконструированных антигенов можно использовать для разработки вакцины, потенциально способной устранять колонизацию любым патогеном. Для сконструированных С-долей (фиг. 26B) данный подход будет вовлекать включение С-долей, в особенности направленных на варианты TbpV *N. gonorrhoeae*. Наличие TbpV в некоторых симбиотических изолятах *Neisseria* представляет другое потенциальное хранилище антигенных вариантов, таким образом, расширение подхода, предложенного авторами настоящего изобретения, с включением типичных вариантов из симбиотических *Neisseria* может быть необходимым для эффективного устранения *Neisseria*, экспрессирующих TbpV, способных вызвать заболевание. Таким образом, настоящий пример включает вакцинный состав, содержащий комбинацию сконструированных антигенов TbpV, которая содержит полипептид TbpV *Neisseria meningitidis* или его участок (например, домен С-доли), а также полипептид TbpV *Neisseria gonorrhoeae* или его участок (например, домен С-доли).

Патогены свиней *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* и *H. parasuis* содержат одну и ту же USS и, как следствие, разнообразие последовательностей TbpV распределено среди трех видов (фиг. 4) так, что основные филогенетические кластеры содержат представителей по меньшей мере двух видов. Таким образом, при разработке вакцин против данных патогенов на основе TbpV важно учитывать общее варьирование последовательностей TbpV во всех трех видах. Данный факт является основой предложенного авторами настоящего изобретения достаточно нестандартного подхода разработки сконструированных антигенов, способных индуцировать иммунный ответ против антигенов из более чем одного вида (фиг. 6, 7), и, поскольку TbpV способен предотвращать колонизацию, данный подход можно использовать для устранения всех трех патогенов хозяина-свиньи. Таким образом, настоящий пример включает вакцинный состав, содержащий комбинацию сконструированных антигенов TbpV, которая содержит по меньшей мере два полипептида TbpV или их участки (например, домен С-доли), полученных из *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* и *Haemophilus parasuis*.

В отношении *Haemophilus influenzae* в связи с совершенно различным спектром заболеваний, вызываемых штаммами, содержащими капсульный полисахарид типа b, и нетипируемыми штаммами, в которых отсутствует капсульный полисахарид, внимание было сосредоточено на вакцинах, нацеленных на каждую группу отдельно. Недавний всплеск инвазивных заболеваний, вызванных штаммами, экспрессирующими капсульный полисахарид группы А, привел к активной разработке вакцин, нацеленных на штаммы группы А (65). Оценка разнообразия TbpV в штаммах *H. influenzae* свидетельствует, что существует три основных филогенетических кластера (фиг. 27A), причем нетипируемые штаммы распределе-

ны среди всех трех групп. Поскольку все штаммы *H. influenzae* содержат одну и ту же USS, вероятно, что на распределение разнообразия TbpV не будет влиять тип капсулы, и разработка перекрестно-защитной вакцины, полученной из сконструированных антигенов на основе TbpV, будет эффективно нацелена на штаммы типа b, нетипируемые штаммы и штаммы, экспрессирующие другие типы капсул. Таким образом, подход, предложенный авторами настоящего изобретения, должен облегчить разработку вакцин с широким диапазоном защиты на основе TbpV для *H. influenzae* в качестве обособленной вакцины либо в качестве носителя для конъюгированных капсульных вакцин (фиг. 21). Таким образом, настоящий пример включает вакцинный состав, содержащий комбинацию сконструированных антигенов TbpV, которая содержит по меньшей мере два полипептида TbpV, полученных из штаммов *H. influenzae*, которые выбраны из двух различных филогенетических кластеров, представленных на фиг. 27А.

В отличие от *Neisseria meningitidis* и *Haemophilus influenzae* в геномах штаммов *Moraxella catarrhalis* отсутствуют очевидные USS, хотя данные штаммы являются трансформируемыми природным путем со значительным предпочтением для ДНК *M. catarrhalis*. Таким образом, при разработке перекрестно-защитной вакцины широкого диапазона против *M. catarrhalis* со сконструированными антигенами, нацеленными на TbpV, необходимо учитывать только разнообразие TbpV из *M. catarrhalis* (фиг. 29). Антигенов, полученных из штаммов, составляющих три основные группы, должно быть достаточно для создания перекрестно-защитной вакцины широкого диапазона, способной предотвращать колонизацию *M. catarrhalis*. Таким образом, настоящий пример включает вакцинный состав, содержащий комбинацию сконструированных антигенов TbpV, которая содержит по меньшей мере два полипептида TbpV, полученных из штаммов *M. catarrhalis*, которые выбраны из двух различных филогенетических кластеров, представленных на фиг. 29.

Патоген быка *Mannheimia haemolytica*, ранее известный как *Pasteurella haemolytica*, является основной причиной респираторной инфекции (транспортной лихорадки) крупного рогатого скота и респираторных инфекций овец. Патоген овец, *Pasteurella trehalosi*, который был впоследствии разделен на два вида, *Mannheimia glucosida* и *Bibersteinia trehalosi*, содержит ту же USS, что и *Mannheimia haemolytica*. Данный факт может в значительной степени обуславливать вывод о том, что данные виды характеризуются общим генофондом (66). В отличие от описанных выше патогенов патоген быка *Histophilus somni*, ранее известный как *Haemophilus somnus*, содержит отличную USS и, таким образом, не является хранилищем антигенных вариантов *M. haemolytica*. Существует три основных филогенетических линии TbpV из *M. haemolytica*, *M. glucosida* и *B. trehalosi*, которые, очевидно, охватывают патогены овец и крупного рогатого скота (66) (фиг. 28), с кластерами вариантов, которые в первую очередь ограничены крупным рогатым скотом или овцами. Таким образом, можно рассматривать разработку сконструированных антигенов, полученных из TbpV, нацеленных на заболевания крупного рогатого скота, овец или обоих видов данных жвачных животных. Таким образом, настоящий пример включает вакцинный состав, содержащий комбинацию сконструированных антигенов TbpV или их участки, например домен С-доли, которая содержит по меньшей мере два полипептида TbpV, полученных из штаммов *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* и *Bibersteinia trehalosi*, которые выбраны из двух различных филогенетических кластеров, представленных на фиг. 28.

Все публикации, патенты и заявки на патент включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки во всей своей полноте.

Таблица 1

Модификация 1 петли	
L1	✓
L2	✓
L3	✓
L4	✓
L5	✓
L6	✓
L7	✓
L8	✓
L9	✓
L10	✓
L11	✓
L12	✓
L13	✓
L14	✓
L15	✓
L16	✓
L17	✓
L18	✓
L19	✓
L20	✓
L21	✓
L22	✓
L23	✓
L24	✓
L25	✓
L26	✓
L27	✓
L28	✓
L29	✓
L30	✓
L31	✓
L32	✓

Модификация 2 петель																																		
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32		
L1	x																																	
L2	✓	x																																
L3	✓	✓	x																															
L4	✓	✓	✓	x																														
L5	✓	✓	✓	✓	x																													
L6	✓	✓	✓	✓	✓	x																												
L7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																											
L8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																										
L9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																									
L10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																								
L11	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																							
L12	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																						
L13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																					
L14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																				
L15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																			
L16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																		
L17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																	
L18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x																
L19	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x															
L20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x														
L21	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x													
L22	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x												
L23	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x											
L24	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x										
L25	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x									
L26	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x								
L27	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x							
L28	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x					
L29	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x			
L30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x		
L31	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	
L32	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x

Перечень литературы.

