

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290625 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.05

(51) Int. Cl. A61K 39/099 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.30

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) 19200878.7

(32) 2019.10.01

(33) EP

(86) PCT/EP2020/077416

(87) WO 2021/064050 2021.04.08

(71) Заявитель:
ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)

(72) Изобретатель:

Девос Натали Изабель, Сиймонс
Стивен Клемент (BE)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к штаммам бактерий, в частности для применения в области вакцин, в частности, в области профилактики или лечения инфекций, вызванных бактерией рода Bordetella.

A1

202290625

202290625

A1

ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к области вакцин, в частности к профилактике или лечению инфекций, вызванных бактериями рода *Bordetella*, в частности, *Bordetella pertussis*.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Коклюш, вызываемый *Bordetella pertussis*, представляет собой высоко контагиозное заболевание дыхательных путей. Острая инфекция может вызывать тяжелое заболевание, характеризующееся дыхательной недостаточностью, легочной гипертензией, лейкоцитозом и летальным исходом. Коклюш представляет собой заболевание, которое можно предупредить вакцинацией, при этом в мире применяются как бесклеточная (aP), так и цельноклеточная (wP) коклюшные вакцины. Однако, заболевание продолжает существовать в вакцинированных популяциях, и эпидемиологические данные свидетельствуют о росте заболеваемости коклюшем в мире за последние годы.

Было выдвинуто несколько гипотез, включая эволюцию штаммов коклюша и уменьшение продолжительности защиты aP вакцинами по сравнению с wP вакцинами. Одна из областей исследования, нацеленная на контролирование повторного возникновения коклюша, направлена на разработку новых вакцин.

В разработке иммуногенных композиций, таких как вакцины, применяли везикулы, происходящие из патогенов [1]. Применение везикул внешней мембраны (OMV) или их производных может потенциально обеспечить доставку широкого спектра антигенов в их нативной форме.

OMV содержат бактериальный липополисахарид (LPS), состоящий из высоковариабельного O антигена, менее вариабельного центрального олигосахарида и высоко консервативной липидной группы, обозначаемой липидом А. Бактериальные липоолигосахариды (LOS) имеют липид А схожей структуры с идентичным набором функциональных активностей, как и LPS, но у них отсутствуют O-антигенные элементы. В области техники термин «LPS» часто используется для обозначения как LPS, так и

LOS бактериальных сахаридов.

Однако, наличие LPS/LOS в составе OMV может представлять трудности с клинической и регуляторной точек зрения. Например, когда LPS/LOS подвергаются деградации в организме человека, это может вызвать избыточное образование провоспалительных цитокинов. В результате их взаимодействия с человеческим TLR4 они потенциально могут вызвать ряд побочных эффектов (реактогенность), таких как жар, озноб, шок и различных симптомов в зависимости от конкретного организма и состояния пациента.

Эндотоксическая активность LPS/LOS в основном определяется составом его группировки липид А, состоящей из дисахарида глюкозамина, замещенного одной или двумя фосфатными группами и переменным числом ацильных цепей [2].

WO2018/167061 [3] описывает применение вариантов LpxA, происходящих либо из *Pseudomonas aeruginosa* (LpxA_{Pa}), либо от *Neisseria meningitidis* (LpxA_{Nm}) для уменьшения длины ацильной цепи C3' у *Bordetella pertussis*. Экзогенные гены LpxA экспрессировали с плазмиды при нокауте эндогенного гена LpxA в составе генома. Эписомальная экспрессия LpxA_{Pa} оказывала эффект, выражающийся в уменьшении длины некоторых ацильных цепей, и авторы отмечали снижение активации TLR4. Однако, у штаммов наблюдалось существенное нарушение роста. Кроме того, экспрессия LpxA_{Nm} оказывалась летальной. Аналогичные серьезные нарушения роста наблюдались, когда вариант LpxD, происходящий из *Pseudomonas aeruginosa*, экспрессировали эписомально в *B. pertussis*. Хотя результаты подтверждают, что реактогенность можно изменить путем модифицирования липида А, нарушения роста штаммов являются главным препятствием к применению этих штаммов в изготовлении вакцин.

Таким образом, по-прежнему необходимы улучшения, подходящие для изготовления иммуногенных композиций, таких как вакцины.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявитель разработал новые рекомбинантные бактериальные штаммы *Bordetella pertussis*, которые позволяют преодолеть проблемы, известные в уровне техники, и в частности, подходят для получения цельноклеточных антигенов и/или компонентов везикул внешней мембраны. Такие компоненты можно применять в иммуногенных композициях, таких как вакцины.

В первом аспекте изобретение относится к рекомбинантной бактерии *Bordetella*

pertussis. В частности, изобретение относится к рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis*, содержащей по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит мутацию в положении 170 и/или мутацию в положении 229 относительно последовательности SEQ ID NO: 1; и/или по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD.

