(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 038940 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.12

(21) Номер заявки
201692554

(22) Дата подачи заявки
2015.07.16

(51) Int. Cl. ***A61K 39/095*** (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) МЕНИНГОКОККОВЫЕ ВАКЦИНЫ

(31) **14177563.5**
(32) **2014.07.17**
(33) **EP**
(43) **2017.07.31**
(86) **PCT/EP2015/066229**
(87) **WO 2016/008961 2016.01.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЛАКСОСМИТКЛАЙН БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А. (BE)

(72) Изобретатель:
Бьольки Алессиа, Брунелли Брунелла, Джульяни Марциа Моника, Мазиньяни Вега (IT)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В. (RU)

(56) WO-A1-2013186753
WO-A2-2007060548
WO-A2-2004048404
WO-A2-2006024954
WO-A1-2011110634

ESPOSITO SUSANNA ET AL.: "A phase II randomized controlled trial of a multicomponent meningococcal serogroup B vaccine, 4CMenB, in infants (II).", HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS JUL 2014, vol. 10, no. 7, 11 July 2014 (2014-07-11), pages 2005-2014, XP009181621, ISSN: 2164-554X, the whole document, * see in particular page 2007, table 1, table 3, Figure 2*

"Assessment report Bexsero; Procedure No. EMEA/H/C/002333", 15 November 2012 (2012-11-15), XP055157250, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002333/WC500137883.pdf [retrieved on 2014-12-08], the whole document, * see in particular pages 1/102-2/102, 9/102-10/102, 20/102, 21/102, table 1 on page 22/102 *

Dan M. Granoff ET AL.: "Chapter 21 SECTION TWO: Licensed vaccines - Meningococcal vaccines", In: "Vaccines (6th Edition)", 1 January 2013 (2013-01-01), Elsevier, XP055150061, ISBN: 978-1-45-570090-5, pages 388-418, the whole document

D.M. GRANOFF ET AL.: "Does Binding of Complement Factor H to the Meningococcal Vaccine Antigen, Factor H Binding Protein, Decrease Protective Serum Antibody Responses?", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 20, no. 8, 5 June 2013 (2013-06-05), pages 1099-1107, XP055150093, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00260-13, the whole document, * see in particular pages 415-418 *

PETER T. BEERNINK ET AL.: "The Effect of Human Factor H on Immunogenicity of Meningococcal Native Outer Membrane Vesicle Vaccines with Over-Expressed Factor H Binding Protein", PLOS PATHOGENS, vol. 8, no. 5, 10 May 2012 (2012-05-10), page e1002688, XP055157328, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002688, the whole document

KOEBERLING OLIVER ET AL.: "Meningococcal outer membrane vesicle vaccines derived from mutant strains engineered to express factor H binding proteins from antigenie variant groups 1 and 2", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 16, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 156-162, XP009137318, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00403-08, the whole document

(57) Менингококковые вакцины могут быть улучшены посредством включения совокупности аллелей или вариантов fHbp для обеспечения более широкого покрытия разнообразия, известного для данного белка, и/или посредством уменьшения количества OMV-компонента в каждой дозе.

038940 B1

038940 B1

Область изобретения

Изобретение относится к области менингококковой вакцинации.

Предшествующий уровень техники

Neisseria meningitidis представляет собой грамотрицательную инкапсулированную бактерию, колонизирующую верхние дыхательные пути приблизительно 10% человеческой популяции. Существуют конъюгатные вакцины против серогрупп A, C, W135 и Y, но единственной доступной вакциной для защиты от серогруппы B в целом является продукт BEXSERO™, утвержденный в 2013 г. Этот продукт содержит четыре основных иммуногенных компонента: белок, связывающийся с фактором H, "fHbp"; гепарин-связывающий белок, NHBA; нейссериальный адгезии A, NadA; и везикулы наружной мембраны (OMV).

Краткое изложение сущности изобретения

Один аспект изобретения представляет собой иммуногенную композицию, содержащую слитый полипептид, содержащий все три из менингококковых v1 (вариант 1), v2 (вариант 2) и v3 (вариант 3) fHbp в комбинации с одним или более чем одним из (1) полипептида NHBA, (2) полипептида NadA и/или (3) менингококковых везикул наружной мембраны.

Другой аспект изобретения представляет собой иммуногенную композицию, содержащую менингококковые везикулы наружной мембраны в комбинации с одним или более чем одним из (1) полипептида NHBA, (2) полипептида NadA и/или (3) слитого полипептида, содержащего все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp; где везикулы наружной мембраны (OMV) присутствуют в концентрации 5-30 мкг/мл. Конкретно, слитый полипептид, содержащий все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp, представляет собой стабилизированный и/или несвязывающийся слитый полипептид fHbp. Конкретнее, v1 fHbp содержит мутацию в положении R41, например мутацию R41S. Еще конкретнее, полипептиды v2 и v3 fHbp содержат одну или более чем одну стабилизирующую мутацию и/или мутацию, препятствующую связыванию с фактором H (fH), в следующих положениях, пронумерованных в соответствии с полноразмерными последовательностями (SEQ ID NO: 2 и 3), а также в соответствии с ΔG-последовательностями (SEQ ID NO: 8 и 9)

		Стабилизирующие		Препятствующие связыванию с fH
v2	SEQ ID NO:2	Ser-58	Leu-149	Glu-266
	SEQ ID NO:8	Ser-32	Leu-123	Glu-240
v3	SEQ ID NO:3	Ser-63	Leu-157	Glu-274
	SEQ ID NO:9	Ser-32	Leu-126	Glu-243

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой иммуногенную композицию, содержащую слитый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность формулы

$$NH_2\text{-A-[-X-L]}_3\text{-B-COOH},$$

где каждый X представляет собой последовательность конкретного варианта fHbp, L представляет собой возможную линкерную аминокислотную последовательность, A представляет собой возможную N-концевую аминокислотную последовательность и B представляет собой возможную C-концевую аминокислотную последовательность.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ защиты млекопитающего, такого как человек, от менингококковой инфекции, включающий введение иммуногенной композиции по изобретению.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана RCD (обратная функция распределения) - кривая с долей по оси y (от 0,0 до 1,0) и SBA (сывороточный бактерицидный анализ) - титром по оси x (от 0 до 256 с шагом 16). Верхняя кривая соответствует группе C; группой, достигающей 0,0 раньше всех, является группа S;

на фиг. 2 представлена схема стабилизирующих мутаций и мутаций, препятствующих связыванию с фактором H (fH), вводимых в полипептиды v1, v2 и v3 fHbp с получением слитых белков 731 S и 731 SNB;

на фиг. 3(a)-(g) показано, что композиции, содержащие слитый полипептид 741-231 (SEQ ID NO: 10) и 1/4OMV, обеспечивают более высокие GMT (средние геометрические титры), чем BEXSERO™, против семи включенных в анализ штаммов (3a-v2, 3b-v2, 3c-v3, 3d-v3, 3e-v2, 3f-v2, 3g-v3).

Подробное описание изобретения

Для усиления продукта BEXSERO™ было бы предпочтительным дополнительно расширить спектр действия BEXSERO™ против различных менингококковых штаммов (в случае потенциальных сдвигов и мутаций по мере все более широкого применения вакцины), а также снизить частоту редких случаев лихорадки, иногда наблюдаемых при введении вакцины совместно с обычными вакцинами для детей [1]. С этими целями авторы изобретения модифицировали BEXSERO™ двумя способами: (1) включив совокупность аллелей или вариантов fHbp для обеспечения более широкого покрытия разнообразия, известного для данного белка; и (2) уменьшив количество OMV-компонента в каждой дозе. Как показано здесь, эти две модификации действительно приводят к улучшению вакцины.

Таким образом, в первом воплощении согласно изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая слитый полипептид, содержащий все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp в комбинации с одним или более чем одним из (1) полипептида NHBA, (2) полипептида NadA и/или (3) менингококковых везикул наружной мембраны.

Кроме того, во втором воплощении согласно изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая менингококковые везикулы наружной мембраны в комбинации с одним или более чем одним из (1) полипептида NHBA, (2) полипептида NadA и/или (3) слитого полипептида, содержащего все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp, где везикулы наружной мембраны присутствуют в концентрации 5-30 мкг/мл.

Сходным образом, объединяя оба эти воплощения, согласно изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая (1) слитый полипептид, содержащий все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp, (2) полипептид NHBA, (3) полипептид NadA и (4) менингококковые везикулы наружной мембраны в концентрации 5-30 мкг/мл.

Белок, связывающийся с фактором H (fHbp).

Композиция по изобретению может содержать иммуногенный полипептид fHbp. Продукт BEXSERO™ содержит полипептид fHbp, также известный как "741" (SEQ ID NO: 2536 в ссылке 2; SEQ ID NO: 1 в данной заявке), "NMB1870", "GNA1870" [3-5], "P2086", "LP2086" или "ORF2086" [6-8]. 3D-структура данного белка известна [9, 10], и белок имеет две β-бочки, соединенные коротким линкером. Во многих публикациях сообщено о защитной эффективности этого белка в менингококковых вакцинах, например, см. ссылки 11-15. Этот белок экспрессирован в липидированной форме у многих штаммов во всех серогруппах. Последовательности fHbp сгруппированы в три варианта [3] (обозначенные здесь v1, v2 и v3), и обнаружено, что обычно сыворотка, полученная против одного варианта, является бактерицидной против штаммов, экспрессирующих этот вариант, но неактивна против штаммов, экспрессирующих один из двух других вариантов, т.е. присутствует внутривариантная перекрестная защита, но не межвариантная перекрестная защита (за исключением перекрестной реактивности некоторых v2 и v3).

Для повышения межвариантной перекрестной реактивности последовательность fHbp была конструирована таким образом, чтобы содержать специфичные элементы всех трех вариантов [16]. Тем не менее, вместо применения этого способа в изобретении использован слитый полипептид, содержащий все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp.

v1 fHbp.

Полноразмерный v1 fHbp штамма MC58 имеет следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 1):

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKL
AAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQ
DSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIE
HLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHI
GLAAKQ.

У зрелого липопротеина нет первых 19 аминокислот SEQ ID NO: 1 (подчеркнуты, их удаление приводит к получению SEQ ID NO: 4, начиная с Cys-20). Продукт BEXSERO™ содержит "ΔG"-форму v1 fHbp, в которой полноразмерная последовательность усечена до остатка 26 (т.е. с удалением полиглицинового участка, и начинается вместо этого с Val-27) с получением SEQ ID NO: 7.

Менингококковый v1 fHbp, используемый в изобретении, будет содержать аминокислотную последовательность, (1) по меньшей мере на i% идентичную SEQ ID NO: 7, и/или (2) содержащую фрагмент SEQ ID NO: 7.

Значение i может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или более. Предпочтительно, оно составляет 90 (т.е. аминокислотная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7) и более предпочтительно 95.

Длина фрагмента (2) будет обычно составлять по меньшей мере 7 аминокислот, например 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 24, 26, 28, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 7. Фрагмент будет обычно содержать по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO: 7. Идентификация и картирование эпитопов fHbp описаны в литературе [12, 17-21]. Обычно полипептид будет содержать по меньшей мере 30 расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 7, и аминокислотная последовательность v1 fHbp будет обычно содержать несколько (например 2, 3, 4, 5 или более) фрагментов SEQ ID NO: 7.

В целом, аминокислотная последовательность может быть по меньшей мере на i% идентична SEQ ID NO: 7 и содержать несколько ее фрагментов.

Последовательность v1 fHbp обычно содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, не присутствующую в SEQ ID NO: 2, и/или по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, не присутствующую в SEQ ID NO: 3.

Полипептид, используемый в изобретении и содержащий последовательность v1, способен, после введения подходящему млекопитающему-хозяину (такому как мышь или человек), приводить к выработке антител, способных распознавать менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ

ID NO: 4. Эти антитела будут включать некоторые антитела, не распознающие полипептиды v2 или v3 (например, не будут распознавать менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 5, и менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 6), хотя они могут также включать некоторые антитела, перекрестно взаимодействующие с полипептидами v2 и/или v3. В идеальном случае, эти антитела являются бактерицидными для менингококкового штамма, экспрессирующего v1 fHbp, например для штамма MC58 (см. ниже).

v2 fHbp.

Полноразмерный v2 fHbp штамма 2996 имеет следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 2):

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKL
AAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKIN
NPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEH
LKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIG
IAGKQ.

У зрелого липопротеина нет первых 19 аминокислот SEQ ID NO: 2 (подчеркнуты, их удаление приводит к получению SEQ ID NO: 5), и у ΔG-формы SEQ ID NO: 2 нет первых 26 аминокислот (SEQ ID NO: 8).

Менингококковый v2 fHbp, используемый в изобретении, будет содержать аминокислотную последовательность, (1) по меньшей мере на j% идентичную SEQ ID NO: 8, и/или (2) содержащую фрагмент SEQ ID NO: 8.

Значение y может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или более. Предпочтительно, оно составляет 90 (т.е. аминокислотная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 8) и более предпочтительно 95.

Длина фрагмента по (2) будет обычно составлять по меньшей мере 7 аминокислот, например 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 24, 26, 28, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 8. Фрагмент будет обычно содержать по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO: 8. Идентификация и картирование эпитопов fHbp описаны в литературе (см. выше). Обычно полипептид будет содержать по меньшей мере 30 расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 8, и аминокислотная последовательность v2 fHbp будет обычно содержать несколько (например 2, 3, 4, 5 или более) фрагментов SEQ ID NO: 8.

В целом, аминокислотная последовательность v2 fHbp может быть по меньшей мере на j% идентична SEQ ID NO: 8 и содержать несколько ее фрагментов.