1. **Schryvers AB.** 04-26 1990. A Method for Isolating and Purifying Transferrin and Lactoferrin Receptor Proteins from Bacteria and the Preparation of Vaccines Containing the Same. France patent 0528787, 00528787/EP B1.
2. **Quentin-Millet M-J, Lissolo L.** April 15, 1993 1993. Subunit vaccine for *Neisseria meningitidis* infections and corresponding purified subunits. PCT patent WO 93/07172.
3. **Danve B, Lissolo L, Mignon M, Dumas P, Colombani S, Schryvers AB, Quentin-Millet MJ.** 1993. Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. *Vaccine* **11**:1214-1220.
4. **Gray-Owen SD, Schryvers AB.** 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* **4**:185-191.
5. **Lo RYC, Schryvers AB, Potter AA.** 11-29 1996. Transferrin Binding Proteins of *Pasteurella Haemolytica* and Vaccines Containing Same patent 09720934 WO.
6. **Loosmore S, Harkness R, Schryvers A, Chong P, Gray-Owen S, Yang Y-P, Murdin A, Klein M.** 06-07 1995. Transferrin receptor genes and immunogenic compositions derived therefrom patent 05922323.
7. **Schryvers AB.** 06-07 1995. Vaccine for conferring bacterial immunity containing lactoferrin receptor protein patent 06060058.
8. **Myers LE, Schryvers AB, Harkness RE, Loosmore SM, Du R-P, Yang Y-P, Klein MH.** 03-08 1996. DNA encoding a transferrin receptor of *Moraxella* patent 06090576.
9. **Potter AA, Gerlach GF, Willson PJ, Rossi-Campos A.** March 2, 1999 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin binding protein vaccines and uses thereof. US patent 5,876,725.
10. **Potter AA, Rioux C, Schryvers AB.** 03-10 2000. Cloning and Expression of *Haemophilus Somnus* Transferrin-Binding Proteins patent 00053765 WO.
11. **Morgenthau A, Pogoutse A, Adamiak P, Moraes TF, Schryvers AB.** 2013. Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: molecular mechanisms and role in host-microbe interactions. *Future Microbiology* **8**:1575-1585.
12. **Calmettes C, Yu R-H, Silva LP, Curran D, Schriemer DC, Schryvers AB, Moraes TF.** 2011. Structural variations within the transferrin binding site on transferrin binding protein, TbpB. *Journal of Biological Chemistry* **286**:12683-12692.
13. **Moraes TF, Yu R-H, Strynadka NC, Schryvers AB.** 2009. Insights into the bacterial transferrin receptor: the structure of transferrin binding protein B from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Molecular Cell* **35**:523-533.
14. **Calmettes C, Alcantara J, Schryvers AB, Moraes TF.** 2012. The structural basis of transferrin iron sequestration by transferrin binding protein B. *Nature Structural and Molecular Biology* **19**:358-360.
15. **Maiden MC, Ibarz-Pavon AB, Urwin R, Gray SJ, Andrews NJ, Clarke SC, Walker AM, Evans MR, Kroll JS, Neal KR, Ala'aldeen DA, Crook DW, Cann K, Harrison S, Cunningham R, Baxter D, Kaczmarek E, MacLennan J, Cameron JC, Stuart JM.** 2008. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. *J Infect Dis* **197**:737-743.
16. **Madhi SA, Adrian P, Kuwanda L, Cutland C, Albrich WC, Klugman KP.** 2007. Long-term effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*--and associated interactions with *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* colonization--in HIV-Infected and HIV-uninfected children. *J Infect Dis* **196**:1662-1666.
17. **Kellner J, Scheifele D, Vanderkooi O, MacDonald J, Church D.** 2008. Effects of Routine Infant Vaccination with the 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Nasopharyngeal Colonization with *Streptococcus pneumoniae* in Children in Calgary, Canada. *Pediatr Infect Dis J* **27**:526-532.
18. **Moxon R, Snape MD.** 2013. The price of prevention: what now for immunisation against meningococcus B? *Lancet* **382**:369-370.
19. **Vipond C, Care R, Feavers IM.** 2012. History of meningococcal vaccines and their serological correlates of protection. *Vaccine* **30 Suppl 2**:B10-17.
20. **Schryvers AB, Morris LJ.** 1988. Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infection and Immunity* **56**:1144-1149.
21. **Schryvers AB, Morris LJ.** 1988. Identification and characterization of the transferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology* **2**:281-288.
22. **Rokbi B, Renauld-Mongenie G, Mignon M, Danve B, Poncet D, Chabel C, Caugant DA, Quentin-Millet M-J.** 2000. Allelic diversity of the two transferrin binding protein B gene isotypes among a collection of *Neisseria meningitidis* strains representative of serogroup B disease: implication for the composition of a recombinant TbpB-based vaccine. *Infection and Immunity* **68**:4938-4947.
23. **Rich RL, Myszka DG.** 2007. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Analytical biochemistry* **361**:1-6.

24. **Abdiche Y, Malashock D, Pinkerton A, Pons J.** 2008. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet. *Analytical biochemistry* **377**:209-217.
25. **Velazquez-Campoy A, Leavitt S, Freire E.** 2004. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol* **261**:35-54.
26. **Needleman SB, Wunsch CD.** 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of molecular biology* **48**:443-453.
27. **Smith TFaMSW.** 1981. Comparison of Biosequences. *Advances in Applied Mathematics* **2**:482-489.
28. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**:4673-4680.
29. **Henikoff S, Henikoff JG.** 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10915-10919.
30. **Carrillo H, and D. Lipman.** 1989. The Multiple Sequence Alignment Problem in Biology. *SIAM Journal on Applied Mathematics* **48**:1073-1082.
31. **Devereux J, Haerberli P, Smithies O.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic acids research* **12**:387-395.
32. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
33. **Green MR, Sambrook J.** 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
34. **Gonzalez GC, Caamano DL, Schryvers AB.** 1990. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Molecular Microbiology* **4**:1173-1179.
35. **Gray-Owen SD, Loosmore S, Schryvers AB.** 1995. Identification and characterization of genes encoding the human transferrin binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity* **63**:1201-1210.
36. **Gray-Owen SD, Schryvers AB.** 1995. Characterization of transferrin binding proteins 1 and 2 in invasive type b and nontypable strains of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity* **63**:3809-3815.
37. **Frandoloso R, Martínez S, Rodríguez-Ferri EF, García-Iglesias MJ, Pérez-Martínez C, Martínez-Fernández B, Gutiérrez-Martín CB.** 2011. Development and characterization of protective *Haemophilus parasuis* subunit vaccines based on native proteins with affinity to porcine transferrin and comparison with other subunit and commercial vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology* **18**:50-58.
38. **Ogunnariwo JA, Schryvers AB.** 1990. Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: Expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Infection and Immunity* **58**:2091-2097.
39. **Ogunnariwo JA, Cheng CY, Ford JA, Schryvers AB.** 1990. Response of *Haemophilus sommus* to iron limitation: Expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Microbial Pathogenesis* **9**:397-406.
40. **Myers LE, Yang Y-P, Du R-P, Wang Q, Harkness RE, Schryvers AB, Klein MH, Loosmore SM.** 1998. The transferrin binding protein B of *Moraxella catarrhalis* elicits bactericidal antibodies and is a potential vaccine antigen. *Infection and Immunity* **66**:4183-4192.
41. **Adamiak P, Calmettes C, Moraes TF, Schryvers AB.** 2014. Patterns of structural and sequence variation within isotype lineages of the *Neisseria meningitidis* transferrin receptor system. *Microbiology Open* Submitted.
42. **Harrison OB, Maiden MC, Rokbi B.** 2008. Distribution of transferrin binding protein B gene (tbpB) variants among *Neisseria* species. *BMC Microbiol* **8**:66.
43. **Moretti S, Armougom F, Wallace IM, Higgins DG, Jongeneel CV, Notredame C.** 2007. The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic acids research* **35**:W645-648.
44. **Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A.** 2011. *Geneious*, 5.4 ed.
45. **Castresana J.** 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol Biol Evol* **17**:540-552.
46. **Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O.** 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**:307-321.
47. **Tavare S.** 1986. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* **17**:57-86.
48. **Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard J-F, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie J-M, Gascuel O.** 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**:W465-W469.

49. **Dereeper A, Audic S, Claverie J-M, Blanc G.** 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol* **10**:8.
50. **DeWinter LM, Schryvers AB.** 2002. Methods for Manipulation of Transferrin-Binding Proteins, p. 109-120. *In* Pollard AJ, Maiden MC (ed.), *Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols*, vol. 66. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
51. **Schryvers AB, Lee BC.** 1993. Analysis of bacterial receptors for host iron binding proteins. *J.Microbiol.Methods* **18**:255-266.
52. **Niedz RP, Sussman MR, Satterlee JS.** 1995. Green Fluorescent Protein - an in-Vivo Reporter of Plant Gene-Expression. *Plant Cell Rep* **14**:403-406.
53. **Janson J-C.** 2013. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Application*, vol. 54. Wiley.
54. **Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B.** 2009. Vaccine Adjuvants: Current Challenges and Future Approaches. *J Pharm Sci-U.S.* **98**:1278-1316.
55. **Li Z, Kessler W, van den Heuvel J, Rinas U.** 2011. Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**:1203-1213.
56. **Jolley K, Maiden M.** 2010. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* **11**:595.
57. **Horton RM, Cai Z, Ho SN, Pease LR.** 1990. Gene splicing by overlap extension: Tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**:528-535.
58. **Noinaj N, Easley NC, Oke M, Mizuno N, Gumbart J, Boura E, Steere AN, Zak O, Aisen P, Tajkhorshid E, Evans RW, Gorringer AR, Mason AB, Steven AC, Buchanan SK.** 2012. Structural basis for iron piracy by pathogenic Neisseria. *Nature* **483**:53-58.
59. **Morgenthau A, Adamiak P, Livingstone MJ, Schryvers AB.** 2012. The role of lactoferrin binding protein B in mediating protection against lactoferricin. *Biochem Cell Biol* **90**:417-423.
60. **de la Fuente AJ, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Barbosa JI, Martínez-Martínez S, Frandoloso R, Tejerina F, Rodríguez-Ferri EF.** 2009. Blood cellular immune response in pigs immunized and challenged with Haemophilus parasuis. *Res Vet Sci* **86**:230-234.
61. **Gray-Owen SD.** 2003. Neisserial Opa proteins: impact on colonization, dissemination and immunity. *Scand J Infect Dis* **35**:614-618.
62. **Johsrich KO, McCaw SE, Islam E, Sintsova A, Gu A, Shively JE, Gray-Owen SD.** 2013. In Vivo Adaptation and Persistence of Neisseria meningitidis within the Nasopharyngeal Mucosa. *PLoS Pathog* **9**:e1003509.
63. **Mell JC, Redfield RJ.** 2014. Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *J Bacteriol* **196**:1471-1483.
64. **Redfield RJ, Findlay WA, Bosse J, Kroll JS, Cameron AD, Nash JH.** 2006. Evolution of competence and DNA uptake specificity in the Pasteurellaceae. *BMC Evol Biol* **6**:82.
65. **Ulanova M, Tsang R, Altman E.** 2012. Neglected infectious diseases in Aboriginal communities: Haemophilus influenzae serotype a and Helicobacter pylori. *Vaccine* **30**:6960-6966.
66. **Lee I, Davies RL.** 2011. Evidence for a common gene pool and frequent recombinational exchange of the *tbpA* operon in Mannheimia haemolytica, Mannheimia glucosida and Bibersteinia trehalosi. *Microbiology* **157**:123-135.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая трансферринсвязывающий белок В (ТбрВ), получаемый из грамтрицательного патогенного вида бактерий, для предупреждения инфекции или заболевания, вызванного грамтрицательным патогенным видом бактерий, где указанный ТбрВ содержит домен С-доли или домен N-доли, причем указанный домен С-доли или домен N-доли содержит множество β-слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из указанного множества петлевых доменов был модифицирован, и адъювант, причем указанный полипептид модифицирован таким образом, что значение константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и модифицированным ТбрВ по меньшей мере в 10 раз выше значения константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и нативным ТбрВ.

2. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный петлевой домен был модифицирован таким образом, что одна аминокислота в петлевом домене была заменена или удалена.

3. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный петлевой домен был удален полностью.

4. Иммуногенная композиция по п.3, дополнительно включающая замену петлевого домена участком полипептида ИОМ (integral outer membrane, интегрального полипептида внешней мембраны).

5. Иммуногенная композиция по п.4, где полипептид ИОМ представляет собой полипептид TbpA (transferrin binding protein A, трансферринсвязывающий белок А) или полипептид LbpA (lactoferrin binding protein A, лактоферринсвязывающий белок А).

6. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанный петлевой домен выбран из любой из петель L1-L32.

7. Иммуногенная композиция по п.6, отличающаяся тем, что указанный петлевой домен выбран из любой из петель, включающих L1, L5, L8, L12, L18, L21, L23 и L27.

8. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный полипептид TbpB получают из вида бактерий, относящегося к семейству бактерий Pasteurellaceae, Moxarellaceae или Neisseriaceae.

9. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный полипептид TbpB получают из вида бактерий, относящегося к роду бактерий Actinobacillus, Neisseria, Haemophilus, Mannheimia, Histophilus, Pasteurella или Moraxella.

10. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный домен С-доли представляет собой домен С-доли, который выбран из группы, представленной в SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 179-SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 230; SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 234-SEQ ID NO: 278 и SEQ ID NO: 288-SEQ ID NO: 292.

11. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный домен N-доли представляет собой домен N-доли, который выбран из группы, представленной в SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 127; SEQ ID NO: 229; SEQ ID NO: 231 и SEQ ID NO: 233.

12. Иммуногенная композиция по п.2, отличающаяся тем, что указанная иммуногенная композиция содержит любой из полипептидов TbpB, представленных в SEQ ID NO: 170; SEQ ID NO: 172; SEQ ID NO: 174; SEQ ID NO: 176; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32.

13. Иммуногенная композиция по п.5, отличающаяся тем, что указанные полипептиды TbpA и LbpA выбраны из SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 162.

14. Иммуногенная композиция по п.5, отличающаяся тем, что указанная иммуногенная композиция содержит гибридный полипептид TbpB-TbpA, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154; SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 158 или SEQ ID NO: 160; или гибридный полипептид TbpB-LbpA, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 164 или SEQ ID NO: 166.

15. Вакцинная композиция для предупреждения инфекции или заболевания, вызванного грамотрицательным патогенным видом бактерий, содержащая иммуногенную композицию по любому из пп.1-14.

16. Способ получения иммуногенной композиции, включающий:

(а) обеспечение последовательности химерной нуклеиновой кислоты, содержащей функционально связанные компоненты:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует модифицированный полипептид, содержащий домен С-доли или домен N-доли TbpB, получаемого из грамотрицательного патогенного вида бактерий, где указанный TbpB содержит домен С-доли или домен N-доли, причем указанные домен С-доли или домен N-доли содержат множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из указанного множества петлевых доменов был модифицирован, где значение константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и модифицированным TbpB по меньшей мере в 10 раз выше значения константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и нативным TbpB; и (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, способную контролировать экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в подпункте (i) подпункта (а) в рекомбинантной клетке-хозяине;

(b) введение последовательности химерной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина и выращивание клетки-хозяина для получения полипептида, содержащего домен С-доли или домен N-доли;

(c) восстановление полипептида, содержащего домен С-доли или домен N-доли, из клетки-хозяина

и

(d) получение иммуногенной композиции.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанный модифицированный полипептид представляет собой полипептид, в котором по меньшей мере один петлевой домен был удален полностью.

18. Способ индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта против по меньшей мере одного грамотрицательного патогенного бактериального штамма, причем указанный способ включает введение указанному субъекту:

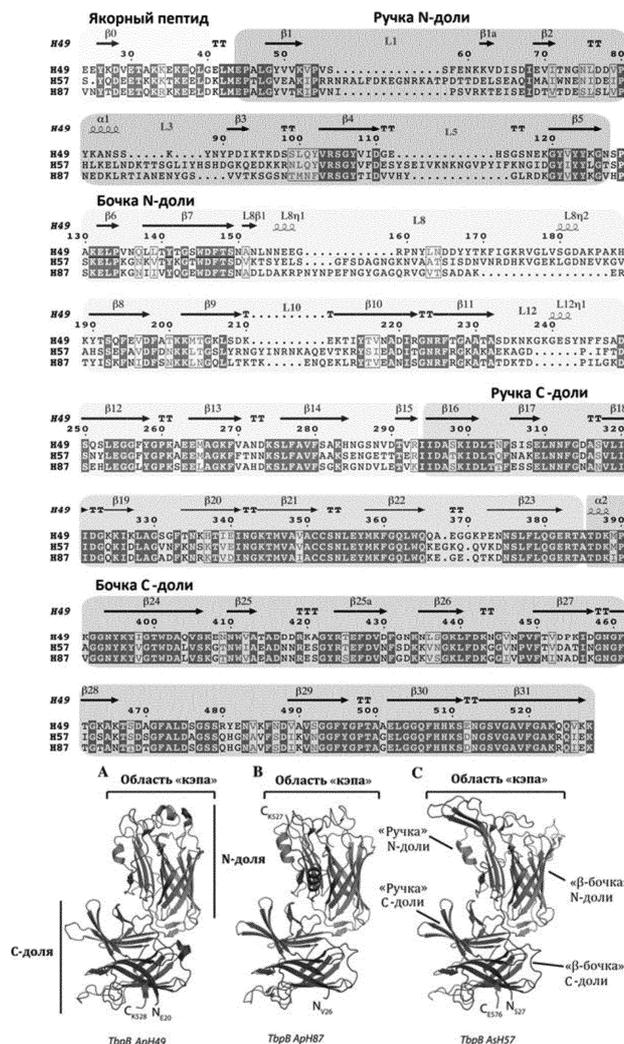
(а) иммуногена, содержащего полипептид TbpB, получаемый из грамотрицательного патогенного вида бактерий, где указанный TbpB содержит домен С-доли или домен N-доли, причем указанные домен С-доли или домен N-доли содержат множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из указанного множества петлевых доменов был модифи-

цирован, где значение константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и модифицированным TbpV по меньшей мере в 10 раз выше значения константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и нативным TbpV; или

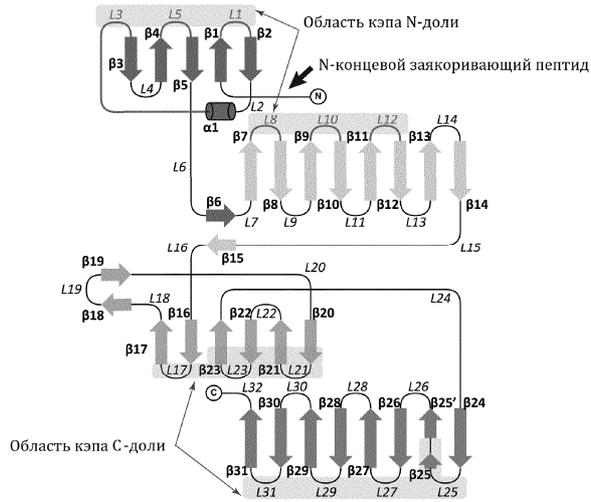
(b) вектора экспрессии, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген, содержащий полипептид TbpV, получаемый из грамотрицательного патогенного вида бактерий, где указанный TbpV содержит домен С-доли или домен N-доли, причем указанные домен С-доли или домен N-доли содержат множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из указанного множества петлевых доменов был модифицирован, где значение диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и модифицированным TbpV по меньшей мере в 10 раз выше значения константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и нативным TbpV; и

причем указанный иммуноген вводят или экспрессируют в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа у указанного позвоночного субъекта.

19. Применение иммуногена, содержащего полипептид, который содержит белок TbpV, получаемый из грамотрицательного патогенного вида бактерий, где указанный TbpV полипептид содержит домен С-доли или домен N-доли, причем указанные домен С-доли или домен N-доли содержат множество β -слоев, соединенных множеством петлевых доменов, и причем по меньшей мере один петлевой домен из указанного множества петлевых доменов был модифицирован, где значение константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и модифицированным TbpV по меньшей мере в 10 раз выше значения константы диссоциации K_d связывающего взаимодействия между нативным железосвязывающим белком хозяина и нативным TbpV, для получения лекарственного средства для индукции иммунного ответа у позвоночного субъекта.