В указанном первом аспекте изобретение предпочтительно относится к рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis*, содержащей по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит мутацию в положении 170 и/или мутацию в положении 229 относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

Аминокислотная последовательность белка LpxA дикого типа *Bordetella pertussis* (LpxA_{Вре}) представлена как SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность белка LpxA *Bordetella pertussis* (LpxA_{Вре}) представлена как SEQ ID NO: 2.

Изобретение может относиться к рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis*, содержащей по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA происходит из *Bordetella parapertussis* (LpxA_{Вра}).

В этом воплощении изобретение относится к рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis*, содержащей по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

Термин «мутация» в данном изобретении относится к делеции, вставке или замене аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности белка или полипептида по сравнению с аминокислотной последовательностью референтного белка или полипептида, в частности, белка или полипептида дикого типа.

Термин «замена» при упоминании аминокислотной последовательности относится к замене одной аминокислоты на другую аминокислоту или аминокислотную группу. Например, при упоминании LpxA, замена относится к замене аминокислоты относительно SEQ ID NO: 1. Замена аминокислоты в одном конкретном положении в последовательности белка относится к использованию следующей формулировки «(аминокислотный остаток в белке дикого типа)(положение аминокислоты)(аминокислотный остаток в мутированном белке)». Например, G229A относится к замене остатка глицина (G) в положении 229 аминокислотной последовательности референтного белка (в данном документе SEQ ID NO:1) на остаток аланина (A) (в мутанте).

В частности, мутация в положении 170 представляет собой замену относительно SEQ ID NO:1. Еще более конкретно, мутация в положении 170 представляет собой замену глицина. Еще более конкретно, мутация в положении 170 представляет собой замену глицина на серин (G170S).

В частности, мутация в положении 229 представляет собой замену относительно SEQ ID NO:1. Еще более конкретно, мутация в положении 229 представляет собой замену глицина. Еще более конкретно, мутация в положении 229 представляет собой замену глицина на аланин (G229A).

В частности, белок LpxA содержит мутацию в положении 170 и мутацию в положении 229 относительно SEQ ID NO:1. Еще более конкретно, мутация в положении 170 представляет собой замену глицина, и мутация в положении 229 представляет собой замену глицина. Еще более конкретно, мутация в положении 170 представляет собой замену глицина на серин (G170S), и мутация в положении 229 представляет собой замену глицина на аланин (G229A). Еще более конкретно, белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229. В частности, в дополнение к мутациям в положениях 170 и/или 229 белок LpxA идентичен по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях белок LpxA идентичен по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях белок LpxA имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (то есть имеет на 100% идентичную последовательность).

Аминокислотная последовательность белка LpxD белка *Comamonas testosteroni* (LpxD_{Ct}) представлена как SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность белка LpxD *P. aeruginosa* (LpxD_{Pa}) представлена как SEQ ID NO: 4.

В частности, гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, идентичный по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей

мере на 98% или по меньшей мере на 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4. Более конкретно, гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, идентичный по меньшей мере на 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4. Еще более конкретно, гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, идентичный на 100% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3. В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Термин «гетерологичный ген LpxD» относится к гену LpxD или нуклеотидной последовательности от иных биологических видов, нежели биологический вид организма-хозяина, в которого его внедряют, в контексте данного изобретения гетерологичный ген LpxD или нуклеотидная последовательность обычно не обнаруживаются в штаммах *Bordetella pertussis* дикого типа. В некоторых воплощениях состав кодонов нуклеотидной последовательности гетерологичного гена LpxD может быть оптимизирован для экспрессии в *Bordetella pertussis*.

Термин «геномный» относится к геному бактериальной клетки, т.е. хромосомной ДНК, тогда как «геномная вставка» используется для описания стабильной интеграции в геном бактериальной клетки, тем самым исключая транзиторную или эпизомальную экспрессию, такую как экспрессия генов в плазмиде.

В первом аспекте изобретения экспрессия или активность эндогенного гена LpxA рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* модифицирована, снижена, подавлена или инактивирована по сравнению с бактерией *Bordetella pertussis* дикого типа. В некоторых воплощениях изобретения экспрессия или активность эндогенного гена LpxA рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* может быть модифицирована, снижена, подавлена или инактивирована по сравнению с экспрессией или активностью, наблюдающимися у бактерии *Bordetella pertussis* дикого типа. В некоторых воплощениях изобретения экспрессия или активность как эндогенного гена LpxA, так и эндогенного гена LpxD рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* модифицирована, снижена, подавлена или инактивирована по сравнению с бактерией *Bordetella pertussis* дикого типа.