Последовательность v2 fHbp обычно содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, не присутствующую в SEQ ID NO: 1, и/или по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, не присутствующую в SEQ ID NO: 3.

Полипептид, используемый в изобретении и содержащий последовательность v2, способен, после введения подходящему млекопитающему-хозяину (такому как мышь или человек), приводить к выработке антител, способных распознавать менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 5. Эти антитела будут включать некоторые антитела, не распознающие полипептиды v1 или v3 (например, не будут распознавать менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 4, и менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 6), хотя они могут также включать некоторые антитела, перекрестно взаимодействующие с полипептидами v1 и/или v3. В идеальном случае, эти антитела являются бактерицидными для менингококкового штамма, экспрессирующего v2 fHbp, например для штамма M2091 (см. ниже).

v3 fHbp.

Полноразмерный v3 fHbp штамма M1239 имеет следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 3)

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSI
PQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHS
AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDF
TKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSAT
VKIGEKVHEIGIAGKQ.

У зрелого липопротеина нет первых 19 аминокислот SEQ ID NO: 3 (подчеркнуты, их удаление приводит к получению SEQ ID NO: 6), и у ΔG-формы SEQ ID NO: 3 нет первой 31 аминокислоты (SEQ ID NO: 9).

Менингококковый v3 fHbp, используемый в изобретении, будет содержать аминокислотную последовательность, (1) по меньшей мере на k% идентичную SEQ ID NO: 9, и/или (2) содержащую фрагмент SEQ ID NO: 9.

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или более. Предпочтительно, оно составляет 90 (т.е. аминокислотная последовательность по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 9) и более предпочтительно 95.

Длина фрагмента (2) будет обычно составлять по меньшей мере 7 аминокислот, например 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 24, 26, 28, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 9. Фрагмент будет обычно содержать по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO: 9. Идентификация и картирование эпитопов fHbp описаны в литературе (см. выше). Обычно полипептид будет содержать по меньшей мере 30 расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 9, и аминокислотная последовательность v3 fHbp будет обычно содержать несколько (например 2, 3, 4, 5 или более) фрагментов SEQ ID NO: 9.

В целом, аминокислотная последовательность v3 fHbp может быть по меньшей мере на k% идентична SEQ ID NO: 9 и содержать несколько ее фрагментов.

Последовательность v3 fHbp обычно содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, не присутствующую в SEQ ID NO: 1, и/или по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, не присутствующую в SEQ ID NO: 2.

Полипептид, используемый в изобретении и содержащий последовательность v3, способен, после введения подходящему млекопитающему-хозяину (такому как мышь или человек), приводить к выработке антител, способных распознавать менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 6. Эти антитела будут включать некоторые антитела, не распознающие полипептиды v1 или v2 (например, не будут распознавать менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 4, и менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 5), хотя они могут также включать некоторые антитела, перекрестно взаимодействующие с полипептидами v1 и/или v2. В идеальном случае, эти антитела являются бактерицидными для менингококкового штамма, экспрессирующего v3 fHbp, например для штамма M01-240355 (см. ниже).

Слитый полипептид.

В изобретении использован слитый полипептид, содержащий все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp. В результате слитый полипептид может содержать по меньшей мере один эпитоп от каждой из SEQ ID NO: 7, 8 и 9 и после введения млекопитающему-хозяину способен приводить к выработке антител, способных распознавать все три из (1) менингококкового полипептида дикого типа, состоящего из SEQ ID NO: 4, (2) менингококкового полипептида дикого типа, состоящего из SEQ ID NO: 5, и (3) менингококкового полипептида дикого типа, состоящего из SEQ ID NO: 6. В идеальном случае, эти антитела являются бактерицидными для менингококкового штамма, экспрессирующего v1 fHbp, менингококкового штамма, экспрессирующего v2 fHbp, а также менингококкового штамма, экспрессирующего v3 fHbp (например, для каждого из штаммов MC58, M2091 и M01-240355).

Относительно определений, данных выше, там, где это применимо, для слитого полипептида предпочтительно, чтобы i=j=k.

В целом, слитый полипептид fHbp по изобретению имеет аминокислотную последовательность формулы

$$NH_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_3\text{-B-COOH},$$

где каждый X представляет собой последовательность конкретного варианта fHbp, L представляет собой возможную линкерную аминокислотную последовательность, A представляет собой возможную N-концевую аминокислотную последовательность и B представляет собой возможную C-концевую аминокислотную последовательность.

Три группировки X представляют собой последовательности v1, v2 и v3, как обсуждено выше. Они могут присутствовать в любом порядке от N- к C-концу, т.е. v1-v2-v3, v1-v3-v2, v2-v1-v3, v2-v3-v1, v3-v1-v2 или v3-v2-v1. Наиболее предпочтительным порядком является v2-v3-v1.

В каждом случае [-X-L-] линкерная аминокислотная последовательность -L- может присутствовать или отсутствовать. Линкерная(ые) последовательность(и) -L- будет(ут) обычно короткой(ими) (например, 20 аминокислот или менее, т.е. 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают короткие пептидные последовательности, облегчающие клонирование, полиглициновые линкеры (т.е. Gly_n, где n составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) и гистидиновые метки (т.е. His_n, где n составляет 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более). Другие подходящие линкерные аминокислотные последовательности будут очевидны специалистам в данной области. Одним полезным линкером является GSGGGG (SEQ ID NO: 22) с дипептидом Gly-Ser, образующимся из сайта рестрикции BamHI, что способствует клонированию и манипуляциям. Другим полезным линкером является SEQ ID NO: 23, которой может возможно предшествовать дипептид Gly-Ser (SEQ ID NO: 24, из BamHI) или дипептид Gly-Lys (SEQ ID NO: 25, из HindIII).

-A- представляет собой возможную N-концевую аминокислотную последовательность. Она будет обычно короткой (например, 40 аминокислот или менее, т.е. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают лидерные последовательности для управления транспортом белков. Если в X_1 нет своего собственного N-концевого метионина, -A- может обеспечивать такой метиониновый остаток в транслируемом полипептиде (например, -A- представляет собой одиночный остаток Met). Met может быть расположен на N-конце линкерной последовательности, такой как SEQ ID NO: 23 (т.е. SEQ ID NO: 26), или на N-конце короткой последовательности (например, SEQ ID NO: 27).

-B- представляет собой возможную С-концевую аминокислотную последовательность. Она будет обычно короткой (например, 40 аминокислот или менее, т.е. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают последовательности для управления транспортом белков, короткие пептидные последовательности, облегчающие клонирование или очистку (например, содержащие гистидиновые метки, т.е. His_n, где n составляет 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более), или последовательности, повышающие стабильность полипептида. Другие подходящие С-концевые аминокислотные последовательности будут очевидны специалистам в данной области. Одной подходящей группировкой -B- является SEQ ID NO: 28, в которой Leu-Glu выше гистидиновой метки имеет происхождение из сайта рестрикции XhoI.

Один слитый полипептид, подходящий для использования в изобретении, содержит SEQ ID NO: 10. В соответствии с приведенной выше формулой в SEQ ID NO: 10 -A- представляет собой SEQ ID NO: 26, X_1 представляет собой последовательность v2 fHbp (SEQ ID NO: 8), $-L_1-$ представляет собой SEQ ID NO: 24, X_2 представляет собой последовательность v3 fHbp (SEQ ID NO: 9), $-L_2-$ представляет собой SEQ ID NO: 22, X_3 представляет собой последовательность v1 fHbp (SEQ ID NO: 7) и L_3 и B отсутствуют. Три последовательности fHbp в SEQ ID NO: 10 подчеркнуты ниже:

MGPDSDRLQQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDS
LNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF
LVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAE
LKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGPDSDRL
QQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGK
LKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGL
GGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADE

KSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAG
LADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGR
ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQ
AEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ.

Более предпочтительный слитый полипептид для использования в изобретении содержит SEQ ID NO: 29. В соответствии с приведенной выше формулой в SEQ ID NO: 29 -A- представляет собой SEQ ID NO: 26, X_1 представляет собой последовательность v2 fHbp (SEQ ID NO: 8), $-L_1-$представляет собой SEQ ID NO: 22, X_2 представляет собой последовательность v3 fHbp (SEQ ID NO: 9), $-L_2-$ представляет собой SEQ ID NO: 22, X_3 представляет собой последовательность v1 fHbp (SEQ ID NO: 7) и L_3 и B отсутствуют. Три последовательности fHbp в SEQ ID NO: 29 подчеркнуты ниже:

MGPDSDRLQQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDS
LNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF
LVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAE
LKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAA
DIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKIS
RFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAF
NQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTA
PLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLI
TLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTA
FGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYS
LGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ.

Таким образом, в идеальном случае в изобретении использован полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 29, но в изобретении может также быть использован полипептид, содержащий SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 29, но модифицированный с использованием до 10 одиночных аминокислотных изменений (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 отдельных аминокислотных замен, делеций и/или вставок), при условии, что полипептид способен приводить к выработке антител, способных распознавать все три из менингококковых полипептидов дикого типа SEQ ID NO: 4-6, как обсуждено выше. Кроме того, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 29 могут быть модифицированы с изменением их группировки -A- (например, с использованием альтернативы SEQ ID NO: 26); таким образом, полипептид, используемый в изобретении, может содержать SEQ ID NO: 30, возможно модифицированную с использованием до 10 одиночных аминокислотных изменений (как обсуждено выше).

Например, SEQ ID NO: 30 может быть модифицирована для введения точечных мутаций, снижающих способность каждого fHbp взаимодействовать с fH. Например, возможны мутации SEQ ID NO: 30 по остаткам E240, E496 и R543 с получением посредством этого SEQ ID NO: 31 (содержащей мутации E240X, E496X и R543X, где X представляет собой любую аминокислоту, отличающуюся от указанной аминокислоты, т.е. E240X относится к любой аминокислоте, отличной от E, в положении остатка 240).

Предпочтительным воплощением SEQ ID NO: 31 является SEQ ID NO: 32 (содержащая мутации E240A, E496A, R543S). В изобретении может быть использована SEQ ID NO: 31 (например, SEQ ID NO: 32), возможно модифицированная с использованием до 5 одиночных аминокислотных изменений (как обсуждено выше), при условии, что остатки E240, E496 и R543 не присутствуют.

Кроме того, SEQ ID NO: 30 может быть модифицирована для введения точечных мутаций, повышающих стабильность fHbp. Например, возможны мутации SEQ ID NO: 30 по остаткам S32, L123, S285 и L379 с получением посредством этого SEQ ID NO: 33 (содержащей мутации S32X, L123X, S285X и L379X). Предпочтительным воплощением SEQ ID NO: 33 является SEQ ID NO: 34 (содержащая мутации S32V, L123R, S285V, L379R). В изобретении может быть использована SEQ ID NO: 33 (например, SEQ ID NO: 34), возможно модифицированная с использованием до 5 одиночных аминокислотных изменений (как обсуждено выше), при условии, что остатки S32, L123, S285 и L379 не присутствуют. Одним таким полипептидом является SEQ ID NO: 35, в которой последовательность v1 модифицирована для включения мутации, указанной в ссылке 22, например мутации "R41S" (SEQ ID NO: 36). SEQ ID NO: 35 содержит мутации S32X, L123X, S285X, L379X и R543X и SEQ ID NO: 36 содержит мутации S32V, L123R, S285V, L379R и R543S. Нумерация в названии "R41S" соответствует зрелому полипептиду v1 (SEQ ID NO: 4), таким образом, например, эта мутация присутствует в слитом полипептиде SEQ ID NO: 35 как R543X и в SEQ ID NO: 36 как R543S.

Эти различные подходы можно комбинировать; таким образом, в изобретении может быть использован полипептид, содержащий SEQ ID NO: 37 (например, полипептид имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38). SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 содержат мутации S32V, L123R, E240A, S285V, L379R, E496A и R543S. SEQ ID NO: 38 дополнительно содержит SEQ ID NO: 26 на N-конце.

В другом воплощении в изобретении может быть использована SEQ ID NO: 39 (содержащая мутации L123X и L379X), например SEQ ID NO: 40 (содержащая мутации L123R и L379R). Сходным образом, в изобретении может быть использована SEQ ID NO: 39 (например, SEQ ID NO: 40), возможно модифицированная с использованием до 5 одиночных аминокислотных изменений (как обсуждено выше), при условии, что остатки L123 и L379 не присутствуют (например, см. SEQ ID NO: 34, отличающуюся от SEQ ID NO: 40 включением двух замен S/V, как указано выше). Одним таким полипептидом является SEQ ID NO: 41, в которой последовательность v1 модифицирована для включения мутации "R41S", и, таким образом, содержит L123R, L379R и R543S. В других воплощениях, когда такие слитые белки присутствуют в композициях по изобретению, OMV могут присутствовать в концентрациях от 2,5 мкг/мл до 12,5 мкг/мл.

Аминокислотные остатки, отмеченные для мутаций выше, указаны относительно конкретных начальных последовательностей. Соответствующие аминокислотные остатки в любой другой последовательности fHbp могут быть легко определены посредством выравнивания последовательностей, например, такой остаток представляет собой аминокислоту, которая, при выравнивании с применением алгоритма попарного выравнивания (например, алгоритма Needleman-Wunsch для выравнивания по всей длине, как подробно описано ниже), соответствует аминокислоте, указанной здесь. Часто аминокислота будет такой же, но выравнивание позволит легко определить, если это будет не так.