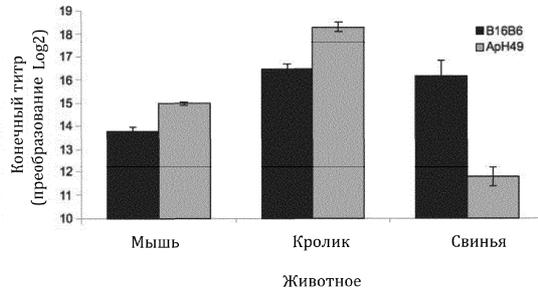


Фиг. 1



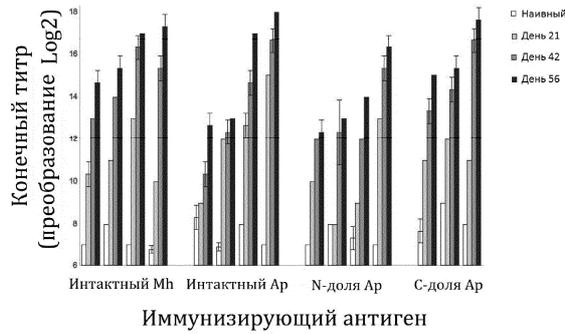
Фиг. 2

Титры антител против ТbrV у мышей, кроликов и свиней свидетельствуют об уменьшенном ответе антител у природного хозяина



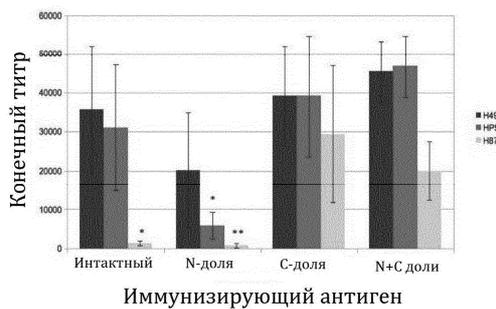
Фиг. 3А

Титры IgG свиней против вариантов ТbrV патогена свиней и ТbrV быка



Фиг. 3В

Эффективность и перекрестная реактивность иммунизации интактными белками по сравнению с иммунизацией долями



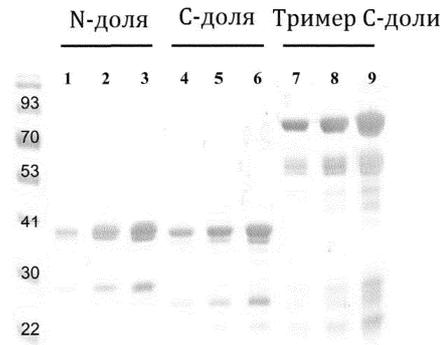
Фиг. 3С

Чертеж А

```

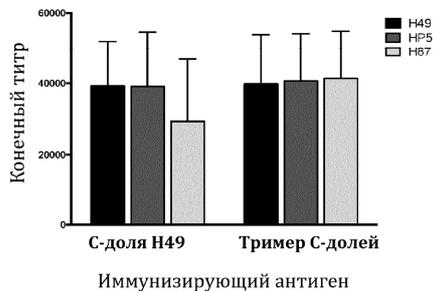
GACACCGTTCGATATTGATGCTCAAAAATTGATTAACAAATTCAGGATTCAGAACTAACAAATTTGGTGATGCTCCGTTTAATAT
D T V R I I D A S K I D L N F S I S E L N N F G D A S V L I I
TGATGGGAAAAATAAGCTAGCTGCTAGCGGGTTTCAAAATAAGCACACTATTGAAATCAATGGCAAAACAATGGTAGCCGTGCTGCTGTA
D G K K I K L A G S G F T N K H T I E I N G K T M V A V A C C
GTAATCTGGAATATGAAATTTGGTCAATTTGGCAACAAGCAGAGGGGCAAAACCAGAAATAATGTTTATCTCAAGGCCAAGCTACC
S N L E Y M K F G Q L W Q Q A E G G K P E N N S L F L Q G E R T
GCAACAGATAAGATGCAAAAAGCGGAACTATAAATATTTGGTACTTGGGATGCTCAGGTTTCAAAAGAAAATAACTGGGTTGCTACGGCAGA
A T D K M P K G G N Y K Y I I G T W D A Q V S K E N N W V A T A D
I G A I G A T A G A A A G C I G G I A T C G C A L A G A A I I I G A I G I I G A I I I G G L A A L A A A A I I A A G I G I A A G I I A I I I G A I A A A A L G G I G I A A T C
D D R K A G Y R T E F D V D F G N K N L S G K L F D K N G V N
CTGTGTTACCTAGATGCAAAAATTGATGGTAAATGGTTTACCTGGCAAGCTAAAACCTCAGATGCTGGTTTCGCTCTAGATTCAGGTAGTTCA
P V F T T V D A K I D G N G F T G K A K T S D A G F A L D S G S S
CGTTATGAGAATCTGAAATTTAACGATGATAGCAGTGTAGTGGCTCTCTATGGTCAACGGCAGCAGAGCTTGGCGGACAATTCACCAATAATC
R Y E N V K F N D V A V S G G F Y G P T A A E L G G Q F H H K S
A G A A A T G C A A G T G A G T G C T C T T T G G T C A A A A C A A G A T A A A A A C T T G A A C A C T C A G A T C A T T G A T G C C T C A A A A T T G A T T A A
E N G S V G A V F G A K Q Q V K K
L E T V K I I D A S K I D L
CTACTTTTGAATCATCGAACTCAACAATTTGGCAACGCTAATGTTAATTTGATGGACAGAAAATAGATCTAGCAGGTGCAGATTTAAA
T T F E S S E L N N F G N A N V L I I D G Q K I D L A G A D F K
A A T G A A A A C C G T T G A T C A A T G A A G A C A A T G T A G C A T A G C T T G C T G A T A A T T T G G A A T A T A G A A T T T G G T C A A T T A T G G C A A A
N R K T V D I N G K T M V A I A C C S N L E Y M K F G Q L W Q K
A G A G G C C A A C A A C T A A A G A T A T A G C T T A T C T G C A A G G T G A G C T A C T G C C A C A G A T A A A A T C C G T A G T G G A A C T A T A A A T A T G T A G
E G E Q T K D N S L F L Q G E R T A T D K I P V V G G N Y K Y V
G A A C T G G G A T G C A C T G T T T C A A A A G G A A C G A A C T G G G T A G C T G A G G C G G A T A A T A T C G A G A A T C G G G C T A T C G C T C A G A A T T T G A T G T T A A T
G T W D A L V S K G T N W V A E A D N N R E S G Y R S E F D V N
T T T G T G A T A A A A A G T A A G C G C A A G T T A T T T G A T A A G G G G C A T A G T A C C T G C T T T A T G A T C A A C G C A G A T A T A A A G G T A A C C G C T T T A C
F G D K K V S G K L F D K G G I V P V F M I N A D I K G N G F T
T G G A C A C T A A C A C A G A T A C A G C C T T T G C G T A G A T T C A G C C T A G C C A A C A C G G A A A T C G C G T A T T A G T G A T A A A A G T C A A T G G T G
G T A N T T D T G F A L D S G S S Q H G N A V F S D I K V N G
G C T T C T A T G T C C A A C C G C T G G A G A C T T G G C G G A C A A T T C A T C A T A A A T C A G A C A A T G C C A G T G T G G C G C T G C T T T G G T G C A A A C G A C A A
G F Y G P T A G E L C G G Q F H H K S D N E S V G A V F G A K R Q
A T A G A A A A C C G C C A G A G C G A T C A T T G A T G C A C T A A A A T T G A T T A A C C C A A T T T A A T G T A A A G A C T C A A C A A T T T T G T G A T G C C T C
T T T T E R I I D A T K I D L T Q F N A K E L N N F G D A S
I E K
T G T T T A A T T A T T G A T G C A A A A A T A G A T C A G C G G T G T C A A T T T T A A A A T A G T A A A C G G T T G A A A T C A A C G G C A A A C A A T G G T A G C C G
V L I I D G Q K I D L A G V N F K N S K T V E I N G K T M V A
T A G C T T G C T G T A A T C T G G A T A T A T G A A T T T G G T C A A T T G T G C A A A A A G G G C A A C A A C A A G T T A A G A T A A T A G T T A T C T A C A A
V A C C S N L E Y M K F G Q L W Q K E G K Q Q V K D N S L F L Q
G G T A A C T A C C A A C G A T A A A T C C C G A G G A G T A A C T A A G T A T G T T G G A A C T T G G A T G C A C T G T A T A A A G G A C C A A C T G G A T
G E R T A T D K M P A G G N Y K Y V G T W D A L V S K G T N W I
A G C G A A C A G A T A A T C G A G A A T C G G C T A T C G C A T G A A T T G A T T A A T T A G T A T A A A A G T A A A C G G T A A G T A T T G A T A A G
A E A D N N R E S G Y R T E F D V N F S D K K V N G K L F D K
G C G G T G T A A T C C T G T A T T A C C G T A G A T C C G A C A A T T A A T G G T A A T G C C T T A T C G G C A G T C G G A A A C C T C T G A T G T G C C T T G C T T A G A T
G G V N P V F T V D A T I N G N G F I G S A K T S D S G F A L D
C A G G C T A G C C A A C G G A A T C C G T A T T A G T A T A A A A G T C A A T G G T G C T C T A T G T C C A A C C C T G G A A C T T G C G G A C A A T
A G S S Q H G N A V F S D I K V N G G F Y S P T A G E L G G Q F
C C A T A T A A T C A G A C A A T G C C A G T G T T G G C C T G C T T T G G T G C A A A C G C A A A T A G A A A A
H H K S D N G S V G A V F G A K R Q I E K
    
```