В некоторых воплощениях экспрессия или активность эндогенного гена LpxA снижена, подавлена или инактивирована в результате нокаута эндогенного гена LpxA. В

некоторых воплощениях экспрессия или активность эндогенного гена LpxA модифицирована, снижена, подавлена или инактивирована в результате замены эндогенного гена LpxA, например, посредством «knock-in» мутации. В некоторых воплощениях экспрессия или активность эндогенного гена LpxA модифицирована в результате мутации эндогенного гена LpxA, в частности, в результате мутации в положениях 170 и/или 229. В некоторых воплощениях экспрессия или активность эндогенного гена LpxD снижена, подавлена или инактивирована в результате нокаута эндогенного гена LpxD. В некоторых воплощениях экспрессия или активность эндогенного гена LpxD модифицирована, снижена, подавлена или инактивирована в результате замены эндогенного гена LpxD, например, посредством «knock-in» мутации. В качестве примера, не являющегося исчерпывающим, нокаут можно осуществлять за счет удаления, например, делеции части или всего эндогенного гена или за счет инактивации эндогенного промотора, который активирует экспрессию соответствующего эндогенного гена.

Отсутствие у рекомбинантных бактериальных штаммов *Bordetella pertussis* по изобретению аномалий роста, известных в уровне техники, является неожиданным.

В частности, профиль роста популяции рекомбинантных бактерий *Bordetella pertussis* по изобретению сопоставим с таковым популяции родительского штамма бактерии *Bordetella pertussis* дикого типа. Более конкретно, кривая роста популяции рекомбинантных бактерий *Bordetella pertussis* по изобретению сопоставима с таковой популяции родительского штамма бактерии *Bordetella pertussis* дикого типа. Например, значения истекшего времени и скорости роста при стандартных процессах ферментации популяции рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* и популяции грамтрицательной бактерии дикого типа сопоставимы. Более конкретно, значения истекшего времени и скорости роста популяции рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* и популяции бактерии *Bordetella pertussis* дикого типа отличаются менее чем на 20%, например, менее чем на 15%, менее чем на 10% или менее чем на 5%. Еще более конкретно, значения истекшего времени и скорости роста популяции рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* и популяции бактерии *Bordetella pertussis* дикого типа по существу схожи.

Рекомбинантные бактериальные штаммы *Bordetella pertussis* по данному изобретению экспрессируют липид А, который демонстрирует пониженную эндотоксическую активность по сравнению с эндотоксической активностью липида А,

экспрессируемого бактериальным штаммом *Bordetella pertussis* дикого типа, в частности, при измерении с использованием тестов с активацией TLR4, в частности тестов с активацией человеческого TLR4, например, при индукции через NF-kB рекомбинантной репортерной линии клеток HEK-TLR4. Специалисту в области техники известны другие подходящие тесты.

В частности, рекомбинантные бактериальные штаммы *Bordetella pertussis* по данному изобретению происходят из родительского штамма Toham I, и в частности, штамма Toham I PTg, штамма Toham I, экспрессирующего генетически обезвреженный коклюшный анатоксин. В данном описании термин «родительский штамм» имеет общее значение в области техники и относится к штамму *Bordetella pertussis*, используемому в качестве исходного микроорганизма для конструирования рекомбинантного штамма. Родительский штамм обычно представляет собой штамм дикого типа или штамм сравнения, с которым сравнивают характеристики рекомбинантных штаммов по изобретению. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по изобретению обычно будет изогенной со своим родительским штаммом, за исключением описанной генетической модификации или модификаций по изобретению, описанному здесь.

Во втором аспекте изобретения предложена везикула внешней мембраны (OMV), в частности, популяция везикул внешней мембраны, происходящих из рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* по первому аспекту. Также предложен цельноклеточный антиген, происходящий из рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* по первому аспекту.

В третьем аспекте изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере одну OMV или популяцию OMV по второму аспекту и фармацевтически приемлемый эксципиент. В частности, иммуногенные композиции могут также содержать адъювант. В некоторых воплощениях иммуногенные композиции по изобретению могут содержать по меньшей мере один антиген в дополнение к присутствующим в OMV или популяции OMV. В предпочтительных воплощениях изобретения по меньшей мере один дополнительный антиген, выбран из группы, состоящей из (1) коклюшного анатоксина (PT), (2) FHA (филаментного гемагглютиниона), (3) пертактина (PRN), (4) FIM2/FIM3 (фимбрий типа 2/ фимбрий типа 3), (5) аденилатциклазы, (6) дифтерийного анатоксина (DT), (7) столбнячного анатоксина (TT), (8) инаktivированного вируса полиомиелита (IPV), (9) поверхностного антигена

гепатита В и (10) Hib PRP.

В четвертом аспекте изобретения предложена рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по первому аспекту, по меньшей мере одна OMV или популяция OMV по второму аспекту или иммуногенная композиция по третьему аспекту для применения в индукции иммунного ответа у подходящего млекопитающего.

В частности, предложена рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по первому аспекту, по меньшей мере одна OMV или популяция OMV по второму аспекту или иммуногенная композиция по третьему аспекту для применения в терапии и/или профилактике, например, для применения в качестве вакцины.