В естественных условиях у N.meningitidis fHbp является липопротеином. Также было обнаружено, что он липидирован при экспрессии в E.coli с его нативной лидерной последовательностью или с гетерологичными лидерными последовательностями. Полипептиды по изобретению могут иметь N-концевой цистеиновый остаток, который может быть липидирован, например содержать пальмитоиловую группу, обычно с образованием трипальмитоил-S-глицерилцистеина. Тем не менее, в обычных воплощениях слитый полипептид по изобретению не липидирован (обычно ввиду того, что N-концевая группировка -A- не приводит к липидированию) у хозяина, используемого для экспрессии.

Нейссериальный гепарин-связывающий антиген (NHBA).

Композиция по изобретению может содержать иммуногенный полипептид NHBA. Антиген NHBA был включен в опубликованную последовательность генома менингококкового штамма серогруппы B MC58 [23] как ген NMB2132 (регистрационный номер в GenBank GL7227388; SEQ ID NO: 11 здесь). После этого были опубликованы последовательности антигена NHBA многих штаммов. Например, аллельные формы NHBA показаны на фиг. 5 и 15 ссылки 24 и в Примере 13 и на фиг. 21 ссылки 2 (SEQ ID NO: 3179-3184 в ссылке 2). Было также сообщено о различных иммуногенных фрагментах антигена NHBA, содержащих "ΔG"-фрагмент SEQ ID NO: 12. Предпочтительные антигены NHBA для использования в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) на 60% или более идентичную (например, на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) SEQ ID NO: 12; и/или (б) содержащую фрагмент из по меньшей мере "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 12, где "n" представляет собой 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп SEQ ID NO: 12.

Наиболее полезные антигены NHBA по изобретению способны приводить к выработке антител, которые, после введения подходящему млекопитающему-хозяину (такому как мышь или человек), способны связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 13. Предпочтительные антигены NHBA для использования в изобретении способны приводить к выработке бактерицидных противоменингококковых антител после введения субъекту-млекопитающему.

Особенно предпочтительный полипептид NHBA для использования в изобретении содержит SEQ ID NO: 12, возможно модифицированную с использованием до 3 одиночных аминокислотных изменений (т.е. 1, 2 или 3 одиночных аминокислотных замен, делеций и/или вставок), при условии, что полипептид способен приводить к выработке антител, способных связываться с SEQ ID NO: 13, как обсуждено выше.

Как и в случае продукта BEXSERO™, полипептид NHBA может полезным образом быть представлен в форме слитого полипептида, например слитым с полипептидом NMB1030. Предпочтительно, в таких слитых полипептидах NMB1030 расположен ниже NHBA. NMB1030 штамма MC58 имеет регистрационный номер в GenBank GL7226269 (SEQ ID NO: 14 здесь). Последовательность NMB1030 для использования в изобретении может содержать аминокислотную последовательность: (а) на 60% или более идентичную (например, на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) SEQ ID NO: 14; и/или (б) содержащую фрагмент из по меньшей мере "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 14, где "n" представляет собой 30 или более. Одним полезным фрагментом NMB1030 является SEQ ID NO: 15.

Один такой слитый полипептид NHBA-NMB1030 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. Таким образом, в изобретении может быть использована SEQ ID NO: 16, возможно модифицированная с использованием до 3 одиночных аминокислотных изменений (т.е. 1, 2 или 3 одиночных аминокислотных замен, делеций и/или вставок), при условии, что полипептид способен приводить к выработке антител, способных связываться с SEQ ID NO: 13, как обсуждено выше.

Нейссериальный адгезин А (NadA).

Композиция по изобретению может содержать иммуногенный полипептид NadA. Антиген NadA был включен в опубликованную последовательность генома менингококкового штамма серогруппы B MC58 [23] как ген NMB1994 (регистрационный номер в GenBank GL7227256; SEQ ID NO: 17 здесь). После этого были опубликованы последовательности антигена NadA многих штаммов, и активность белка в качестве адгезина нейссерий была хорошо задокументирована. Было также сообщено о различных иммуногенных фрагментах NadA. Предпочтительные антигены NadA для использования в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) на 60% или более идентичную (например, на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) SEQ ID NO: 17; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 17, где "n" представляет собой 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп SEQ ID NO: 17.

Наиболее полезные антигены NadA по изобретению способны приводить к выработке антител, которые после введения млекопитающему-хозяину способны связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18. Предпочтительные антигены NadA для использования в изобретении способны приводить к выработке бактерицидных противоменингококковых антител после введения млекопитающему-хозяину.

Особенно предпочтительный полипептид NadA для использования в изобретении имеет SEQ ID NO: 19, возможно модифицированную с использованием до 3 одиночных аминокислотных изменений (т.е. 1, 2 или 3 одиночных аминокислотных замен, делеций и/или вставок), при условии, что полипептид способен приводить к выработке антител, способных связываться с SEQ ID NO: 18, как обсуждено выше.

Менингококковые везикулы наружной мембраны (OMV).

Композиции по изобретению содержат менингококковые OMV, т.е. любые протеолипосомные везикулы, полученные посредством разрыва наружной мембраны менингококков или образования пузырьков из нее с формированием из нее везикул, сохраняющих белковые компоненты наружной мембраны (например, PorA, PorB, RmpM, Opa, Opc, Omp85, FetA/FrpB, NspA и так далее), имеющих диаметр в диапазоне 50-200 нм. Таким образом, термин может включать OMV (иногда называемые "пузырьками"), а также везикулы, называемые микровезикулами (MV [25]) или "нативными OMV" ("NOMV" [26]). См. также ссылки 27-33. Типичные везикулы наружной мембраны получают из бактерий искусственно, и они могут быть получены с применением обработки детергентами (например, дезоксихолатом) или при помощи недерегентных средств (например, см. ссылку 37). Методики получения OMV включают обработку бактерий детергентом на основе солей желчных кислот (например, солей литохолевой кислоты, хенодезоксихолевой кислоты, урсодезоксихолевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, холевой кислоты, урсохолевой кислоты и так далее, при этом для обработки нейссерий предпочтителен дезоксихолат натрия [34 и 35]) при pH, достаточно высоком для отсутствия осаждения детергента [36]. Другие методики могут быть осуществлены практически в отсутствие детергентов [37, 38] с применением таких методов, как обработка ультразвуком, гомогенизация, микрофлуидизация, кавитация, осмотический шок, измельчение, френч-пресс, перемешивание и так далее. Методы без использования детергентов или с использованием небольшого количества детергентов позволяют сохранять полезные антигены, такие как NspA и fHbp [37]. Таким образом, OMV, используемые в изобретении, могут быть получены с использованием буфера для экстрагирования OMV, имеющего приблизительно 0,5% дезоксихолата или менее, например

приблизительно 0,2%, приблизительно 0,1%, менее 0,05% или даже ноль.

Везикулы, известные как MV и NOMV, представляют собой природные мембранные везикулы, образующиеся спонтанно при росте бактерий и высвобождаемые в культуральную среду. MV могут быть получены посредством культивирования нейссерий в жидкой культуральной среде, отделения целых клеток от менее крупных MV в жидкой культуральной среде (например, посредством фильтрации или центрифугирования на низких скоростях для осаждения только клеток, но не более мелких везикул) с последующим сбором MV из среды без клеток (например, посредством фильтрации, дифференциальной преципитации или агрегации MV, центрифугирования на высоких скоростях для осаждения MV). Штаммы для использования в получении MV могут обычно быть отобраны по количеству MV, образуемых в культуре, например, в ссылках 45 и 46 описаны нейссерий с высоким уровнем образования MV.

Везикулы могут быть получены из бактерий, с которыми были проведены генетические манипуляции [39-42], например для повышения иммуногенности (например, сверхэкспрессия иммуногенов), для снижения токсичности, для ингибирования синтеза капсульных полисахаридов, для понижающей регуляции экспрессии PorA и так далее. Они могут быть получены из штаммов с повышенным образованием пузырьков [43-46]. Могут быть использованы везикулы от бактерий с разными подтипами белков наружной мембраны класса I, например шесть разных подтипов [47, 48] при использовании двух разных генетически конструированных популяций везикул, в каждой из которых представлено по три подтипа, или девять разных подтипов при использовании трех разных генетически конструированных популяций везикул, в каждой из которых представлено по три подтипа, и так далее. Полезные подтипы включают P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1; P1.18-1,3,6. Тем не менее, в целом для настоящего изобретения предпочтительно получение OMV из менингококкового штамма дикого типа.

Везикулы для использования в изобретении могут, таким образом, быть получены из любого менингококкового штамма дикого типа. Везикулы будут обычно получать из штамма серогруппы B, но их возможно получать из серогрупп, отличных от серогруппы B (например, в ссылке 36 раскрыт способ для серогруппы A), таких как A, C, W135 или Y. Штамм может представлять собой штамм любого серотипа (например, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16 и так далее), любого сероподтипа (например, P1.4) и любого иммунотипа (например, L1; L2; L3; L3,7; L3,7,9; L10 и так далее). Менингококки могут представлять собой менингококков любой подходящей линии, включая гипериновазивные и гипервирулентные линии, например любую из следующих семи гипервирулентных линий: подгруппа I; подгруппа III; подгруппа IV-1; комплекс ET-5; комплекс ET-37; кластер A4; линия 3. Наиболее предпочтительно, OMV получают из штамма NZ98/254 или другого штамма с сероподтипом PorA P1.4. Предпочтительно, в изобретении используют те же OMV, что использованы в продуктах BEXSERO™ и MENZB™, полученные из штамма NZ98/254.

Везикулы будут обычно содержать менингококковые LOS (также известные как LPS), но пирогенный эффект LOS в OMV значительно меньше, наблюдают при таком же количестве очищенных LOS, и адсорбция OMV на гидроксиде алюминия дополнительно снижает пирогенность. Уровни LOS выражают в международных единицах (IU) эндотоксина, и они могут быть оценены с помощью LAL-анализа (лизат амебоцитов мечехвоста). Предпочтительно, LOS присутствуют в количестве менее 2000 IU на мкг белка OMV.

При наличии LOS в везикуле она может быть обработана для связывания ее LOS и белковых компонентов ("внутрипузырьковое" конъюгирование [49]).

Полезный способ очистки OMV описан в ссылке 50 и включает ультрафильтрацию неочищенных OMV вместо центрифугирования на высоких скоростях. Способ может включать стадию ультрацентрифугирования по завершении ультрафильтрации. OMV могут также быть очищены с применением двухстадийного способа фильтрации по размеру, описанного в ссылке 51.

После получения OMV они могут быть полезным образом суспендированы в растворе сахарозы.

Комбинации.

Композиция по изобретению может содержать каждое из: (а) слитого полипептида, содержащего все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp, (б) полипептида NHBA, (в) полипептида NadA и (г) OMV.

В таких комбинациях: (а) слитый полипептид fHbp в идеальном случае содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, но возможно модифицированную с использованием до 10 одиночных аминокислотных изменений, как обсуждено выше; (б) полипептид NHBA в идеальном случае содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, но возможно модифицированную с использованием до 3 одиночных аминокислотных изменений, как обсуждено выше; и (в) полипептид NadA в идеальном случае содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, но возможно модифицированную с использованием до 3 одиночных аминокислотных изменений, как обсуждено выше.

Более предпочтительно: (а) слитый полипептид fHbp имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; (б) полипептид NHBA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и (в) полипептид NadA имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

Еще более предпочтительно: (а) слитый полипептид fHbp имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; (б) полипептид NHBA имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

и (в) полипептид NadA имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

Полипептиды в композициях по изобретению могут присутствовать в любой концентрации, приводящей к эффективному иммунологическому ответу у хозяина. Эти дозы могут быть определены с помощью обычных тестов, особенно с учетом ориентиров, обеспеченных продуктом BEXSERO™, имеющим полипептиды fHbp, NHBA и NadA, каждый из которых присутствует в количестве 100 мкг/мл. Таким образом, каждый из полипептидов fHbp, NHBA и/или NadA может присутствовать в композиции по изобретению в концентрации от 20 до 400 мкг/мл, например 50-150, 80-120 мкг/мл или приблизительно 100 мкг/мл. Концентрации антигенов легко оценивают количественно с помощью стандартных анализов определения белков.

Сходным образом, OMV в композициях по изобретению могут присутствовать в любой концентрации, приводящей к эффективному иммунологическому ответу у хозяина. Эти дозы могут быть определены с помощью обычных тестов, особенно с учетом ориентиров, обеспеченных продуктом BEXSERO™, в котором OMV присутствуют в количестве 50 мкг/мл. Таким образом, согласно первому воплощению изобретения, OMV могут присутствовать в композиции в концентрации от 20 до 100 мкг/мл, например 30-75, 40-60 мкг/мл или, в идеальном случае, приблизительно 50 мкг/мл. Тем не менее, во втором воплощении изобретения OMV присутствуют в более низкой концентрации, конкретно от 5 до 30 мкг/мл, например от 10 до 15 мкг/мл или, в идеальном случае, приблизительно 12,5 мкг/мл. В определенных воплощениях OMV присутствуют в более низких концентрациях от 2,5 до 12,5, например 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 и 10 мкг/мл.

Количества и концентрации OMV в композициях по изобретению определены таким же образом, как в продукте BEXSERO™, а именно по общему содержанию белка в них. Его можно оценить с применением различных анализов, например, в ссылке 29 раскрыто применение анализа Фолина-Лоури. Общее содержание белка можно анализировать в соответствии с Европейской фармакопеей (European Pharmacopoeia, Ph. Eur), анализ 2.5.33, с применением любого из семи фармакопейных методов. В методе 2 представлен тест Лоури, являющийся предпочтительным. Таким образом, композиция по второму воплощению изобретения содержит OMV при общем содержании белка 5-30 мкг/мл.

Полипептиды.

Полипептиды по изобретению могут быть получены различными способами, например химическим синтезом (по меньшей мере, частично), расщеплением более длинных полипептидов с использованием протеаз, трансляцией с РНК, очисткой из клеточной культуры (например, в результате рекомбинантной экспрессии или из культуры N. meningitidis) и т.д. Предпочтительным способом экспрессии является гетерологичная экспрессия в хозяине E.coli.