Чертеж В

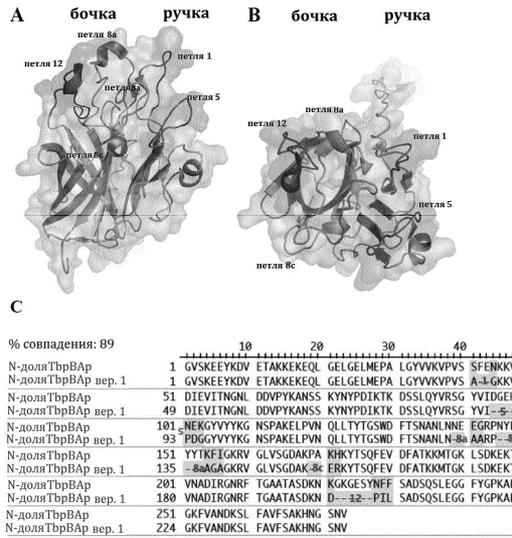


Фиг. 6

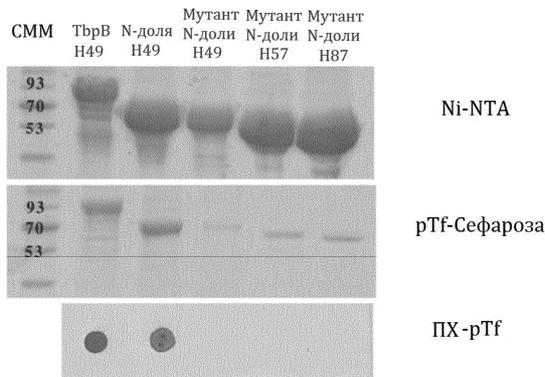
Перекрестная реактивность С-доли H49 по сравнению с тримером С-долей



Фиг. 7

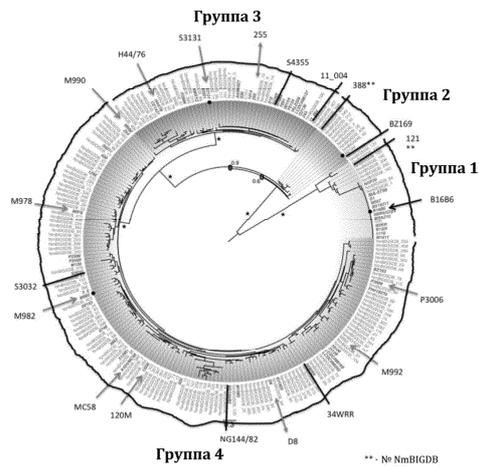


Фиг. 8



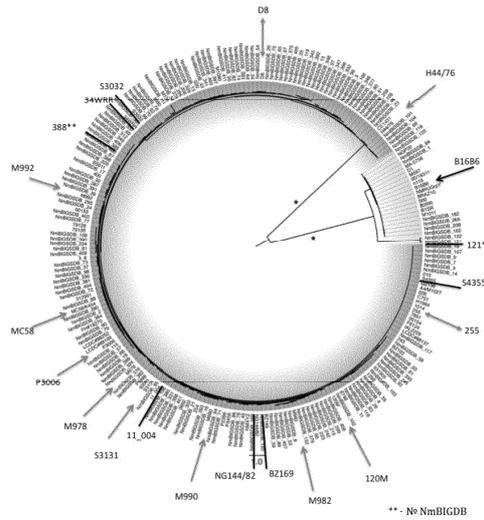
Фиг. 9

Разнообразие последовательностей ТррВ *Neisseria meningitidis*

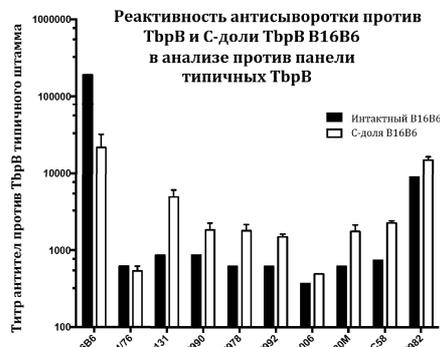


Фиг. 10А

Разнообразие последовательностей TbpB *Neisseria meningitidis*



Фиг. 10В



Источник рекомбинантного TbpB – штамм *N. meningitidis*

Фиг. 11

Чертеж А

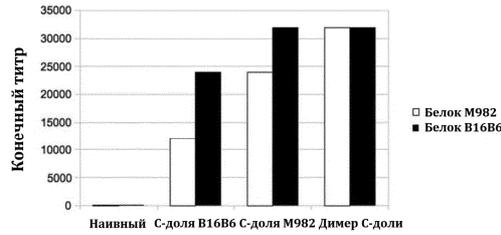
```

GGATCTTCTGAAAACAGTAACTGACCCAGGTTTGGATCGGGTTGAATTGACACTAAACGAAAGAAATCAAAAATCTCGAACACTTGAGCAATGCCCC
> G S S E N S K L T T V L D A V E L T L N D K K I K N L D N F S N A A
CSAATGGTTGTCGACGCAATATGATTCCTCTCCSAAGATTCCGAAACCGGAACTCAGGCAAGTAAAGTAAACCGCGCAACAGAAATTA
> Q L V V D S G I M I P L L P K D S E S G N T Q A D K G K N G S T E F
CCGCAATTTGAAACACCCCGGAAAGTGTAAAAAAGCCGCAACAGCTACGCAAGCAATGGGGCGAAACCGCTCAATACGGCAGTGTATACC
> T R K F E N T P E S D K K D A Q A G T Q T N G A Q T A S N T A G D T
AATGGCAAAACAAACCTATGAATCGAAGTCTGCTGTTCCSAACCTCAATATCTGAATACGGAATGTTGACCGCAAAACAGCAAGTCCCGCATGCA
> N G K T K T Y E V E V C C S N L N Y L K Y G M L T R K N S K S A M Q
GGCAAGGAGCAAGTGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
> A G G N S S Q A D A K T E Q V E Q S M F L Q G E R T D E K E I P T
ACCAAACTCTTTATCCGGGGTCTTGGTACGGGCTATTGCCAAGCGCACAACTGGAGCGCAATGCTCTGATAAAGAGGGCGCACAGGGCGGAA
> D Q N V Y R G S W Y G H I A N G T S W S G N A S D K E G G N R A E
TTACTGTCGAATTTGCCGTAABAAATACCGCAATTAACCGGTGAACAGGCAAGCCCAACTTACCAATGAGGCAATGATTCAGCGCAAGCG
> P V V N F A D K K I T G K L T A E N R Q A Q T T I E G M I Q G N G
CTTTGAAGTACGGCAAACTGCTGATCGAGTTTGTCTGATCAAAAATACCAACCCGCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
> F E G T A K T A E S G F D L D Q K N T T R T P K A Y I T D A K V K
CGGGTTTTACGGGCTAAAGCGGAGGTTGGCGGATGGTTTGCCTACCGCGGATAACAAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
> S G F Y G P K A E L L S G W F A Y P G D K Q T E K A T A T S D E N
TCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
> S A S S A T V V F G A K R Q Q P V Q G E N A A G P A T E T V I D A
ATACGATTTACCGCGAGGATTTAAGAAAGCAAAATAGACAGTTTGGAGATGTGAAAAAGCTGCTGTTGACCGGAGTGAAGTTCCTGCTGCCCT
> Y R I T G E F K E Q I D S F G D V K K L L V D G V E L S L L P
CTGAGGCAATGAGGCAATTTCAAGCAAGTGTGCAAGCAAGTGTGCAAGCAAGTGTGCAAGCAAGTGTGCAAGCAAGTGTGCAAGCAAGTGTGCAAGCAAG
> S E G N K A A F Q H E I E Q N G V K A T V C C S N L D Y M S F G K L
TCAAAAGAAATAAAGAGATATGTTCTGCAAGGTGTCCGCACTCAAGTATCCGATGTGCGGCAAGGAGGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
> S K E N K D D M F L Q G V R T P V S D V A A R T E A N A K Y R G T W
GTACGATATATGCAAGCAAGCAAGTGTGAGCGGCAAGCTCAATCAGGAGGTGTAAAGGCAAGTGTGCAAGCAAGTGTGCAAGCAAGTGTGCAAGCAAG
> Y G Y I A N G T S W S E A S N Q G E N R A E F D V D F S T K K
TCAGTGGCAACTGACGGCAAGCAAGTGTGCTCTGCTGCTTACTACTCCATGATTAAGCAAGCAAGTGTTCAGGTGTGGCAAGCAAGTGTGCAAG
> I S G T L T A K D R T S P A F T I T A M I K D N G F S G V A K T G E
AAAGCTTTGCGCTGATCGCAAAATACCGCAATTCSSACTATACGATATTGAGCCACTGTATCGCGGTTTCTACGGCAAGCAAGCAAGCAAGTGTG
> N G F A L D P Q N T G N S H Y T H I E A T V S G G F Y G K N A I E M
GGGGGATCGTTCTATTTCCGGCAATGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
> G G S F S F P G N A P E G K Q E K A S V V F G A K R Q Q L L V Q
    
```