В частности, предложен способ индукции иммунного ответа у подходящего млекопитающего, включающий введение подходящему млекопитающему рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* по первому аспекту, по меньшей мере одной OMV или популяции OMV по второму аспекту или иммуногенной композиции по третьему аспекту.

В частности, предложена рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по первому аспекту, по меньшей мере одна OMV или популяция OMV по второму аспекту или иммуногенная композиция по третьему аспекту для применения в изготовлении лекарственного средства, например, для терапии и/или профилактики, например, для применения в качестве вакцины. В одном воплощении предложена рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по первому аспекту, по меньшей мере одна OMV или популяция OMV по второму аспекту или иммуногенная композиция по третьему аспекту для применения в изготовлении лекарственного средства, например, для терапии и/или профилактики заболевания, вызванного *Bordetella pertussis*.

В пятом аспекте изобретения предложен способ модулирования реактогенности липида А бактерии *Bordetella pertussis*, включающий стабильную интеграцию в геном бактерии по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из LpxA и LpxD, где:

(1) ген LpxA кодирует белок LpxA, обладающий по меньшей мере 80%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2, и где белок содержит серин в положении 170 (S170) и/или аланин в положении 229 (A229), при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 1 или 2; и/или

(2) ген LpxD кодирует белок LpxD, обладающий по меньшей мере 90%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно, в пятом аспекте изобретения способ модулирования реактогенности липида А бактерии *Bordetella pertussis* включает стабильную интеграцию в геном бактерии гена LpxA, где ген LpxA кодирует белок LpxA, идентичный по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и где белок содержит серин в положении 170 (S170) и/или аланин в положении 229 (A229), при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 1 или 2.

В одном воплощении способ включает стабильную интеграцию в геном бактерии гена LpxA, происходящего из *Bordetella parapertussis* (LpxA_{Вра}).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А. Структура липида А *Bordetella pertussis*; и **Фиг. 1(В).** Структура липида А *Bordetella parapertussis*, где пунктирная линия показывает варианты структур естественного происхождения, в частности, одну и две вторичные ацильные цепи C16, которые могут присутствовать дополнительно, и минорный вариант, утративший цепь C10.

Фиг. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей LpxA из рода *Bordetella*.

Фиг. 3. Профиль ферментации *B. pertussis* Tomaha I PTg. Кривая 1: pH доводили до 7,2 путем добавления уксусной кислоты (Кривая 3) во избежание защелачивания культуральной среды, способного привести к остановке культивирования; Кривая 2: концентрация растворенного кислорода; Кривая 4: скорость перемешивания регулировали для поддержания концентрации растворенного кислорода (DO) 25% во избежание ограничения кислорода (DO/регулирование скорости); Кривая 5: поддержание температуры 35°C.

Фиг. 4. Профиль ферментации рекомбинантного штамма *B. pertussis* по изобретению, экспрессирующего LpxA из *B. parapertussis* (Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}). Кривая 2: скорость перемешивания регулировали для поддержания концентрации растворенного кислорода (DO) 25% во избежание ограничения кислорода (DO/регулирование скорости); Кривая 3: поддержание температуры 35°C; Кривая 4: pH доводили до 7,2 путем добавления уксусной кислоты (Кривая 1) во избежание защелачивания культуральной среды, способного привести к остановке культивирования; Кривая 5: концентрация растворенного кислорода. Прим: Из-за забивания выпускного фильтра, DO и скорость перемешивания падала до 0 в процессе замены фильтра приблизительно

на 20 мин. Это не повлияло на результаты ферментации.

Фиг. 5. Профиль ферментации в зависимости от скорости перемешивания $\Delta\text{LpxA}_{\text{Вре}}/\text{LpxA}_{\text{Вра}}$ (пунктиром) и родительского штамма, Tohama I PTg (черным).

Фиг. 6(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* of $\Delta\text{LpxA}_{\text{Вре}}/\text{LpxA}_{\text{Вра}}$, экспрессирующего интегрированный в геном $\text{LpxA}_{\text{Вра}}$. **Фиг. 6(В).** Структура LOS, установленная при помощи LC-MS. Сплошными линиями показана структура данного LOS. Пунктирными линиями показаны различия между структурой данного LOS и структурой LOS, обнаруживаемого у штамма *B. pertussis* дикого типа Tohama I.

Фиг. 7(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* с эписомальной экспрессией $\text{LpxA}_{\text{Вра}}$. **Фиг. 7(В).** Минорный вариант структуры LOS, установленный посредством LC-MS (где пунктирные линии иллюстрируют различия между структурой данного LOS и структурой LOS, обнаруживаемого у штамма *B. pertussis* дикого типа Tohama I).