В идеальном случае, длина полипептидов по изобретению составляет по меньшей мере 100 аминокислот, например 150, 175, 200, 225 аминокислот или более. Например, длина слитого полипептида fHbp будет обычно составлять по меньшей мере 500 аминокислот, длина полипептида NHBA будет обычно составлять по меньшей мере 400 аминокислот, и длина полипептида NadA будет обычно составлять по меньшей мере 250 аминокислот.

Полипептиды предпочтительно получают, по существу, в чистой или, по существу, выделенной форме (т.е., по существу, свободными от других полипептидов нейссерий или клеток-хозяев). В целом, полипептиды представлены в среде, не встречающейся в природе, например, они выделены из той среды, в которой они встречаются в природе. В определенных воплощениях полипептид присутствует в композиции, имеющей повышенное содержание этого полипептида по сравнению с исходным материалом. Таким образом, предложен очищенный полипептид, где "очищенный" означает, что полипептид присутствует в композиции, которая по существу свободна от других экспрессированных полипептидов, где "по существу, свободна" означает, что более 50% (например, 75% или более, 80% или более, 90% или более, 95% или более или 99% или более) всех полипептидов в композиции представлено полипептидом по изобретению.

Полипептиды могут принимать разные формы (например, нативные, слитые, негликозилированные, липидированные полипептиды, полипептиды с дисульфидными связями и так далее).

Такие последовательности, как SEQ ID NO: 19, не содержат N-концевой метионин. При получении полипептида по изобретению посредством трансляции в биологическом хозяине необходим инициирующий кодон, который у большинства хозяев будет приводить к N-концевому метионину. Таким образом, полипептид по изобретению будет, по меньшей мере, на стадии роста цепи содержать метиониновый остаток выше указанной SEQ ID NO: последовательности.

В некоторых воплощениях полипептид в композиции по изобретению может содержать N-концевую последовательность выше (по необходимости) последовательности полипептида fHbp, NHBA или NadA. В некоторых воплощениях полипептид имеет одиночный метионин на N-конце, за которым сразу следует аминокислотная последовательность соответствующего иммуногена; в других воплощениях может быть использована более длинная последовательность, находящаяся выше по течению. Такая последовательность, находящаяся выше по течению, может быть короткой (например, 40 аминокислот или менее, т.е. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14,

13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают лидерные последовательности для управления транспортом белков или короткие пептидные последовательности, облегчающие клонирование или очистку (например, гистидиновые метки, т.е. His_n, где n составляет 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более).

Полипептид по изобретению может также содержать аминокислоты ниже последней аминокислоты аминокислотной последовательности fHbp, NHBA или NadA (по необходимости). Такие С-концевые удлинения могут быть короткими (например, 40 аминокислот или менее, т.е. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают последовательности для управления транспортом белков, короткие пептидные последовательности, облегчающие клонирование или очистку (например, содержащие гистидиновую метку, т.е. His_n, где n составляет 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более), или последовательности, повышающие стабильность полипептида. Другие подходящие С-концевые аминокислотные последовательности будут очевидны специалистам в данной области.

Термин "полипептид" относится к аминокислотным полимерам любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться неаминокислотными компонентами. Термин также включает аминокислотный полимер, модифицированный естественным или искусственным образом; например образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или любой другой манипуляцией или модификацией, такой как конъюгирование с компонентом, содержащим метку. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или более чем один аналог аминокислот (включая, например, искусственные аминокислоты и так далее), а также другие модификации, известные в данной области. Полипептиды могут иметь форму отдельных цепей или связанных цепей.

Предпочтительно, полипептиды по изобретению экспрессируют рекомбинантно в гетерологичном хозяине (например, E.coli), затем очищают и затем комбинируют и включают в композицию вместе с OMV с получением композиции по изобретению.

В некоторых воплощениях полипептид содержит аминокислотную последовательность, как описано выше, за исключением того, что до 10 аминокислот (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) на N-конце и/или до 10 аминокислот (т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) на С-конце удалены.

Бактерицидные ответы.

Как указано выше, предпочтительные полипептиды и композиции по изобретению способны вызывать гуморальные иммунные ответы, которые являются бактерицидными для менингококков. Бактерицидные гуморальные иммунные ответы обычно измеряют после иммунизации у мышей, и они являются стандартным индикатором эффективности вакцин (см., например, примечание 14 в ссылке 52, а также ссылку 53). Таким образом, антитела будут бактерицидными для анализируемого штамма в подходящем сывороточном бактерицидном анализе (SBA).

Предпочтительно, слитый полипептид fHbp способен вызывать гуморальный иммунный ответ, который является бактерицидным для менингококкового штамма, экспрессирующего v1 fHbp, менингококкового штамма, экспрессирующего v2 fHbp, а также менингококкового штамма, экспрессирующего v3 fHbp. Подходящим v1-штаммом для SBA-анализа является MC58, который широко доступен (например, ATCC BAA-335) и был штаммом, секвенирование которого описано в ссылке 23. Подходящим штаммом v2 для SBA-анализа является M2091 (ATCC 13091). Подходящим штаммом v3 для SBA-анализа является M01-240355, представляющий собой референсный штамм MLST (мультилокусное типирование последовательности) Neisseria (идентификатор 19265 в ссылке 54), который был полностью секвенирован (см. EMBL ID CP002422 [55]).

Таким образом, предпочтительные слитые полипептиды fHbp способны приводить к выработке у мыши антител, которые являются бактерицидными для каждого из штаммов MC58, M2091 и M01-240355 в сывороточном бактерицидном анализе. Например, композиция по изобретению способна обеспечивать сывороточный бактерицидный титр 1:4 или более при применении анализа Гольдшнайдера (Goldschneider) с человеческим комплементом [56-58] и/или сывороточный бактерицидный титр 1:128 или более при использовании комплемента крольчонка.

Иммунизация.

Полипептиды, как обсуждено выше, могут быть использованы в качестве активного(ых) ингредиента(ов) иммуногенных композиций, и, таким образом, согласно изобретению предложена иммуногенная композиция (например, вакцина) по изобретению, содержащая полипептиды, как обсуждено выше.

Согласно изобретению также предложен способ вызывания гуморального иммунного ответа у млекопитающего, такого как мышь или человек, включающий введение млекопитающему иммуногенной композиции по изобретению. Предпочтительно, гуморальный иммунный ответ представляет собой защитный и/или бактерицидный гуморальный иммунный ответ. Согласно изобретению также предложены композиции по изобретению для использования в таких способах.

Согласно изобретению также предложен способ защиты млекопитающего, такого как мышь или человек, от инфекции, вызываемой нейссериями (например, менингококковой), включающий введение млекопитающему иммуногенной композиции по изобретению.

Согласно изобретению предложены композиции по изобретению для использования в качестве ле-

карственных средств (например, в качестве иммуногенных композиций или в качестве вакцин). В одном воплощении согласно изобретению также предложено применение слитого полипептида, содержащего все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp и одно или более чем одно из (1) полипептида NHBA, (2) полипептида NadA и/или (3) менингококковых везикул наружной мембраны, в изготовлении лекарственного средства для предотвращения инфекции, вызываемой нейссериями (например, менингококковой) у млекопитающего. В другом воплощении согласно изобретению предложено применение менингококковых везикул наружной мембраны и одного или более чем одного из (1) полипептида NHBA, (2) полипептида NadA и/или (3) слитого полипептида, содержащего все три из менингококковых v1, v2 и v3 fHbp, в изготовлении лекарственного средства для предотвращения инфекции, вызываемой нейссериями (например, менингококковой инфекции) у млекопитающего, где концентрация везикул наружной мембраны в лекарственном средстве составляет 5-30 мкг/мл.

Предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека. Человек может представлять собой взрослого или, предпочтительно, ребенка. Там, где вакцина предназначена для профилактического применения, человек предпочтительно представляет собой ребенка (например, ребенка младшего возраста или младенца); там, где вакцина предназначена для терапевтического применения, человек предпочтительно представляет собой взрослого. Вакцину, предназначенную для детей, можно также вводить взрослым, например для оценки безопасности, дозы, иммуногенности и так далее.

Предложенные применения и способы особенно полезны для предотвращения/лечения заболеваний, включая, без ограничения, менингит (в частности бактериальный, такой как менингококковый менингит) и бактериемию. Например, они подходят для активной иммунизации индивидов против инвазивной менингококковой инфекции, вызываемой N.meningitidis (например, серогруппы B).

Эффективность терапевтического лечения можно оценивать посредством мониторинга инфекции, вызываемой нейссериями, после введения композиции по изобретению. Эффективность профилактического лечения можно оценивать посредством мониторинга иммунных ответов против fHbp, NHBA, NadA и PorA (по необходимости) после введения композиции.

Иммуногенность композиций по изобретению может быть определена посредством введения их испытуемым субъектам (например, детям в возрасте 12-16 месяцев, или в моделях на животных) с последующим определением стандартных параметров, включая сывороточные бактерицидные антитела (SBA) и титры ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) (GMT (средние геометрические титры)). Эти иммунные ответы будут обычно определять приблизительно через 4 недели после введения композиции и сравнивать их со значениями, определенными до введения композиции. Предпочтительно повышение SBA по меньшей мере в 4 раза или в 8 раз. Там, где вводят более одной дозы композиции, возможно проведение более чем одного определения после введения.

Предпочтительные композиции по изобретению могут обеспечивать у пациента титр антител, превосходящий критерий серологической защиты для каждого антигенного компонента, у приемлемого процента субъектов-людей. Антигены с ассоциированными титрами антител, превышение которых у хозяина указывает на сероконверсию против рассматриваемого антигена, хорошо известны, и такие титры опубликованы такими организациями, как WHO (Всемирная организация здравоохранения). Предпочтительно, сероконверсия происходит более чем у 80% статистически значимой выборки субъектов, более предпочтительно у более чем 90%, еще более предпочтительно у более чем 93% и наиболее предпочтительно у 96-100%.

Изобретение может быть применено для обеспечения системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек.

Композиции по изобретению будут обычно вводить непосредственно пациенту. Прямая доставка может быть осуществлена посредством парентеральной инъекции (например, подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно или в интерстициальное пространство ткани) или ректального, перорального, вагинального, местного, трансдермального, интраназального, глазного, ушного, легочного или другого введения через слизистые оболочки. Предпочтительно внутримышечное введение в бедро или верхнюю часть плеча. Инъекция может представлять собой инъекцию через иглу (например, иглу для подкожных инъекций), но, альтернативно, может быть применена безыгольная инъекция. Типичная доза для внутримышечного введения составляет приблизительно 0,5 мл (например, как у продукта BEXSERO™).

Схема введения может представлять собой однодозовую схему или многодозовую схему. Несколько доз может быть использовано в схеме первичной иммунизации и/или в схеме повторной иммунизации. За схемой первичного введения может следовать схема повторного дозирования. Подходящий интервал между первичными дозами (например, 4-16 недель) и между первичными и повторными дозами может быть определен рутинным образом. Например, продукт BEXSERO™ вводят в форме двух или трех доз, вводимых с интервалом не менее 1 месяца или не менее 2 месяцев друг от друга в зависимости от субъекта (например, дети или другие).

Иммуногенная композиция по изобретению будет обычно содержать фармацевтически приемлемый носитель, который может представлять собой любое вещество, само по себе не индуцирующее выработ-

ку антител, вредных для пациента, получающего композицию, и которое может быть введено без чрезмерной токсичности. Фармацевтически приемлемые носители могут включать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. В таких наполнителях могут также присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты или эмульгаторы, pH-забуферивающие вещества и тому подобное. Подробное обсуждение подходящих носителей представлено в ссылке 59. Например, продукт BEXSERO™ содержит хлорид натрия, гистидин, сахарозу, гидроксид алюминия и воду для инъекций.

Инфекции, вызываемые нейссериями, поражают различные области тела, и поэтому композиции по изобретению могут быть изготовлены в различных формах. Например, композиции могут быть изготовлены в формах для инъекций в виде жидких растворов или суспензий. Также могут быть изготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких наполнителях перед инъекцией. Наиболее предпочтительны композиции, подходящие для парентеральной инъекции (например, в мышцу).

Предпочтительно, композиция является стерильной. Предпочтительно, она свободна от пирогенов. Предпочтительно, она забуферена, например, при pH от 6 до 8, обычно при pH приблизительно 7. Там, где композиция содержит соль гидроксид алюминия, предпочтительно использовать гистидиновый буфер [60]. Композиции по изобретению могут быть изотоническими для людей.

Иммуногенные композиции содержат иммунологически эффективное количество иммуногена, а также, по необходимости, любые другие из других указанных компонентов. Под "иммунологически эффективным количеством" понимают, что введение этого количества индивиду, в одной дозе или в качестве части серии, эффективно для лечения или предотвращения. Это количество варьирует в зависимости от здоровья и физического состояния подлежащего лечению индивида, возраста, таксономической группы подлежащего лечению индивида (например, примат, не являющийся человеком, примат и так далее), способности иммунной системы индивида синтезировать антитела, желаемой степени защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других имеющих значение факторов. Ожидают, что это количество будет входить в относительно широкий диапазон, который может быть определен путем рутинных исследований. Дозирование лечения может представлять собой однодозовую схему или многодозовую схему (например, включая повторные дозы). Композиция может быть введена в сочетании с другими иммунорегуляторными агентами.