Чертеж В

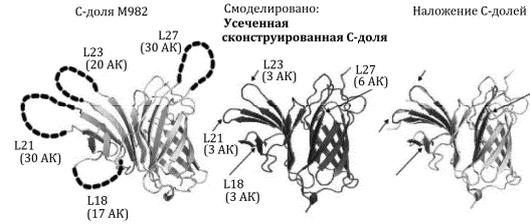


Фиг. 12



Иммунизирующий антиген
Фиг. 13

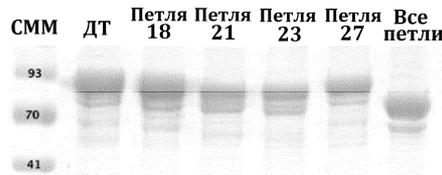
Чертеж А



Чертеж В

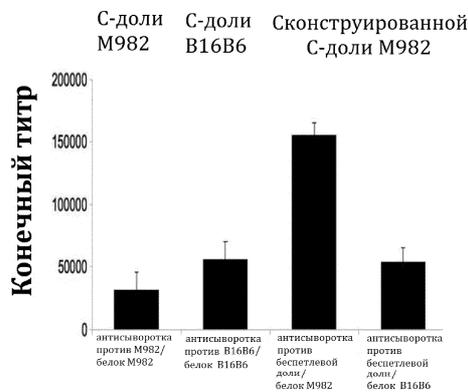
	10	20	30	40	50	60	70	
DT	1	SSSENSKLT	VLDAVELTLN	DKIKRLDNF	SMAAQLVVDG	IMPLLPKDS	ESQNTQADGK	KNGGTEFTRK
петля1	1	SSSENSKLT	VLDAVELTLN	DKIKRLDNF	SMAAQLVVDG	IMDL	---	---AGTEFTRK
петля2	1	SSSENSKLT	VLDAVELTLN	DKIKRLDNF	SMAAQLVVDG	IMPLLPKDS	ESQNTQADGK	KNGGTEFTRK
петля3	1	SSSENSKLT	VLDAVELTLN	DKIKRLDNF	SMAAQLVVDG	IMPLLPKDS	ESQNTQADGK	KNGGTEFTRK
петля4	1	SSSENSKLT	VLDAVELTLN	DKIKRLDNF	SMAAQLVVDG	IMPLLPKDS	ESQNTQADGK	KNGGTEFTRK
беспетлевая	1	SSSENSKLT	VLDAVELTLN	DKIKRLDNF	SMAAQLVVDG	IMDL	---	---AGTEFTRK
DT	71	FEHTPESDKK	DAQACTQTNG	AQTASMTAGD	TNGKTKTYEV	EVCCSNLNYL	KYQMLTRKNS	KSAMQAGGNS
петля1	54	FEHTPESDKK	DAQACTQTNG	AQTASMTAGD	TNGKTKTYEV	EVCCSNLNYL	KYQMLTRKNS	KSAMQAGGNS
петля2	71	FEHT	---	---	INGK	---	YEV	EVCCSNLNYL
петля3	71	FEHTPESDKK	DAQACTQTNG	AQTASMTAGD	TNGKTKTYEV	EVCCSNLNYL	KYQMLTRKNS	KSAMQAGGNS
петля4	71	FEHTPESDKK	DAQACTQTNG	AQTASMTAGD	TNGKTKTYEV	EVCCSNLNYL	KYQMLTRKNS	KSAMQAGGNS
беспетлевая	54	FEHT	---	---	INGK	---	YEV	EVCCSNLNYL
DT	141	SQADAKTEQV	EQSMFLQGER	TDEKEIPTDQ	NVYVRSWYQ	HIANGTSWSG	NASDKEGGR	AFTVNFADK
петля1	124	SQADAKTEQV	EQSMFLQGER	TDEKEIPTDQ	NVYVRSWYQ	HIANGTSWSG	NASDKEGGR	AFTVNFADK
петля2	113	SQADAKTEQV	EQSMFLQGER	TDEKEIPTDQ	NVYVRSWYQ	HIANGTSWSG	NASDKEGGR	AFTVNFADK
петля3	130	---	---	---	---	---	---	---
петля4	141	SQADAKTEQV	EQSMFLQGER	TDEKEIPTDQ	NVYVRSWYQ	HIANGTSWSG	NASDKEGGR	AFTVNFADK
беспетлевая	85	---	---	---	---	---	---	---
DT	211	KITGKLTAEV	ROAQFTTIEG	MEQNGFEGT	AKTAESEFDL	DQONTTRPK	AYITDAVKVG	GFYQKAEEL
петля1	194	KITGKLTAEV	ROAQFTTIEG	MEQNGFEGT	AKTAESEFDL	DQONTTRPK	AYITDAVKVG	GFYQKAEEL
петля2	183	KITGKLTAEV	ROAQFTTIEG	MEQNGFEGT	AKTAESEFDL	DQONTTRPK	AYITDAVKVG	GFYQKAEEL
петля3	193	KITGKLTAEV	ROAQFTTIEG	MEQNGFEGT	AKTAESEFDL	DQONTTRPK	AYITDAVKVG	GFYQKAEEL
петля4	211	KITGKLTAEV	ROAQFTTIEG	MEQNGFEGT	AKTAESEFDL	DQONTTRPK	AYITDAVKVG	GFYQKAEEL
беспетлевая	148	KITGKLTAEV	ROAQFTTIEG	MEQNGFEGT	AKTAESEFDL	DQONTTRPK	AYITDAVKVG	GFYQKAEEL
DT	281	GNFAYPGDK	QTEKATATSS	DQNSASSATV	VFGAKRQPPV	Q		
петля1	264	GNFAYPGDK	QTEKATATSS	DQNSASSATV	VFGAKRQPPV	Q		
петля2	253	GNFAYPGDK	QTEKATATSS	DQNSASSATV	VFGAKRQPPV	Q		
петля3	263	GNFAYPGDK	QTEKATATSS	DQNSASSATV	VFGAKRQPPV	Q		
петля4	281	GNFAYPGDK	QTEKATATSS	DQNSASSATV	VFGAKRQPPV	Q		
беспетлевая	218	GNFAYPGDK	QTEKATATSS	DQNSASSATV	VFGAKRQPPV	Q		

Фиг. 14



Фиг. 15

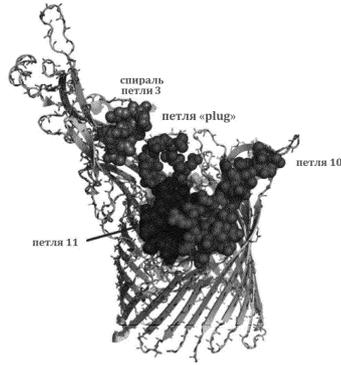
Антисыворотка против



Интактный ТрpV M982 Интактный ТрpV V16B6 Интактный ТрpV M982 Интактный ТрpV V16B6

Антиген ELISA
Фиг. 16

Чертеж А



Чертеж В

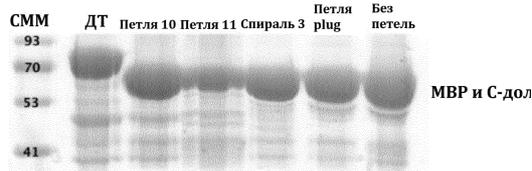
% совпадения: 76

Петля ТврА	1	SSSEMSKLT	TT	VLDAVEL	TLN	DKKIKMLNF	SMAAQI	VVDG	IMPLI	PKDS	ESGNTD	RDGK	KNGGTE	FTFRK
С-доля	1	SSSEMSKLT	TT	VLDAVEL	TLN	DKKIKMLNF	SMAAQI	VVDG	IMPLI	PKDS	ESGNTD	RDGK	KNGGTE	FTFRK
Беспетлевая С-л...	1	SSSEMSKLT	TT	VLDAVEL	TLN	DKKIKMLNF	SMAAQI	VVDG	IMPLI	PKDS	ESGNTD	RDGK	KNGGTE	FTFRK
Петля ТврА	67	FEN	AREKETE	LLES	RALLNG	KSNNTAK	TARETIT	YEV	EVCCSNL	NLYL	KYGM	TRQK	KSARQ	AGG
С-доля	71	FEN	PRESURK	DAQAG	QTNG	AQTAS	TAGD	TNGKTR	YEV	EVCCSNL	NLYL	KYGM	TRQK	KSARQ
Беспетлевая С-л...	54	FEN	---	ПЕТЛЯ 2	---	---	---	TNGKTR	YEV	EVCCSNL	NLYL	KYGM	TRQK	---
Петля ТврА	134	AVNCH	RQVGV	YNRYA	EQSM	FLOGERT	DEK	EIP	TQNVVY	RSWYGH	AIAN	GSWSG	MSASD	KEGGR
С-доля	139	NSQSDI	---	---	---	FLOGERT	DEK	EIP	TQNVVY	RSWYGH	AIAN	GSWSG	MSASD	KEGGR
Беспетлевая С-л...	85	ПЕТЛЯ 2	---	---	---	FLOGERT	DEK	EIP	TQNVVY	RSWYGH	AIAN	GSWSG	MSASD	KEGGR
Петля ТврА	204	VNFAD	KKLTG	KLTAEN	RQAO	TFTIE	GMQG	NGFEG	TAKTA	ESGF	DLQOM	TTRTP	KAYIT	DAKV
С-доля	205	VNFAD	KKLTG	KLTAEN	RQAO	TFTIE	GMQG	NGFEG	TAKTA	ESGF	DLQOM	TTRTP	KAYIT	DAKV
Беспетлевая С-л...	142	VNFAD	KKLTG	KLTAEN	RQAO	TFTIE	GMQG	NGFEG	TAKTA	ESGF	DLQOM	TTRTP	KAYIT	DAKV
Петля ТврА	274	PKAEEL	GGWF	AYP	GDQTEK	ATA	TSDDKS	ASS	ATV	VFGA	KRQ	QPVQ	---	---
С-доля	275	PKAEEL	GGWF	AYP	GDQTEK	ATA	TSDDKS	ASS	ATV	VFGA	KRQ	QPVQ	---	---
Беспетлевая С-л...	212	PKAEEL	GGWF	AYP	GDQTEK	ATA	TSDDKS	ASS	ATV	VFGA	KRQ	QPVQ	---	---