Фиг. 8(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* $\Delta\text{ArnT}/\Delta\text{LpxA}_{\text{Вре}}/\text{LpxA}_{\text{Вра}}$, варианта с двойным нокаутом ArnT и $\text{LpxA}_{\text{Вре}}$, экспрессирующего интегрированный в геном $\text{LpxA}_{\text{Вра}}$. **Фиг. 8(В).** Структура LOS, установленная посредством LC-MS. Сплошными линиями показана структура данного LOS. Пунктирными линиями показаны различия между структурой данного LOS и структурой LOS, обнаруживаемого у штамма *B. pertussis* дикого типа Tohama I.

Фиг. 9(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* $\Delta\text{LpxA}_{\text{Вре}}/\text{LpxA}_{\text{Вра}}/\Delta\text{DNT}/\text{LpxD}_{\text{Pa}}$, варианта с двойным нокаутом $\text{LpxA}_{\text{Вре}}$ и DNT , экспрессирующего интегрированные в геном $\text{LpxA}_{\text{Вра}}$ и LpxD_{Pa} . **Фиг. 9(В).** Структура LOS, установленная посредством LC-MS. Сплошными линиями показана структура данного LOS. Пунктирными линиями показаны различия между структурой данного LOS и структурой LOS, обнаруживаемого у штамма *B. pertussis* дикого типа Tohama I.

Фиг. 10(В). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* $\Delta\text{LpxA}_{\text{Вре}}/\text{LpxA}_{\text{Вра}}/\Delta\text{DNT}/\text{LpxD}_{\text{Pa}}/\Delta\text{LpxD}_{\text{Вре}}$, варианта с тройным нокаутом $\text{LpxA}_{\text{Вре}}$, DNT и $\text{LpxD}_{\text{Вре}}$, экспрессирующего интегрированные в геном $\text{LpxA}_{\text{Вра}}$ и LpxD_{Pa} . **Фиг. 10(В).** Структура LOS, установленная посредством LC-MS. Сплошными линиями показана структура данного LOS. Пунктирными линиями показаны различия между структурой данного LOS и структурой LOS, обнаруживаемого у штамма *B. pertussis* дикого типа Tohama I.

Фиг. 11(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* LpxD_{Pa}, экспрессирующих эписомальный LpxD_{Pa}. **Фиг. 11(В).** Структура LOS, установленная посредством LC-MS. Сплошными линиями показана структура данного LOS. Пунктирными линиями показаны различия между структурой данного LOS и структурой LOS, обнаруживаемого у штамма *B. pertussis* дикого типа Toham I.

Фиг. 12(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* ΔArnT/PagL_{Bbr}, варианта с нокаутом ArnT, экспрессирующего PagL_{Bbr}. **Фиг. 12(В).** Структура LOS, установленная посредством LC-MS. Сплошными линиями показана структура данного LOS. Пунктирными линиями показаны различия между структурой данного LOS и структурой LOS, обнаруживаемого у штамма *B. pertussis* дикого типа Toham I.

Фиг. 13(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* дикого типа Toham I PTg. **Фиг. 13(В).** Структура LOS, установленная посредством LC-MS.

Фиг. 14. Активация *in vitro* сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4. Клетки HEK-TLR4 стимулировали OMV из рекомбинантных штаммов *B. pertussis*, исходя из содержания белка; OMV из штамма *B. pertussis* Toham I PTg (дикий тип, служивший контролем); или вакцинами BEXSERO, QUINVAXEM или INFANRIX HEXA в пересчете на эквивалентную порцию человеческой дозы (контрольные вакцины). Нестимулированные клетки включали в качестве отрицательного контроля (данные не показаны).

Фиг. 15 Активация *in vitro* сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4. Клетки HEK-TLR4 стимулировали OMV из рекомбинантных штаммов *B. pertussis*, исходя из содержания LOS; OMV из штамма *B. pertussis* Toham I PTg (дикий тип, служивший контролем); очищенным LPS из *B. pertussis* Toham I PTg; или обезвреженным очищенным LPS из штамма *Neisseria meningitidis* B ΔMsbB (ΔMsbB). Нестимулированные клетки включали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 16. Активация *in vitro* сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4. Клетки HEK-TLR4 стимулировали OMV из рекомбинантных штаммов *B. pertussis*, исходя из содержания белка; OMV из штамма *B. pertussis* Toham I PTg (дикий тип, служивший контролем) или вакцинами BEXSERO, QUINVAXEM и INFANRIX HEXA. Нестимулированные клетки включали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 17. Активация *in vitro* сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4. Клетки

НЕК-TLR4 стимулировали OMV из рекомбинантных штаммов *B. pertussis*, исходя из содержания LOS; OMV из штамма *B. pertussis* Tohama I PTg (дикий тип, служивший контролем); очищенным LPS из *B. pertussis*; или OMV из обезвреженного штамма *Neisseria meningitidis* B ΔMsbB (ΔMsbB). Стимуляцию нормализовали по содержанию LOS. Нестимулированные клетки включали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 18(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* с эписомальной экспрессией LpxE_{Fn}. **Фиг. 18(В).** Вариант структуры LOS, установленный посредством LC-MS, где вариант структуры имеет удаленный фосфат, (положение указано черной стрелкой).