Адъюванты, которые могут быть использованы в композициях по изобретению, включают, без ограничения, нерастворимые соли металлов, эмульсии типа "масло в воде" (например, MF59 или AS03, оба содержат сквален), сапонины, нетоксичные производные LPS (липополисахариды) (такие как монофосфориллипид A или 3-O-деацилированный MPL (монофосфориллипид)), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, детоксифицированные бактериальные ADP (аденозиндифосфат)рибозилирующие токсины, микрочастицы, липосомы, имидазохинолины или их смеси. Другие вещества, действующие как иммуностимулирующие агенты, раскрыты в главе 7 ссылки 61.

Особенно предпочтительно использование адъюванта гидроксида алюминия и/или фосфата алюминия, и полипептиды обычно адсорбированы на этих солях. Эти соли включают оксигидроксиды и гидроксифосфаты (например, см. главы 8 и 9 ссылки 45). Соли могут иметь любую подходящую форму (например, гелевую, кристаллическую, аморфную и так далее). Al^{+++} должен присутствовать в количестве 1 мг на дозу или более.

Наиболее предпочтительным адъювантом является гидроксид алюминия, используемый в продукте BEXSERO™. Полипептиды и OMV в композиции по изобретению могут быть адсорбированы на этом адъюванте, как в продукте BEXSERO™. Гидроксид алюминия может быть включен в количестве приблизительно 1 мг Al^{++} на мл (т.е. 0,5 мг на дозу объемом 0,5 мл).

Другие антигенные компоненты.

В дополнение к fHbp, NHBA, NadA и/или OMV композиция по изобретению может содержать другие менингококковые полипептидные иммуногены. Например, она может содержать одно или более чем одно из NspA, App, NhhA, HmbR и так далее.

Композиция по изобретению может также содержать антиген "936". Антиген 936 был включен в опубликованную последовательность генома менингококкового штамма серогруппы B MC58 [23] как ген NMB2091 (SEQ ID NO: 20 здесь). Предпочтительные антигены 936 для использования в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) на 50% или более идентичную (например, на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) SEQ ID NO: 21; и/или (б) содержащую фрагмент из по меньшей мере "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO: 21, где "n" представляет собой 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп SEQ ID NO: 21. Наиболее полезные антигены 936 по изобретению способны приводить к выработке антител, которые после введения млекопитающему-хозяину способны связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20. Антиген 936 является хорошим партнером по слиянию для fHbp (например, см. ссылки 62 и 63).

В дополнение к менингококковым полипептидным антигенам композиция может содержать антигены для иммунизации против других заболеваний или инфекций. Например, композиция может содержать один или более чем один из следующих дополнительных антигенов:

сахаридный антиген из N.meningitidis серогруппы A, C, W135 и/или Y, такой как сахарид серогруппы C, раскрытый в ссылке 64 (см. также ссылку 65) или в ссылке 66;

сахаридный антиген из Streptococcus pneumoniae [например, 67, 68, 69];

антиген из вируса гепатита A, такой как инактивированный вирус [например, 70, 71];

антиген из вируса гепатита B, такой как поверхностные и/или внутренние антигены [например, 71, 72];

дифтерийный антиген, такой как дифтерийный анатоксин [например, глава 3 ссылки 73], например, мутант CRM_{197} [например, 74];

столбнячный антиген, такой как столбнячный анатоксин (например, глава 4 ссылки 73);

антиген из Bordetella pertussis, такой как коклюшный голотоксин (PT) и филаментный гемагглютинин (FHA) B.pertussis, возможно также в комбинации с пертактином и/или аггллютиногенами 2 и 3 (например, ссылки 75 и 76);

сахаридный антиген из Haemophilus influenzae B [например, 65];

антиген(ы) полиомиелита [например, 77, 78], такой(ие) как IPV;

антигены кори, эпидемического паротита и/или краснухи (например, главы 9, 10 и 11 ссылки 73);

антиген(ы) гриппа (например, глава 19 ссылки 73), такой(ие) как поверхностные белки гемагглютинин и/или нейраминидаза;

антиген из Moraxella catarrhalis [например, 79];

белковый антиген из Streptococcus agalactiae (стрептококк группы B) [например, 80, 81];

сахаридный антиген из Streptococcus agalactiae (стрептококк группы B);

антиген из Streptococcus pyogenes (стрептококк группы A) [например, 81, 82, 83];

антиген из Staphylococcus aureus [например, 84].

Композиция может содержать один или более чем один из этих дополнительных антигенов.

По необходимости, токсичные белковые антигены могут быть детоксифицированы (например, детоксификация коклюшного токсина химическими и/или генетическими способами [76]).

Там, где в композицию включен дифтерийный антиген, предпочтительно также включать столбнячный антиген и коклюшные антигены. Сходным образом, там, где в композицию включен столбнячный антиген, предпочтительно также включать дифтерийные и коклюшные антигены. Сходным образом, там, где в композицию включен коклюшный антиген, предпочтительно также включать дифтерийные и столбнячные антигены. Таким образом, предпочтительны комбинации DTP (дифтерийные, столбнячные, коклюшные антигены).

Предпочтительно, сахаридные антигены имеют форму конъюгатов. Белки-носители для конъюгатов обсуждены более подробно ниже.

Каждый из антигенов композиции будет обычно присутствовать в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл. В целом, концентрация любого заданного антигена будет достаточной для вызывания иммунного ответа против данного антигена.

Иммуногенные композиции по изобретению можно использовать терапевтически (т.е. для лечения существующей инфекции) или профилактически (т.е. для предотвращения инфекции в будущем).

В качестве альтернативы использованию белковых антигенов в иммуногенных композициях по изобретению может быть использована нуклеиновая кислота (которая может представлять собой РНК, такую как самореплицирующаяся РНК, или ДНК, такую как плазмида).

В некоторых воплощениях композиция по изобретению содержит конъюгированные капсульные сахаридные антигены 1, 2, 3 или 4 из менингококковых серогрупп A, C, W135 и Y. В других воплощениях композиция по изобретению содержит по меньшей мере один конъюгированный пневмококковый капсульный сахаридный антиген.

Менингококковые серогруппы Y, W135, C и A.

Существующие вакцины против серогруппы C (MENJUGATE™ [64, 77], MENINGITEC™ и NEISVAC-C™) содержат конъюгированные сахариды. MENJUGATE™ и MENINGITEC™ имеют олигосахаридные антигены, конъюгированные с носителем CRM_{197}, в то время как в NEISVAC-C™ использован полный полисахарид (де-O-ацетилированный), конъюгированный носителем в виде столбнячного анатоксина. Вакцина MENACTRA™ содержит конъюгированные капсульные сахаридные антигены каждой из серогрупп Y, W135, C и A.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать капсульные сахаридные антигены из одной или более чем одной из менингококковых серогрупп Y, W135, C и A, где антигены конъюгированы белком(ами)-носителем(ями) и/или представляют собой олигосахариды. Например, композиция может содержать капсульный сахаридный антиген из: серогруппы C; серогрупп A и C; серогрупп A, C и W135; серогрупп A, C и Y; серогрупп C, W135 и Y; или всех четырех из серогрупп A, C, W135 и Y.

Типичное количество каждого менингококкового сахаридного антигена на одну дозу составляет от

1 мкг до 20 мкг, например приблизительно 1 мкг, приблизительно 2,5 мкг, приблизительно 4 мкг, приблизительно 5 мкг или приблизительно 10 мкг (выраженное в расчете на сахарид).

Там, где смесь содержит капсульные сахариды из обеих серогрупп A и C, соотношение (масс/масс.) сахарид MenA:сахарид MenC может составлять более 1 (например 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 или более). Там, где смесь содержит капсульные сахариды из серогруппы Y и одной или обеих из серогрупп C и W135, соотношение (мас./мас.) сахарид MenY:сахарид MenW135 может составлять более 1 (например, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 или более) и/или соотношение (мас./мас.) сахарид MenY:сахарид MenC может составлять менее 1 (например 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или менее). Предпочтительные соотношения (мас./мас.) сахаридов из серогрупп A:C:W135:Y составляют: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2 и 2:2:2:1. Предпочтительные соотношения (мас./мас.) сахаридов из серогрупп C:W135:Y составляют: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1 и 2:1:1. Предпочтительно использовать по существу равные массы каждого сахарида.

Капсульные сахариды можно использовать в форме олигосахаридов. Их удобно получать посредством фрагментации очищенного капсульного полисахарида (например, гидролизом), после чего обычно проводят очистку фрагментов желаемого размера.

Предпочтительно, фрагментацию полисахаридов проводят до конечной средней степени полимеризации (DP) олигосахарида менее 30 (например, от 10 до 20, предпочтительно приблизительно 10 для серогруппы A; от 15 до 25 для серогрупп W135 и Y, предпочтительно приблизительно 15-20; от 12 до 22 для серогруппы C; и так далее). DP можно удобно посредством ионообменной хроматографии или колориметрических анализов [86].

Если осуществляют гидролиз, то гидролизат, как правило, будет подвергнут сортировке по размеру, чтобы удалить короткие олигосахариды [65]. Это может быть осуществлено разными способами, такими как ультрафильтрация с последующей ионообменной хроматографией. В случае серогруппы A предпочтительно удаляют олигосахариды со степенью полимеризации приблизительно 6 или менее, и в случае серогрупп W135 и Y предпочтительно удаляют олигосахариды со степенью полимеризации приблизительно менее 4.

Предпочтительные сахаридные антигены MenC раскрыты в ссылке 85, как они использованы в MEN JUGATE™.

Ковалентное конъюгирование.

Капсульные сахариды в композициях по изобретению будут обычно конъюгированы с белком(ами)-носителем(ями) В целом, конъюгирование повышает иммуногенность сахаридов, превращая их из T-независимых антигенов в T-зависимые антигены и обеспечивая, таким образом, возможность формирования иммунологической памяти. Конъюгирование особенно полезно для педиатрических вакцин и является хорошо известной методикой.

Типичные белки-носители представляют собой бактериальные токсины, такие как дифтерийные или столбнячные токсины или их анатоксины или мутанты. Полезным вариантом является мутант дифтерийного токсина CRM_{197} [87], используемый в качестве носителя в продукте PREVNAR™. Другие подходящие белки-носители включают комплекс белков наружной мембраны N.meningitidis [88], синтетические пептиды [89, 90], белки теплового шока [91, 92], коклюшные белки [93, 94], цитокины [95], лимфокины [95], гормоны [95], факторы роста [95], искусственные белки, содержащие множество человеческих $CD4^+$ T-клеточных эпитопов из различных антигенов, имеющих происхождение от патогенов [96], такие как N19 [97], белок D из H.influenzae [98-100], пневмолизин [101] или его нетоксичные производные [102], пневмококковый поверхностный белок PspA [103], железосвязывающие белки [104], токсинA или B из C.difficile [105], рекомбинантный экзопротеин A P. aeruginosa (rEPA) [106] и так далее.

Может быть использована любая подходящая реакция конъюгирования, по необходимости с любым подходящим линкером.

Перед конъюгированием сахарид будет обычно активирован или функционализирован. Активация может включать, например, цианилирующие реагенты, такие как CDAP (например, тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния [107, 108 и так далее]). В других подходящих методиках используют карбодиимиды, гидразиды, активные эфиры, норборан, п-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S-NHS (сульфо-N-гидроксисульфосукцинимид), EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид), TSTU (O-(N-сукцинимидил)-1,1,3,3-тетраметилуроний тетрафторборат) и т.д.

Связывание через линкерную группу может быть осуществлено с применением любой известной методики, например методик, описанных в ссылках 109 и 110. Один тип связывания включает восстановительное аминирование полисахарида, сочетание полученной аминогруппы с одним концом линкерной группы на основе адипиновой кислоты с последующим сочетанием белка с другим концом линкерной группы на основе адипиновой кислоты [111, 112]. Другие линкеры включают B-пропионамидо [113], нитрофенилэтиламин [114], галоацилгалогениды [115], гликозидные связи [116], 6-аминокапроновую кислоту [117], ADH [118], группировки C_4-C_{12} [119] и так далее. В качестве альтернативы использованию линкера может быть применено прямое связывание. Прямое связывание с белком может включать окисление полисахарида с последующим восстановительным аминированием с использованием белка, как

описано, например, в ссылках 120 и 121.

Предпочтителен способ, включающий введение аминогрупп в сахарид (например, посредством замены концевых групп =O группами -NH_2) с последующей дериватизацией сложным диэфиром адипиновой кислоты (например, сложным N-гидроксисукцинимидодиэфиром адипиновой кислоты) и взаимодействия с белком-носителем. В другой предпочтительной реакции используют CDAP для активации и белок D в качестве носителя, например для MenA или MenC.

Общие положения.

Термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий", например композиция "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может содержать что-либо дополнительное, например X + Y. Ссылки на "содержащий" (или "содержит" и так далее) могут возможно быть заменены ссылками на "состоящий из" (или "состоит из" и так далее).

Термин "приблизительно" в связи с числовым значением x является дополнительным и означает, например, x±10%.

Термин "по существу" не исключает "полностью", например композиция, "по существу, свободная" от Y может быть полностью свободной от Y. По необходимости, выражение "по существу" в определении по изобретению может быть опущено.

"Идентичность последовательностей" предпочтительно определяют с помощью алгоритма выравнивания Needleman-Wunsch для выравнивания по всей длине [122] с использованием параметров по умолчанию (например, штраф при начале разрыва 10,0 и штраф при продолжении разрыва 0,5 с использованием матрицы замен EBLOSUM62). Этот алгоритм удобным образом воплощен в инструменте needle в пакете программ EMBOSS [123]. Там, где в заявке приведена ссылка на идентичность определенной SEQ ID, идентичность следует рассчитывать по всей длине этой SEQ ID.