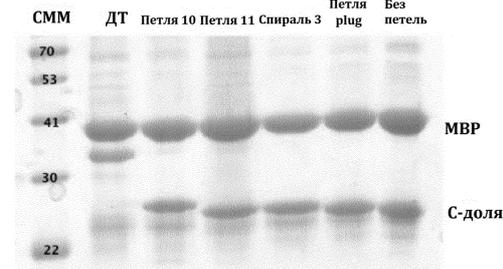
Петля plug ТврА Петля 10 ТврА
 Петля 11 ТврА Спираль петли 3 ТврА

Фиг. 17

Чертеж А

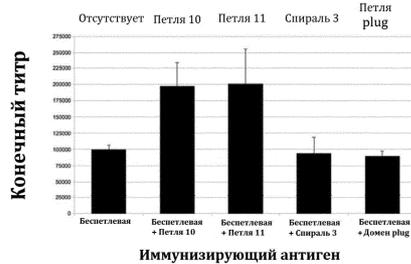


Чертеж В



Фиг. 18

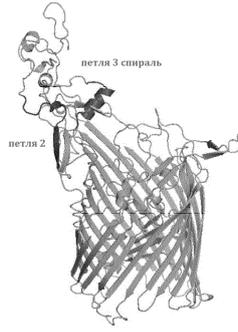
Антисыворотка против «беспетлевой» С-доли с петлями ТврА



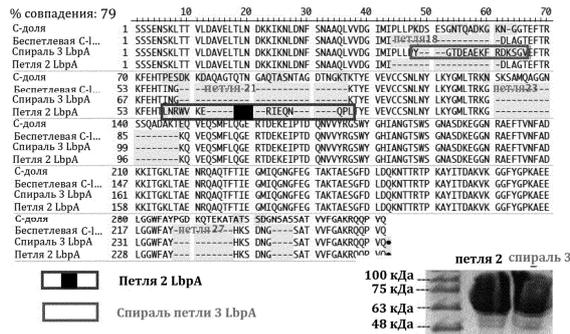
Антиген ELISA для всех образцов представляет собой С-долю со всеми четырьмя петлями ТврА

Фиг. 19

Чертеж А



Чертеж В



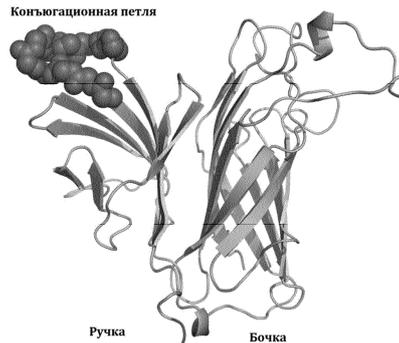
Фиг. 20

А

```

BamHI
GGATCCGGACCACCGACCGACCGCAACCGGAAACCGATCGACCCACCAACCGCGAAACTTACCAACAAGATATTAGCAGCTTTGGCGAAGCGGATATCTGCTGATTGA
  A T T S T T A N A K T D A T T N A E N F T T K D I S S F G E A D Y L L I D
TAACTATTCCGTCCGCTCCGCGGAAACCGAAACCGCGGATTTTCGACCGACCAAGATTGAAATTCGATGAAACTTAAAGTGGAAAGCTCCGTCGAAACCTGCA
  N Y P V P L L P E T E N S G D F A T S K N Y E V R D K T Y K V E A C S K N L
GCTATGTGAAATTTGGCATGTATTATGAAACCAACCGCCCGCGCGGAAACCGAAAGCGGAGAAAAACCGAAAAACCGCGGCTGAAAGCGCTGA
  S Y V K F G M Y U E T K R P A A K P K A Q K K R K K K T G V K S V
AAAGGCGAAAAAATTAATAAAAGGCGCAAAAGCGCGTGAATAAAAGGCGCAAAAGGCGCGAAAAAGGCGCGAAAAAGGCGCGAAAAAGGCGCGAAAAAGGCGCG
  K K G K K K I K K K K G T K K A A V K K K G S K K K A V K G K K A
AAAAACCGAAAAAAGCGCGCAAAAGGCGCGGAGCGGAGCAAGGCGATTCGCGCGCGCGGAAAGCGCGGAAAGCGCGCAACATTAATATCATCA
  K K P K K S P T K K G S G S K G I L L A P K A P K A P K G R N I K Y H C
GTTTCTCCGCGGCTCCGCGGAGCGCAAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCG
  F L L G L R T A S S K I P T T G N V K Y R G S W F G Y I S D G E T S Y S T T
GCGATAAGCGCGGATAAAGCGCGGCGGAAATTTGATGTGACTTTCCGAAAAACCGTGAAGGCGCGCTGAAGCGCGGATAGCAGAACCGCGTGTGTAGATTGA
  G D K R C D K N A V A E F D V N A E K T L K G S L K R A D S C N P V F S I E
GCGAATTTAAAGCGCGGCAACCGCGTTCACCGCGCGCGGAGGCGCGAAAGGCGCGTGTGTGATGTGCGAAAAACCGCGAGCGCGCAAGCAAAACCGCGGATTAACTACCAACAAAT
  A N F K N G N A F T G T A T A K D L V I D G K N S C T K N T P I N I T T K V
GAAAGCGCGGCTTTTATGCGCGGAGCGCGAGCGCGGCGGCTTTTACCTATACCGCGCAAAAGGCGCGGATAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCGAAAGGCGCGAA
  N G A F Y G P N A S E L G V E T Y N G K N P T D K N S P T A S S P S N S E
XbaI HindIII
AAGCGCGCGCGGCGGTGTGTGTTTGGCGCGGAAAGGCGCGGAAACCGCAACCAATATCTAGAGGCTT
  K A B A A V V F B A K C V E T N N K
    
```

В



Фиг. 21

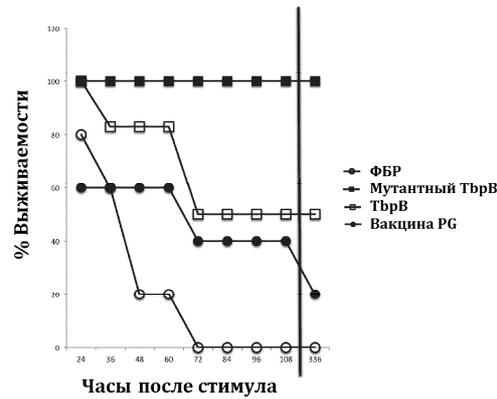
Константы аффинного связывания ТбрВ дикого типа и мутантного ТбрВ

Белок	Мутация	Петля	Kd	Метод
АрН49ТбрВ	ДТ		55 нМ	ИТК
АрН49ТбрВ	F171A	L8	ОСО	ИТК
АрН49ТбрВ	ДТ		44 нМ	ППР
АрН49ТбрВ	F171A	L8	ПО	ППР
АрН87ТбрВ	ДТ		60 нМ	ППР
АрН87ТбрВ	Y95A	L3	585 нМ	ППР
АрН87ТбрВ	Y121A	L5	203 нМ	ППР
АрН87ТбрВ	Y174A	L8	8,9 мкМ	ППР
АрН87ТбрВ	R179E	L8	6,1 мкМ	ППР
АсН57ТбрВ	ДТ		120 нМ	ППР
АсН57ТбрВ	F63A	L1	326 нМ	ППР
АсН57ТбрВ	F152A	L5	495 нМ	ППР
Нр5 ТбрВ	ДТ		21 нМ	ИБС
Нр5 ТбрВ	Y93 A	L3	ПО	ИБС
Нр5 ТбрВ	Y117A	L5	ПО	ИБС
Нр 5 ТбрВ (e4535)	Y167A	L8	40 мкМ	ИБС
Нр5 ТбрВ	W176A	L8	ПО	ИБС
Нр5 ТбрВ (e4597)	Y167A, W176A	L8	ОСО	ИБС