Фиг. 19(А). Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* с эписомальной экспрессией LpxE_{Rc}. **Фиг. 19(В).** Вариант структуры LOS, установленный посредством LC-MS, где вариант структуры имеет удаленный фосфат, (положение указано черной стрелкой).

Фиг. 20. Структурный анализ LOS посредством LC-MS – OMV из *B. pertussis* с эписомальной экспрессией LpxF_{Fn}. **Фиг. 20(В).** Структура LOS, установленная посредством LC-MS, демонстрирующая отсутствие различного влияния на структуру LOS.

Фиг. 21 Активация *in vitro* сигнального пути TLR4 в клетках НЕК-hTLR4. Клетки НЕК-TLR4 стимулировали OMV из рекомбинантных штаммов *B. pertussis*, экспрессирующих LpxE_{Fn}, исходя из содержания белка. OMV из штамма *B. pertussis* Tohama I PTg (WT PTg) служили положительным контролем, нестимулированные клетки включали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 22. Активация *in vitro* сигнального пути TLR4 в клетках НЕК-hTLR4. Клетки НЕК-TLR4 стимулировали OMV из рекомбинантных штаммов *B. pertussis*, экспрессирующих LpxE_{Fn}, исходя из содержания белка. OMV из штамма *B. pertussis* Tohama I PTg (WT PTg) служили положительным контролем, нестимулированные клетки включали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 23. Индивидуальные титры антител (анти-PRN IgG) и среднее геометрическое с 95% доверительным интервалом определяли при помощи ELISA в исследовании, проводившемся на модели колонизации носоглотки у мышей Balb/c.

Фиг. 24. Индивидуальные значения и средние геометрические значения бактериальной нагрузки при определении по среднему числу колониеобразующих единиц (КОЕ) на носовую полость, показанные по группам и по дням, в исследовании,

проводившемся на модели колонизации носоглотки у мышей Balb/c.

Фиг. 25. Индивидуальные титры анти-PRN IgG, измеренные при помощи ELISA на 28 день, и средние геометрические титры (с планками погрешностей, которые представляют соответствующие 95% доверительные интервалы) в исследовании, проводившемся на модели очищения легких у мышей Balb/c.

Фиг. 26. Индивидуальные значения колониеобразующих единиц (КОЕ) (мелкие точки) и средние геометрические (крупные точки, соединенные линиями) по группам в зависимости от дня исследования, проводившегося на модели очищения легких у мышей Balb/c.

Фиг. 27(A) - (F). Шесть цитокинов (т.е.: IL1a, IL6, TNFa, IL1b, IL10, MIP1a), известные своей связью с механизмами реактогенности, измеряли в надосадочной культуральной жидкости в различных последовательных разведениях.

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к рекомбинантным штаммам *Bordetella pertussis*, содержащим LPS, демонстрирующим пониженную эндотоксичность по сравнению с LPS *Bordetella pertussis* дикого типа. Упоминание LPS в данной заявке также охватывает LOS. Эндотоксичность как LPS, так и LOS в основном определяется составом группировки липида A.

Неожиданно, авторы данного изобретения обнаружили, что бактерия по изобретению также демонстрирует профиль бактериального роста, сопоставимый с таковым бактерии *Bordetella pertussis* дикого типа, не являющейся рекомбинантной.

Использование термина «дикий тип» в отношении бактерии относится к типичному штамму, присутствующему в природе. У таких штаммов дикого типа отсутствуют модификации по изобретению, описанные в данном документе. Таким образом, термин «дикий тип» используют для обозначения микроорганизмов того же штамма, что и микроорганизм по изобретению, но у которого отсутствуют генетические модификации по изобретению, например, описанные здесь генетические модификации LpxA и/или LpxD. Штамм дикого типа может также обозначаться родительским штаммом. В данном описании «эндогенный» ген или белок используют для обозначения немодифицированного гена (последовательности нуклеиновой кислоты) или белка (аминокислотной последовательности), обнаруживаемой у родительского штамма бактерии *Bordetella pertussis* дикого типа, от которой первоначально была получена

рекомбинантная бактерия.

С другой стороны, термин «экзогенный» используют для обозначения генов (нуклеиновокислотных последовательностей) или белков (аминокислотных последовательностей), которые не обнаруживаются в природе у бактериального штамма бактерии *Bordetella pertussis* дикого типа, от которой происходит рекомбинантная бактерия. Термин «экзогенный» может использоваться взаимозаменяемо с термином «гетерологичный».

Данное изобретение относится к рекомбинантным штаммам *Bordetella pertussis*, содержащим по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит мутацию в положении 170 и/или мутацию в положении 229 относительно SEQ ID NO: 1; и/или по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD.