После серогруппы классификация менингококков включает серотип, сероподтип и затем иммунотип, и в стандартной номенклатуре указывают серогруппу, серотип, сероподтип и иммунотип, разделяя их двоеточием, например B:4:P1.15:L3,7,9. В серогруппе B некоторые линии вызывают заболевание часто (гиперинвазивные), некоторые линии вызывают более тяжелые формы заболевания, чем другие (гипервирулентные), а другие вообще редко вызывают заболевание. Известно семь гипервирулентных линий, а именно подгруппы I, III и IV-1, комплекс ET-5, комплекс ET-37, кластер A4 и линия 3. Они были определены с помощью мультилокусного ферментативного электрофореза (MLEE), но для классификации менингококков было также применено мультилокусное типирование последовательностей (MLST). Четырьмя основными гипервирулентными кластерами являются комплексы ST32, ST44, ST8 и ST11.

Примеры

Пример 1. Вакцина BEXSERO™ (для сравнения).

Продукт BEXSERO™ безопасен и эффективен и был утвержден для применения у человека в Европе и других регионах. Он содержит следующие иммуногенные ингредиенты в дозе объемом 0,5 мл:

Иммуноген	Количество	Примечания
fHbp	50 мкг	Слитый полипептид с NMB2091 на N-конце
NHBA	50 мкг	Слитый полипептид с NMB1030 на C-конце
NadA	50 мкг	-
OMV	25 мкг (общее содержание белков)	Штамм NZ98/254 (B:4:P1.7-2,4, L1,3)

Эти иммуногены адсорбированы на адъюванте гидроксиде алюминия (0,5 мг Al^{++} на дозу). Композиция также содержит NaCl, гистидиновый буфер и сахарозу.

Пример 2. Стабилизированные и стабилизированные несвязывающиеся слитые полипептиды.

Авторы изобретения изучили два разных типа мутаций в v2 и v3: во-первых, они определили остатки в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, которые могут быть модифицированы для повышения стабильности полипептида. Во-вторых, они определили остатки, уменьшающие связывание с человеческим фактором H (fH). Мутантные полипептиды fHbp, содержащие мутации обоих типов, имеют улучшенные свойства. Особенно предпочтительны мутанты fHbp, не связывающиеся с фактором H, но сохраняющие иммуногенность, поскольку получаемые гуморальные иммунные ответы направлены против эпитопов в сайте связывания fH или рядом с ним. После вакцинации с использованием вакцинных антигенов fHbp дикого типа такие эпитопы могут быть скрыты связыванием с фактором H. Далее приведены аминокислоты, представляющие наибольший интерес, пронумерованные в соответствии с полноразмерными последовательностями (SEQ ID NO: 2 и 3), а также ΔG-последовательностями (SEQ ID NO: 8 и 9).

		Стабильность**		Связывание с fH
v2	SEQ ID NO:2	Ser-58	Leu-149	Glu-266
	SEQ ID NO:8	Ser-32	Leu-123	Glu-240
v3	SEQ ID NO:3	Ser-63	Leu-157	Glu-274
	SEQ ID NO:9	Ser-32	Leu-126	Glu-243

В случаях мутации только одного из этих остатков этим остатком предпочтительно является лейцин.

Мутации, влияющие на стабильность и связывание fHbp, сочетали в мутантных формах v2 и v3 и проводили слияние с мутантной последовательностью v1, содержащей R41S. Слияние мутантов проводили в порядке v2-v3-v1 и соединяли их с использованием линкеров, получая 731 SNB (SEQ ID NO: 38). По сравнению с тремя последовательностями дикого типа этот слитый полипептид содержит в общей сложности 7 точечных мутаций (фиг. 2).

Отдельно, мутации для повышения стабильности v2 и v3 сливали с мутантной последовательностью v1 "R41S" v1 в порядке v2-v3-v1 и соединяли с использованием линкеров, получая 731 S (SEQ ID NO: 40). Таким образом, по сравнению с тремя последовательностями дикого типа этот слитый полипептид содержит в общей сложности 5 точечных мутаций (фиг. 2).

Способность не связывающихся с fH форм fHbp обеспечивать SBA-титры оценивали у трансгенных (Tg) мышей

Антиген	rSBA-титры, полученные против штаммов-прототипов		
	Var 1.1	Var 2.16	Var 3.42
Слитый полипептид fHbp SEQ ID NO:10	1024*	4096	8192
Слитый полипептид fHbp SEQ ID NO:38	16384	32768	более 32768

Эти данные показывают, что несвязывающиеся формы fHbp могут быть более иммуногенными.

Пример 3. Замена слитого полипептида NMB2091-fHbp.

Продукт BEXSERO™ модифицировали, заменяя слитый полипептид NMB2091-fHbp "тройным слитым" полипептидом из вариантов fHbp в порядке v2-v3-v1 от N- к C-концу. Этот слитый полипептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Кроме того, удаляли OMV-компонент. Две вакцины сравнивали у мышей, иммунизированных в 0, 21 и 35 сутки, анализируя сыворотку на 34 и 49 сутки против панели из 15 штаммов серогруппы B с различными клональными комплексами, MLST и ET-классификацией. Антигены вводили в количестве 20 мкг на дозу с использованием адъюванта в количестве 3 мг/мл.

Доли штаммов с SBA-титрами выше различных пороговых значений были следующими:

Пороговое значение	Исходная вакцина	Модифицированная вакцина
больше или равно 128	100%	100%
больше или равно 1024	93%	80%
больше 4096	53%	60%

Таким образом, использование слитого полипептида v2-v3-v1 позволяет обеспечить спектр действия против большей части панели (60% против 53%) при высоком SBA-титре против MenB (больше 4096).

Пример 4. 4-кратное снижение дозы OMV.

Продукт BEXSERO™ модифицировали, заменяя слитый полипептид NMB2091-fHbp "тройным слитым" полипептидом fHbp v2-v3-v1 (SEQ ID NO: 10), а также или (1) снижая дозу OMV в 4 раза до 12,5 мкг/мл, или (2) удаляя OMV-компонент. Таким образом, получали три композиции

Группа	Белковые иммуногены			OMV
M	NMB2091-fHbp	NHBA-NMB1030	NadA	50 мкг/мкл
C	fHbp v2-v3-v1	NHBA-NMB1030	NadA	12,5 мкг/мл
S	fHbp v2-v3-v1	NHBA-NMB1030	NadA	-

Для оценки иммуногенности этих трех вакцин субъекты-люди получали по три дозы с месячными интервалами (0, 1,2 месяцы). Сыворотку получали в 0, 1, 2 и 3 месяцы и затем через 6 месяцев после третьей дозы (месяц 8) для оценки против панели соответствующих штаммов. Титры (GMT) были следующими:

	M	C	S
Штамм H44/76			
Момент времени ноль	1,36	2,16	1,55
1 месяц	30	52	15
2 месяца	97	91	48
3 месяца	102	99	59
8 месяцев	25	33	12
Штамм 5/99			
Момент времени ноль	2,47	3,01	2,17
1 месяц	70	75	56
2 месяца	173	140	157
3 месяца	237	236	365
8 месяцев	77	83	106
Штамм NZ98/254			
Момент времени ноль	1,21	2,04	1,73
1 месяц	9,45	29	3,19
2 месяца	13	12	4,4
3 месяца	16	24	6,49
8 месяцев	3,55	8,02	3,55
Штамм M14459			
Момент времени ноль	1,86	2,48	2,16
2 месяца	30	24	16
3 месяца	34	31	19
Штамм UK364			
Момент времени ноль	1,35	1,97	2,07
2 месяца	37	72	70
3 месяца	56	113	112

Объединенную сыворотку пациентов использовали для оценки спектра действия против панели из 7 MenB-штаммов, экспрессирующих v1 fHbp. Спектр действия адекватным образом включал сходное число штаммов в каждой группе, но титры (GMT) были наиболее высокими в группе C

	M	C	S
Момент времени ноль	меньше 10	меньше 10	меньше 10
3 месяца	70	140	40
8 месяцев	15	50	10

Сыворотку отдельных пациентов анализировали против панели из 6 MenB-штаммов, экспрессирующих v2 или v3 fHbp (один штамм анализировали дважды). Титры (GMT) снова были наиболее высокими в группе C

	M	C	S
Штамм M14549 (v2)			
Момент времени ноль	1,4	1,5	1,1
2 месяца	3,8	15,0	6,2
3 месяца	3,6	21,4	6,6
Штамм M12566 (v2)			
Момент времени ноль	6,0	10,7	14,8
2 месяца	40,4	80,0	60,1
3 месяца	47,1	94,8	69,7
Штамм UK355 (v3)			
Момент времени ноль	2,7	4,0	5,0
2 месяца	22,1	43,7	38,4
3 месяца	21,3	55,0	41,7
Штамм M1239 (v3)			
Момент времени ноль	2,3	3,0	2,1
2 месяца	5,0	15,7	5,9
3 месяца	5,7	21,9	5,9
Штамм M1239 (v3)			
Момент времени ноль	1,2	1,6	1,1
2 месяца	5,9	18,4	2,8
8 месяцев	1,9	4,1	1,6
Штамм UK293 (v2)			
Момент времени ноль	1,6	2,7	2,2
2 месяца	9,2	52,0	7,0
8 месяцев	4,3	11,7	5,9
Штамм UK414 (v2)			
Момент времени ноль	1,4	2,1	1,6
2 месяца	5,1	22,6	8,3
8 месяцев	3,1	10,9	6,3

Кроме того, доля иммунизированных субъектов с SBA-титром выше 1:8 была обычно выше в группе C по сравнению с группами M и S, например 80% или более для штамма M1239 после 3 введений в сравнении с 50% или менее в двух других группах.

RCD-кривые (обратная функция распределения) SBA-титров также показали лучший профиль, например на фиг. 1 показана кривая для сыворотки, полученной на 3 месяц, против штамма UK293, при этом группа C отчетливо превосходит остальные.

Объединенную сыворотку пациентов использовали для оценки спектра действия против панели из 26 MenB-штаммов, экспрессирующих v2 или v3 fHbp. Титры (GMT) снова были наиболее высокими в группе C

	M	C	S
3 месяца	23	91	25
8 месяцев	7	43	9

Таким образом, эти данные показывают, что вакцина "C", в которой иммуноген fHbp заменен и доза OMV снижена в 4 раза, не уступает вакцине BEXSERO™. Действительно, как сыворотки отдельных субъектов, так и объединенные сыворотки демонстрируют лучшие показатели серологического ответа, более высокие GMT и более широкий спектр покрытия штаммов у вакцины "C" по сравнению с вакциной BEXSERO™.

Пример 5. Авидность антител.

Авидность антител от пациентов в группах "C" и "S" сравнивали с использованием системы на основе Gyrolab, которая включает стадию отмывки с использованием хаотропного агента для отсоединения низкоаффинных антител от антигена, получая "индекс авидности" как процент высокоаффинных антител против v1 fHbp от общего количества v1 fHbp-специфичных антител. По двадцать отдельных сывороток анализировали через 1 месяц после первого введения и через 1 месяц после третьего введения. Кроме того, оценивали SBA-титры против штамма H44/76 и определяли корреляцию между индексом авидности и SBA-титрами (log2).

Результаты (R и p при оценке корреляции Пирсона) были следующими:

	1 месяц после 1		1 месяц после 3	
	R	p	R	p
C	0,693	0,001	0,4667	0,0381
S	0,3565	0,1229	0,101	0,6718

Таким образом, значимая корреляция между SBA-титром и индексом авидности была отмечена в группе "C" в обеих временных точках, но не в группе "S". У субъектов, получавших вакцину с 12,5 мкг/мл OMV, индекс авидности коррелирует с SBA-титрами, показывая, что присутствие OMV оказывает положительное влияние на качество индуцируемых антител. В целом, у субъектов, получавших OMV, отмечена тенденция к более высоким бактерицидным титрам, коррелирующим с авидностью антител, индуцируемых вакцинной композицией.

Подпанель из штаммов var2/3 была выбрана для анализа сывороток отдельных субъектов на основании следующих критериев: (1) штаммы не входят в спектр действия Bexsero в предшествующих клинических исследованиях; (2) штаммы принадлежат к значимым клональным комплексам; (3) штаммы экспрессируют эпидемиологически значимые подварианты fHbp; (4) уровень экспрессии fHbp является умеренным; (5) 741-231 специфично уничтожает выбранные штаммы (конкурентный hSBA). Результаты показаны на фиг. 3(a)-3(g) и демонстрируют, что 741-231+1/4OMV+alum обеспечивает более высокие GMT против 7 включенных в анализ штаммов. Таким образом, hSBA-анализ показывает, что композиции, содержащие слитый полипептид 741-231, не уступают Bexsero. Действительно, как анализ сывороток отдельных субъектов, так и анализ объединенных сывороток демонстрируют лучшие показатели серологического ответа, более высокие GMT-титры и более широкий спектр покрытия штаммов у композиции, содержащей 741-231+1/4OMV+alum.

Пример 6. Снижение дозы OMV и использование 731 "S" и 731 "SNB".

Продукт BEXSERO™ модифицировали, заменяя слитый полипептид NMB2091-fHbp "тройными слитыми" стабилизированными или стабилизированными несвязывающимися полипептидами fHbp v2-v3-v1 (SEQ ID NO: 40 и 38, соответственно), а также снижая дозу OMV до 10 или 2,5 мкг/мл

Группа	Белковые иммуногены			OMV
1	NMB2091-fHbp	NHBA-NMB1030	NadA	10 мкг/мл
2	fHbp-v2-v3-v1 SNB	NHBA-NMB1030	NadA	2,5 мкг/мл
3	fHbp-v2-v3-v1 S	NHBA-NMB1030	NadA	2,5 мкг/мл

Для получения мышиных антисывороток использовыали по 20 мкг NadA, NHBA-NMB1030 и NMB2091-fHbp, fHbp 231S или fHbp 231 SNB с 10 мкг или 2,5 мкг OMV, имеющих происхождение из штамма NZ98/254, иммунизируя ими самок мышей CD1 (Charles River) в возрасте 6 недель. Использовали по восемь мышей на группу. Антигены вводили внутрибрюшинно вместе с гидроксидом алюминия (3 мг/мл) в сутки 0, 21 и 35. Сыворотки получали через 2 недели после последнего забора крови и проводили их термоинактивацию в течение 30 мин при 56°C перед анализом.