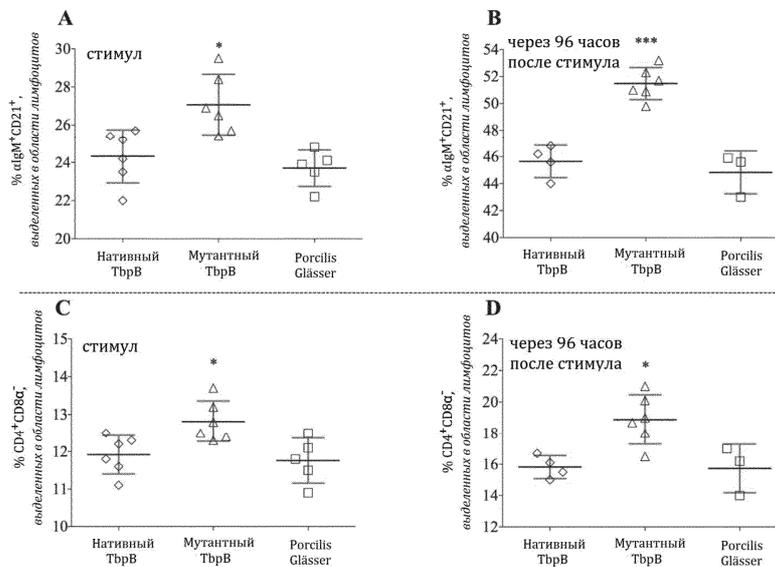
ПО – Подлежит определению
 ОСО – Обнаруживаемое связывание отсутствует
 ИТК – Изотермическая титрационная калориметрия
 ППР – Поверхностный плазмонный резонанс
 ИБС – Интерферометрия биослоя

Фиг. 22

% Выживаемости иммунизированных свиней

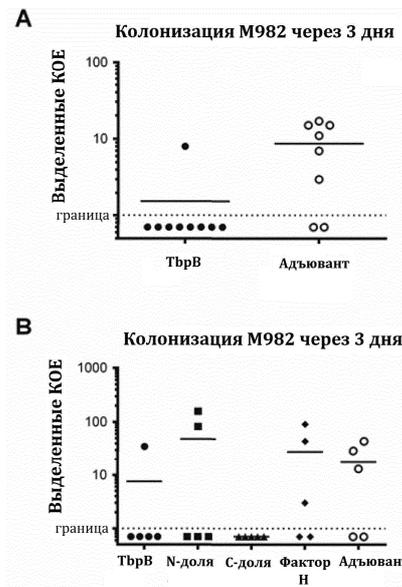


Фиг. 23



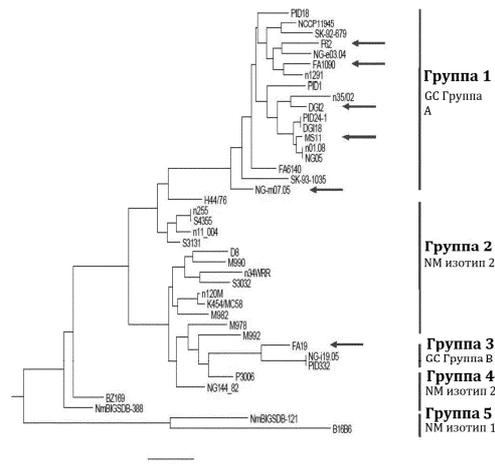
Фиг. 24

ТрpВ и С-доля ТрpВ вызывают иммунитет слизистых оболочек, обеспечивающий полное подавление



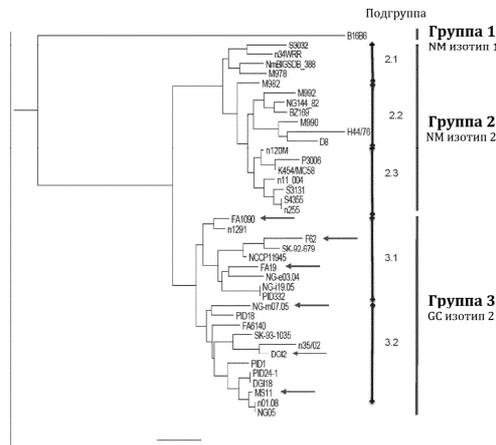
Фиг. 25

Разнообразие последовательностей интактных ТрpВ из *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae*



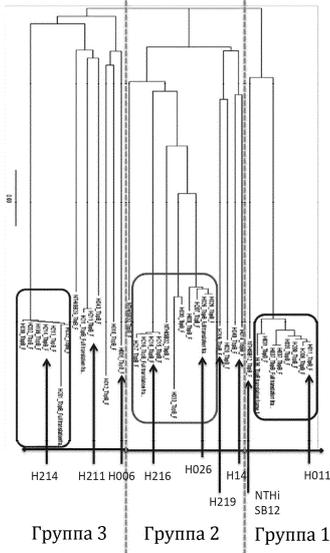
Фиг. 26А

Разнообразие последовательностей долей ТрpВ из *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae*



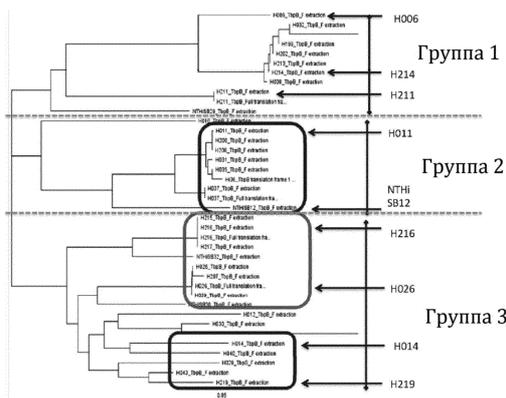
Фиг. 26В

Разнообразие последовательностей ТррВ *Haemophilus influenzae*



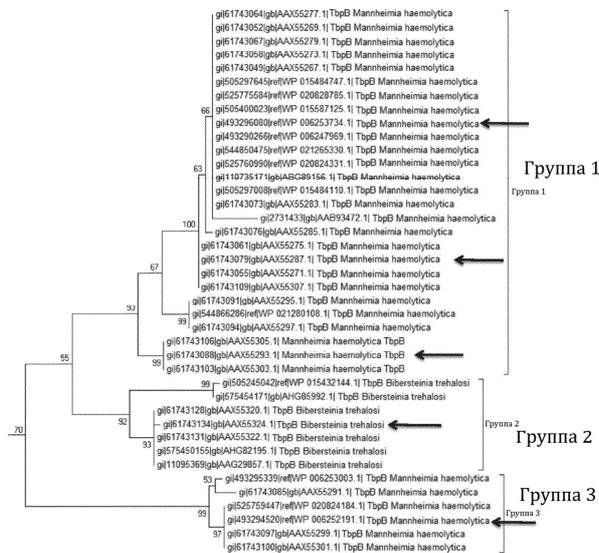
Фиг. 27А

Разнообразие последовательностей С-долей ТррВ *Haemophilus*



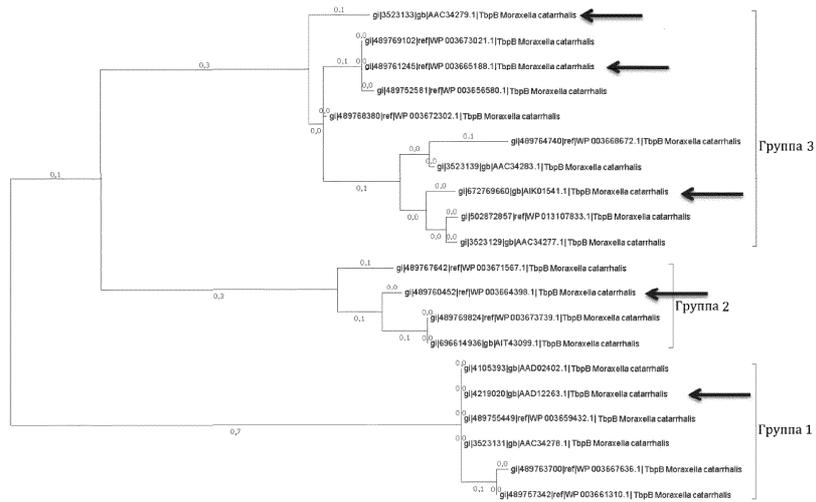
Фиг. 27В

Разнообразие последовательностей ТррВ из патогенов жвачных животных



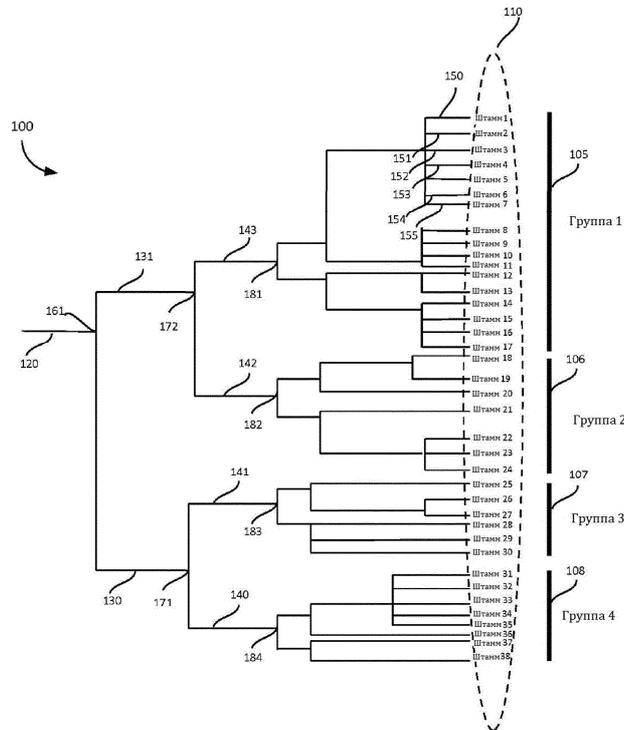
Фиг. 28

Разнообразие последовательностей ТbpВ из *Moraxella catarrhalis*



Фиг. 29

Иллюстративное филогенетическое дерево



Фиг. 30



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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