Бактерия

Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по изобретению может происходить от различных родительских штаммов *Bordetella pertussis*, включая, в качестве примеров, не являющихся исчерпывающими: Tohama I, например, *Bordetella pertussis* Moreno-Lopez (ATCC: BAA-589), BP165, BPW28, 10536, 18323, I135, BAA-2706, BAA-2705 или PT/28G [W28] (ATCC: 53894). Предпочтительно, рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по данному изобретению происходит от штамма, экспрессирующего генетически обезвреженный коклюшный анатоксин, в частности, генетически обезвреженный анатоксин, обозначаемый как PT-9K/129G. Рекомбинантный штамм *Bordetella pertussis*, экспрессирующий генетически обезвреженный PT-9K/129G коклюшный анатоксин, содержит две аминокислотные замены в составе субъединицы S1 коклюшного анатоксина (PT), в частности, R9K и E129G (см., например, EP0396964). В частности, штамм *Bordetella pertussis*, от которого происходит рекомбинантная бактерия, представляет собой Tohama I. Более конкретно, рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* происходит от штамма Tohama I, экспрессирующего генетически обезвреженный коклюшный анатоксин. Еще более конкретно, рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* происходит от штамма Tohama I, экспрессирующего генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G. Еще более конкретно, рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* содержит ген S1, который модифицирован таким образом, чтобы включать мутации R9K и E129G, и экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Тогда как коклюшный анатоксин секретируется *Bordetella pertussis*, он может все так же присутствовать в выделенных цельных клетках и везикулах внешней мембраны. Таким образом, использование штаммов, экспрессирующих генетически обезвреженный РТ, обеспечивает преимущества. Предпочтительно, рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по изобретению не экспрессирует ген дермoneкротического токсина (DNT).

Бактериальный липополисахарид и липид А

Бактериальный липополисахарид (LPS) состоит из высоковариабельного О антигена, менее вариабельного центрального олигосахарида и высоко консервативной липидной группы, обозначаемой липидом А. Липид А состоит из глюкозаминового дисахарида, замещенного одной или двумя фосфатными группами и рядом ацильных цепей различной длины (Фиг. 1). Эндотоксическая активность LPS в основном определяется составом группировки липида А.

На Фиг. 1(A) показана структура липида А *Bordetella pertussis* дикого типа. Данное изобретение основано, отчасти, на модификации длины ацильных цепей C2, C2' и/или C3' липида А в составе LPS *Bordetella pertussis*. В предпочтительном воплощении ацильные цепи C3' липида А в составе LPS *Bordetella pertussis* модифицированы. В таком воплощении длина ацильных цепей C2 и C2' липида А в составе LPS *Bordetella pertussis* могут также быть модифицированы. Для этого путь биосинтеза липида А *Bordetella pertussis* был генетически модифицирован.

Ацилтрансферазы LpxA

Ацилтрансферазы LpxA (обозначаемые «LpxA») катализируют перенос присоединенного эфирной связью первичного β -гидрокси-миристата на моносахаридный предшественник (УДФ-глюкозамин) в положениях 3 и 3' липида А, определяя длину ацильных цепей, включенных в обоих положениях, которые варьируют у грамотрицательных бактерий [4, 5,6].

Эндотоксическая активность LPS в основном определяется составом его группировки липид А. Тогда как вариация количества ацильных цепей липида А может влиять на передачу сигнала через TLR4, механизм, по которому изменения в этих цепях различным образом влияют на передачу сигнала через TLR4, полностью не изучен [2].

Таким образом, гетерологичные гены LpxA могут снижать эндотоксичность LPS.

LpxA из *Pseudomonas aeruginosa* (LpxA_{Pa}) и *Neisseria meningitidis* (LpxA_{Nm}) катализируют перенос ацильных цепей длиной в 10 (C₁₀) или 12 (C₁₂) атомов углерода, соответственно. Однако, в предыдущих исследованиях, таких как описанные в

WO2018/167061, гены LpxA_{Pa} или LpxA_{Nm} экспрессировались эписомально у *B. pertussis*, а эндогенный ген LpxA был инактивирован. Эписомальная экспрессия LpxA_{Pa} уменьшала длину ацильной цепи C3' от C₁₄ до C₁₀, однако полученные рекомбинантные штаммы демонстрировали серьезные нарушения роста, что делало их непригодными для крупномасштабной ферментации и применения. С другой стороны, эписомальная экспрессия LpxA_{Nm} в *Bordetella pertussis* была летальной.

Неожиданно, авторы изобретения обнаружили, что у *Bordetella pertussis*, геномная экспрессия LpxA из *B. parapertussis* (LpxA_{Bpa}) позволяет преодолеть проблемы состояния/роста, известные в уровне техники, при этом также уменьшая эндотоксичность LPS.

Аминокислотная последовательность LpxA *Bordetella parapertussis* приведена в SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность LpxA *Bordetella pertussis* приведена в SEQ ID NO: 1.