Сывороточный бактерицидный анализ с использованием сывороток животных и человеческого комплемента.

Бактерицидную активность сыворотки против Nm-штаммов оценивали, как описано ранее. В качестве источника комплемента использовали человеческую сыворотку или плазму здорового взрослого (без собственной бактерицидной активности при анализе в конечной концентрации 25 или 50%). Бактерицидные титры в сыворотке определяли как разведение сыворотки, приводившее к уменьшению числа колониеобразующих единиц (CFU) на мл после 60 мин инкубации бактерий с реакционной смесью на 50% по сравнению с контрольным CFU на мл в момент времени 0.

Наименьшее анализируемое разведение каждой сыворотки составляло 1:16 (предел выявления). Для задач анализа титры ниже предела выявления определяли как половину этого предела и положительное пороговое значение определяли как 4-кратное повышение по сравнению с этим значением (т.е. 32). Объединенные сыворотки, полученные от мышей, иммунизированных композицией Bexsero, были ниже положительного порогового значения для 14 штаммов из 34 штаммов, включенных в анализ, в то время как объединенные сыворотки, полученные при использовании композиции 2-го поколения, были ниже предела выявления только для 1 штамма в случае вакцинной композиции, содержащей fHbp 231SNB, и для 1 штамма в случае композиции, содержащей fHbp 231S.

hSBA-данные, представленные в таблице ниже, продемонстрировали увеличение спектра действия вакцинных композиций, содержащих fHbp 231S или fHbp 231SNB, по сравнению с Bexsero в панели из 34 штаммов, включенных в анализ

MenB-штаммы			hSBA-результаты при использовании различных композиций		
	Идентификатор	Подвариант fHbp	Bexsero	741-231 SNB + 961c + 287-953 + ¼ OMV	741-231 S + 961c + 287-953 + ¼ OMV
Контрольные	NVD000007	2,23	больше 8192	больше 8192	больше 8192
штаммы Bexsero	NVD000005	2,16	2048	4096	2048
	NVD000023	3,31	4096	4096	8192
	NVD002240	2,553	32	512	128
	NVD000025	1,1	больше 8192	больше 8192	больше 8192
	NVD001491	1,180	1024	1024	512
	NVD000049	1,14	4096	4096	2048
MenB-штаммы, несущие var1 fHbp	NVD001706	1,1	4096	4096	4096
	NVD001889	1,4	1024	2048	2048
	NVD001402	1,4	512	1024	1024
	NVD001908	1,13	512	1024	1024
	NVD001244	1,14	2048	2048	2048
	NVD003213	1,15	2048	1024	2048
	NVD001080	1,15	512	512	512
	NVD000185	1,15	512	512	512
	NVD000758	1,256	меньше 16	64	меньше 16
MenB-штаммы, несущие var2 fHbp	NVD002368	2,16	64	1024	512
	NVD002500	2,16	меньше 16	512	512
	NVD000926	2,16	8192	больше 8192	4096
	NVD002552	2,19	16	512	1024
	NVD001277	2,19	меньше 16	1024	2048
	NVD001057	2,19	32	1024	512
	NVD001342	2,19	64	2048	1024
	NVD001391	2,19	меньше 16	512	512
	NVD001288	2,21	меньше 16	512	512
	NVD002690	2,24	меньше 16	256	256
	NVD001287	2,24	16	128	256
MenB-штаммы, несущие var3 fHbp	NVD000038	3,28	меньше 16	64	64
	NVD000084	3,30	меньше 16	1024	2048
	NVD003212	3,31	меньше 16	512	256
	NVD003364	3,42	меньше 16	2048	2048
	NVD002424	3,42	меньше 16	1024	1024
	NVD003727	3,42	меньше 16	меньше 16	меньше 16

Следует понимать, что изобретение описано выше лишь посредством примеров и возможны модификации без выхода за рамки объема и сущности изобретения.

Ссылки

[1] Carter (2013) *BioDrugs* 27:263-74.

[2] WO 99/57280.

[3] Masignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-799.

[4] Welsch *et al.* (2004) *J Immunol* 172:5605-15.

[5] Hou *et al.* (2005) *J Infect Dis* 192(4):580-90.

[6] WO 03/063766.

[7] Fletcher *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100.

[8] Zhu *et al.* (2005) *Infect Immun* 73(10):6838-45.

[9] Cendron *et al.* (2011) *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 67:531-5.

[10] Mascioni *et al.* (2009) *J Biol Chem* 284:8738-46.

[11] Pizza *et al.* (2008) *Vaccine* 26 Suppl 8:I46-8.

[12] Malito *et al.* (2013) *PNAS USA* 110:3304-9.

[13] Marshall *et al.* (2012) *Pediatr Infect Dis J* 31:1061-8.

[14] McNeil *et al.* (2013) *Microbiol Mol Biol Rev* 77:234-52.

[15] Serruto *et al.* (2012) *Vaccine* 30 Suppl 2: B87-97.

[16] Scarselli *et al.* (2011) *Sci Transl Med* 3:91ra62.

[17] Beernink *et al.* (2008) *Infect Immun* 76:4232-40.

[18] Scarselli *et al.* (2009) *J Mol Biol* 386:97-108.

[19] Giuntini *et al.* (2012) *PLoS One* 7:e34272.

[20] Vu *et al.* (2012) *Sci Rep* 2:341.

[21] Faleri *et al.* (2013) *FASEB J* fj.13-239012.

[22] Beernink *et al.* (2011) *J Immunol* 186:3606-14.

[23] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.

[24] WO 00/66741.

[25] WO 02/09643.

[26] Katial *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:702-707.

[27] WO 01/52885.

[28] Европейский патент 0301992.

[29] Frasch *et al.* (2001) глава 7 в *Methods in Molecular Medicine*, volume 66 (‘*Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols’*, eds. Pollard & Maiden).

[30] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.

[31] Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.

[32] WO 02/09746.

[33] Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.

[34] Европейский патент 0011243.

[35] Fredriksen *et al.* (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.

[36] WO 01/91788.

[37] WO 2004/019977.

[38] Патент США 6558677.

[39] WO 01/09350.

[40] Европейский патент 0449958.

[41] EP-A-0996712.

[42] EP-A-0680512.

[43] WO 02/062378.

[44] WO 99/59625.

[45] Патент США 6180111.

[46] WO 01/34642.

[47] Peeters *et al.* (1996) *Vaccine* 14:1008-1015.

[48] Vermont *et al.* (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.

[49] WO 2004/014417.

[50] WO 2005/004908.

[51] WO 2011/036562.

[52] Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820.

[53] WO 2007/028408.

[54] *http://pubmlst.org/ neisseria/*.

[55] Budroni *et al.* (2011) *PNAS USA* 108:4494-99.

[56] Goldschneider *et al.* (1969) *J. Exp. Med.* 129:1307-26.

[57] Santos *et al.* (2001) *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:616-23.

[58] Frasch *et al.* (2009) *Vaccine* 27S:B112-6.

[59] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* 20th edition, ISBN: 0683306472.

[60] WO 03/009869.

[61] *Vaccine Design…* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.

[62] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:10834-9.

[63] WO 2004/032958.

[64] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698.

[65] Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.

[66] WO 03/007985.

[67] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.

[68] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.

[69] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.

[70] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.

[71] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.

[72] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.

[73] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.

[74] Del Guidice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.

[75] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.

[76] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.

[77] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.

[78] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.

[79] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.

[80] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.

[81] WO 02/34771.

[82] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.

[83] Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.

[84] Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; см. также стр. 1218-1219.

[85] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.

[86] Ravenscroft *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.

[87] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002).

[88] EP-A-0372501.
[89] EP-A-0378881.
[90] EP-A-0427347.
[91] WO 93/17712.
[92] WO 94/03208.
[93] WO 98/58668.
[94] EP-A-0471177.
[95] WO 91/01146.
[96] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
[97] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
[98] EP-A-0594610.
[99] Ruan *et al.* (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
[100] WO 00/56360.
[101] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
[102] Michon *et al.* (1998) *Vaccine.* 16:1732-41.
[103] WO 02/091998.
[104] WO 01/72337.
[105] WO 00/61761.
[106] WO 00/33882.
[107] Lees *et al.* (1996) *Vaccine* 14:190-198.
[108] WO 95/08348.
[109] Патент США 4882317.
[110] Патент США 4695624.
[111] Porro *et al.* (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s.
[112] EP-A-0208375.
[113] WO 00/10599.
[114] Gever et al. Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
[115] Патент США 4057685.
[116] Патенты США 4673574; 4761283; 4808700.
[117] Патент США 4459286.
[118] Патент США 4965338.
[119] Патент США 4663160.
[120] Патент США 4761283.
[121] Патент США 4356170.
[122] Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
[123] Rice *et al.* (2000) *Trends Genet* 16:276-277.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1 [MC58, v1]

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKL
AAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQ
DSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIE
HLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHI
GLAAKQ

SEQ ID NO:2 [2996, v2]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKL
AAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKIN
NPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEH
LKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIG
IAGKQ

SEQ ID NO:3 [M1239, v3]

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQN
GTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVV
ALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKK
QGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKI
GEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO:4 [MC58, v1, зрелый]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGK
LKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDI
AGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPD
GKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:5 [2996, зрелый]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGK
LKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGL
GGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADE
KSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO:6 [M1239, зрелый]

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDK
DNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQ
RSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELA
AAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO:7 [MC58, ΔG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSF
DKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVI
SGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:8 [2996 ΔG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO:9 [M1239, ΔG]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKND
KISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEH
TAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHA
VILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO:10 [Слитый полипептид fHbp]

MGPDSDRLQQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDS
LNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF
LVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAE
LKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGPDSDRL
QQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGK
LKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGL
GGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADE
KSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAG
LADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGR
ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQ
AEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:11 [NHBA, MC58]

MFKRSVIAMACIFALSACGGGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQ
GSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDEVAQNDMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNMLAGNMENQATDA
GESSQPANQPDMANAADGMQGDDPSAGGQNAGNTAAQGANQAGNNQAAGSSDPIPASNPAPANGGSN
FGRVDLANGVLIDGPSQNITLTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSDADKISNYKKDGKNDKFV
GLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHS
GNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGAAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFA
AKVDFGSKSVDGIIDSGDDLHMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYR
PTDAEKGGFGVFAGKKEQD

SEQ ID NO:12 [Фрагмент NHBA]

SPDVKSADTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNP
KNEDEVAQNDMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAADGMQGDDP
SAGGQNAGNTAAQGANQAGNNQAAGSSDPIPASNPAPANGGSNFGRVDLANGVLIDGPSQNITLTHC
KGDSCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSDADKISNYKKDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPT
SFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGS
YALRVQGEPAKGEMLAGAAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAAKVDFGSKSVDGIIDSGDDLHMGT
QKFKAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD

SEQ ID NO:13 [NHBA, зрелый]

CGGGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQGSQDMAAVSEENTGNGG
AVTADNPKNEDEVAQNDMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAAD
GMQGDDPSAGGQNAGNTAAQGANQAGNNQAAGSSDPIPASNPAPANGGSNFGRVDLANGVLIDGPSQ
NITLTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSDADKISNYKKDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYII
FYKPKPTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLTYGA
EKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGAAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAAKVDFGSKSVDGIIDSG
DDLHMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKE
QD

SEQ ID NO:14 [NMB1030, MC58]

MKKIIFAALAAAAISTASAATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDI
TIPIANLQSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNGKKLVSVDGNLTMHGKTAPVKLKAE
KFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID NO:15 [Фрагмент NMB1030]

ATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPIANLQSGSQHFTDHLK
SADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNGKKLVSVDGNLTMHGKTAPVKLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDF
STTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID NO:16 [Слитый полипептид NHBA]

MASPDVKSADTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQGGQDMAAVSEENTGNGGAAATD
KPKNEDEGAQNDMPQNAADTDSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMANTADGMQGD
DPSAGGENAGNTAAQGTNQAENNQTAGSQNPASSTNPSATNSGGDFGRTNVGNSVVIDGPSQNITLT
HCKGDSCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSDADKISNYKKDGKNDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIF
YKPKPTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLTYGAE
KLPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPSPSRGRFAAKVDFGSKSVDGIIDSGD
GLHMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGGGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQ
DGSGGGGATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQ
HFTDHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNGKKLVSVDGNLTMHGKTAPVKLKAEKFNCYQSPMAKT
EVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID NO:17 [NadA, MC58]

MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAGETIYDIGEDGT
ITQKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADT
DAALDETTNALNKLGENITTFAEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEA
VKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIATNKADI
AKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFT
ENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVGVNYEW

SEQ ID NO:18 [NadA]

LAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAGETIYDIGEDGTITQKDATAADVEADDFKGLGLKK
VVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENITTFAE
ETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVK
AAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQ
GLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHV
GVNYEW

SEQ ID NO:19 [Фрагмент NadA]

ATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVV
TNLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEET
KTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAA
ETAAGKAEAAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVYTREESDSKFVRIDGL
NATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

SEQ ID NO:20 [NMB2091, MC58]

MKPKPHTVRTLIAAIFSLALSGCVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLRQ
NNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGD
TWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQ
R

SEQ ID NO:21 [NMB2091]

SAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLRQNNQTKGYTPQISVVGYDRHLLLLG
QVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATRARVKI
VTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQR

SEQ ID NO:22 [Линкер]

GSGGGG

SEQ ID NO:23 [Линкер]

GPDSDRLQQRR

SEQ ID NO:24 [Линкер]

GSGPDSDRLQQRR

SEQ ID NO:25 [Линкер]

GKGPDSDRLQQRR

SEQ ID NO:26 [N-концевая последовательность]

MGPDSDRLQQRR

SEQ ID NO:27 [N-концевая последовательность]

MAS

SEQ ID NO:28 [Линкер]

LEHHHHHH

SEQ ID NO:29 [Слитый полипептид fHbp]

MGPDSDRLQQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDS
LNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF
LVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAE
LKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAA
DIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKIS
RFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAF
NQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTA
PLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLI
TLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTA
FGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYS
LGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:30 [Слитый полипептид fHbp]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:31 [Слитый полипептид fHbp, связывание с fH нарушено]

Где X в положении 240 представляет собой любую аминокислоту, кроме E, X в положении 496 представляет собой любую аминокислоту, кроме E, и X в положении 543 представляет собой любую аминокислоту, кроме R.

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHXIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHXIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVXKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:32 [Слитый полипептид fHbp, связывание с fH нарушено]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHAIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHAIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVSKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:33 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный]

Где X в положении 32 представляет собой любую аминокислоту, кроме S, X в положении 123 представляет собой любую аминокислоту, кроме L, X в положении 285 представляет собой любую аминокислоту, кроме S, и X в положении 379 представляет собой любую аминокислоту, кроме L.

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQXVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFXVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDXIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFXVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:34 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:35 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный и R41]

Где X в положении 32 представляет собой любую аминокислоту, кроме S, X в положении 123 представляет собой любую аминокислоту, кроме L, X в положении 285 представляет собой любую аминокислоту, кроме S, X в положении 379 представляет собой любую аминокислоту, кроме L, и X в положении 543 представляет собой любую аминокислоту, кроме R.

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQXVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFXVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDXIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFXVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVXKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:36 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный и R41S]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVSKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:37 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный, связывание с fH нарушено, и R41]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHAIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHAIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVSKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:38 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный, связывание с fH нарушено, и R41]

MGPDSDRLQQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDS
LNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF
RVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAE
LKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHAIGIAGKQGSGGGGVAA
DIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKIS
RFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAF
NQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHAIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTA
PLDHKDKGLQSLTLDQSVSKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLI
TLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTA
FGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYS
LGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:39 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный]

Где X в положении 123 представляет собой любую аминокислоту, кроме L, и X в положении 379 представляет собой любую аминокислоту, кроме L.

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFXVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFXVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:40 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA

PLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO:41 [Слитый полипептид fHbp, стабилизированный, R41S]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAF
NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTA
PLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDG
QTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHG
KAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVSKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTY
TIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция для защиты млекопитающего от менингококковой инфекции, содержащая слитый полипептид, содержащий все три из менингококковых v1 (вариант 1), v2 (вариант 2) и v3 (вариант 3) fHbp в комбинации с (1) полипептидом NHBA (нейссериальный гепарин-связывающий белок), (2) полипептидом NadA (нейссериальный адгезии A) и (3) менингококковыми везикулами наружной мембраны, полученными из штамма NZ98/254, где слитый fHbp полипептид имеет аминокислотную последовательность формулы

$$NH_2\text{-A-[-X-L]}_3\text{-B-COOH},$$

где каждый X представляет собой последовательность конкретного варианта fHbp, L представляет собой возможную линкерную аминокислотную последовательность, A представляет собой возможную N-концевую аминокислотную последовательность и B представляет собой возможную C-концевую аминокислотную последовательность, и где последовательности вариантов fHbp находятся в порядке v2-v3-v1 от N-конца к C-концу, и где последовательность v1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 и v1 способен после введения млекопитающему приводить к выработке антител, способных распознавать менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 4; последовательность v2 fHbp содержит SEQ ID NO: 8, но модифицирована с введением стабилизирующих мутаций по остаткам S32 и L123; и последовательность v3 содержит SEQ ID NO: 9, но модифицирована с введением стабилизирующих мутаций по остаткам S32 и L126.

2. Композиция по п.1, где слитый полипептид содержит по меньшей мере один эпитоп из каждой из SEQ ID NO: 7, 8 и 9 и после введения мыши способен приводить к выработке антител, способных распознавать все три из: (а) полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 4; (б) полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 5; (в) полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 6.

3. Композиция по п.1 или 2, где полипептид NHBA способен приводить к выработке антител, которые после введения мыши способны связываться с полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где полипептид NadA способен приводить к выработке антител, которые после введения мыши способны связываться с полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18.

5. Композиция по любому из пп.1-4, где слитый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37 и 38.

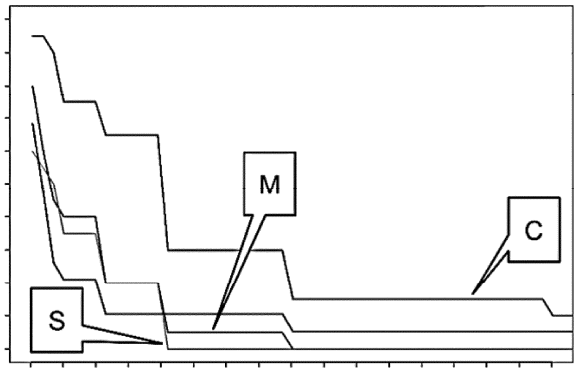
6. Композиция по любому из пп.1-5, где: (а) слитый полипептид fHbp имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38; (б) полипептид NHBA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и (в) полипептид NadA имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где полипептиды fHbp, NHBA и NadA присутствуют в концентрации 50-150 мкг/мл.

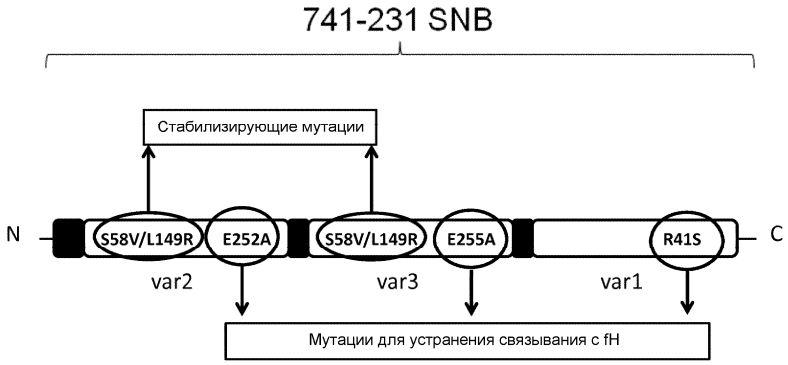
8. Композиция по любому из пп.1-7, дополнительно содержащая адъювант гидроксид алюминия.

9. Способ защиты млекопитающего от менингококковой инфекции, включающий введение млекопитающему иммуногенной композиции по любому из пп.1-8.

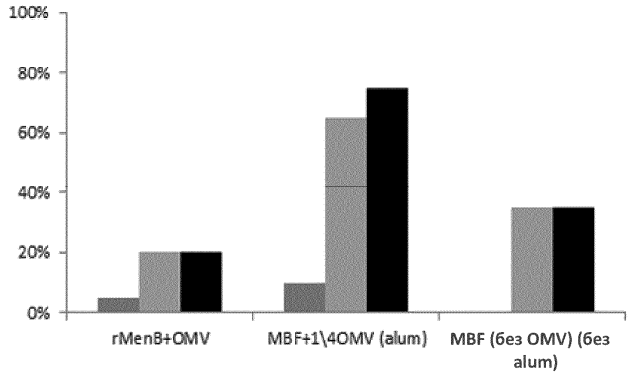
10. Способ по п.9, где указанное млекопитающее представляет собой человека.



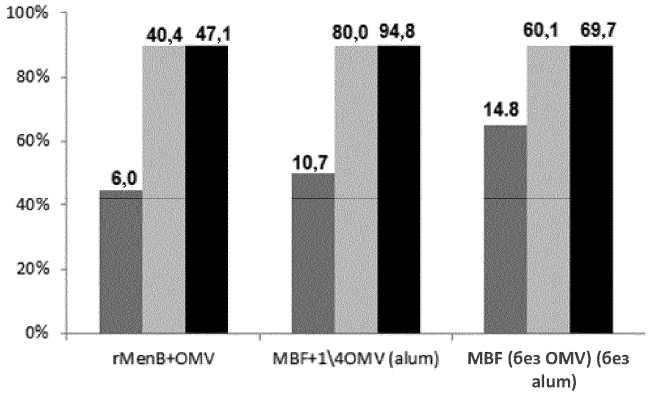
Фиг. 1



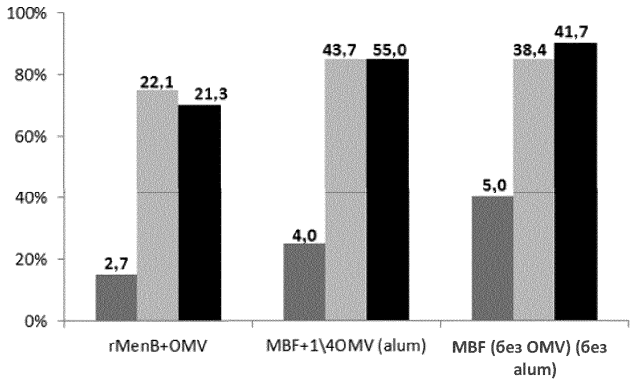
Фиг. 2



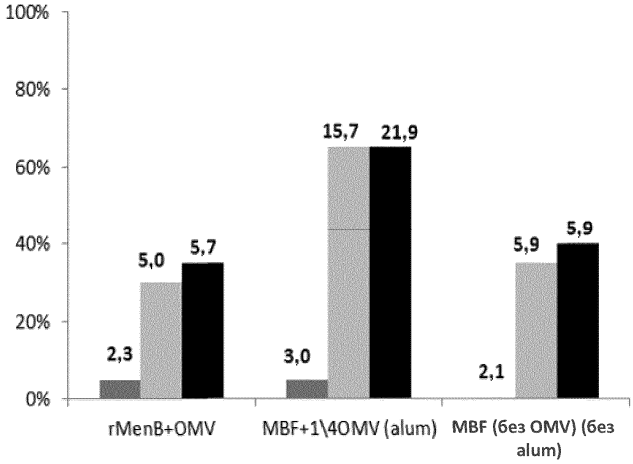
Фиг. 3a



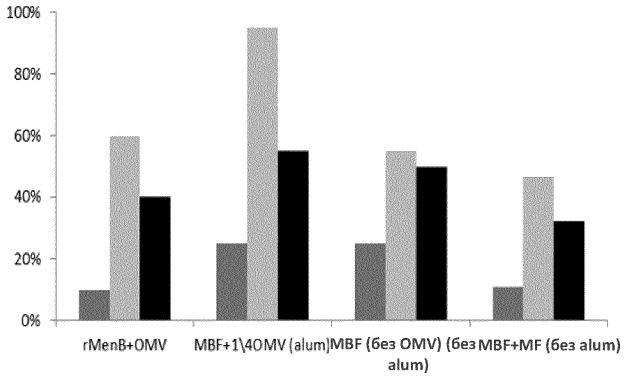
Фиг. 3b



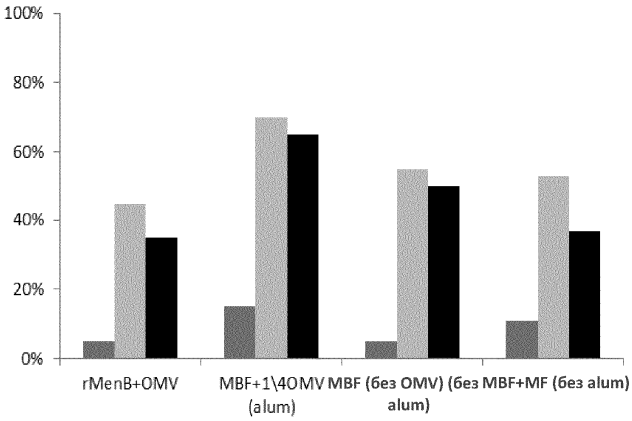
Фиг. 3c



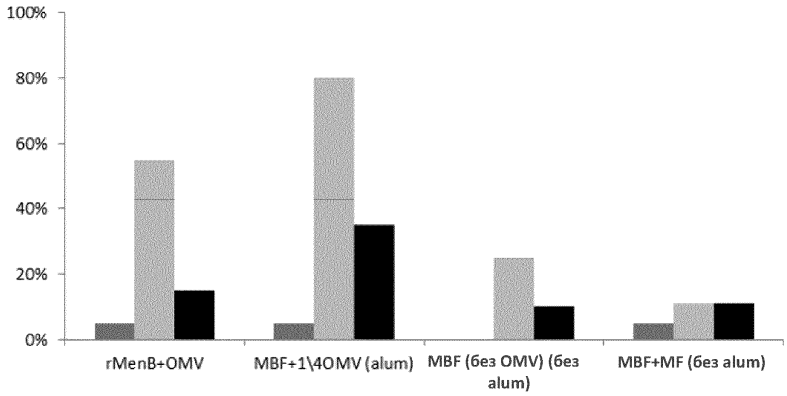
Фиг. 3d



Фиг. 3e



Фиг. 3f


100%
80%
60%
40%
20%
0%
rMenB+OMV
MBF+1\4OMV (alum)
MBF (без OMV) (без alum)
MBF+MF (без alum)

Фиг. 3g