Аминокислотная последовательность LpxA *B. pertussis* отличается от таковой *B. parapertussis* двумя остатками, соответствующими аминокислотам в положениях 170 и 229 SEQ ID NO: 1 и 2 (Фиг. 2). Полагают, что наличие конкретных замен аминокислот в положении 170 и/или положении 229 изменяет специфичность LpxA, чтобы избирательно включать ацильные цепи C₁₀ в положение C3' липида А. Таким образом, рекомбинантные штаммы *Bordetella pertussis* по изобретению могут экспрессировать ген LpxA, кодирующий аминокислотную последовательность LpxA в которой одна или обе аминокислоты в положениях 170 и 229 (при нумерации согласно SEQ ID NO:1) замещены аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из аланина (А), серина (S), треонина (Т) и цистеина (С). В частности, рекомбинантный штамм *Bordetella pertussis* может экспрессировать ген LpxA, кодирующий аминокислотную последовательность LpxA, в которой G170 был замещен серином (G170S) и/или в котором G229 был замещен аланином (G229A). В частности, рекомбинантный штамм *Bordetella pertussis* может экспрессировать ген LpxA, кодирующий аминокислотную последовательность LpxA, содержащую остаток серина в положении 170 и/или остаток аланина в положении 229 (при нумерации согласно SEQ ID NO:1).

Аминокислотные замены или мутации можно внедрять посредством стандартных методов молекулярной биологии, таких как случайный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, направленная эволюция, замена генов и тому подобных.

Предпочтительно, ген LpxA помимо мутаций, описанных выше, кодирует

аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 2, например, на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% или на 100%.

В частности, идентичность двух последовательностей можно установить с применением алгоритма GENEPASt, предоставленного GenomeQuest, Inc. Вначале алгоритм носил название "Kerr" и проводит арифметическое определение процента идентичности последовательностей без определения биологических весов (Dufresne et al, Nature Biotechnology 20, 1269-1271 (2002) или Andree et al, World Patent Information, 2008, vol. 30, issue 4, pages 300-308). Обычно идентичность последовательностей рассчитывают по отношению ко всей (т.е. полной) длине наиболее длинной из сравниваемых последовательностей.

Ацилтрансферазы LpxD

Ацилтрансферазы LpxD (обозначаемые «LpxD») катализируют перенос присоединенного амидной связью β -гидрокси-миристана в положениях 2 и 2' липида A, определяя длину ацильных цепей, включенных в обоих положениях, варьирующих у грамотрицательных бактерий [6].

Экспрессия экзогенных вариантов LpxD может улучшать эндотоксический профиль бактериального LPS. Таким образом, рекомбинантные штаммы *Bordetella pertussis* по изобретению могут содержать по меньшей мере один гетерологичный ген LpxD. В частности, гетерологичный ген LpxD интегрирован в геном бактерии.

Подходящая аминокислотная последовательность LpxD из *C. testosteroni* (LpxD_{Ct}) представлена как SEQ ID NO: 3. Подходящая аминокислотная последовательность LpxD из *P. aeruginosa* (LpxD_{Pa}) представлена как SEQ ID NO: 4.

Таким образом, в некоторых воплощениях по меньшей мере один гетерологичный ген LpxD представляет собой ген LpxD из *P. aeruginosa*. В некоторых воплощениях по меньшей мере один гетерологичный ген LpxD представляет собой ген LpxD из *C. testosteroni*. В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxD заменяет locus дермoneкротического токсина. В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxD

заменяет эндогенный ген LpxD. В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxD находится под контролем промотора BP0840 (промотор порина внешней мембраны). Еще более конкретно, произведен нокаут копии гена LpxD (LpxD_{вр}) дикого типа.

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность, кодируемая по меньшей мере одним гетерологичным геном LpxD идентична по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:3.

Так, в некоторых воплощениях аминокислотная последовательность, кодируемая по меньшей мере одним геном LpxD, идентична по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% последовательности SEQ ID NO:3. Более конкретно, аминокислотная последовательность LpxD идентична по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:3.

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность, кодируемая по меньшей мере одним гетерологичным геном LpxD идентична по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:4.

Так, в некоторых воплощениях аминокислотная последовательность, кодируемая по меньшей мере одним геном LpxD, идентична по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% последовательности SEQ ID NO:4. Более конкретно, аминокислотная последовательность LpxD идентична по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:4.

В частности, рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по изобретению экспрессирует как гетерологичный ген LpxD, так и ген LpxA, кодирующий аминокислотную последовательность LpxA, содержащую остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229. Более конкретно, бактерия *B. pertussis* экспрессирует LpxA_{вpa} и LpxD_{pa}.

В некоторых воплощениях по меньшей мере один ген LpxA и по меньшей мере один ген LpxD интегрированы в геном бактерии. В других воплощениях ген LpxA интегрирован в геном бактерии, тогда как ген LpxD может экспрессироваться

эписомально.

Эндогенные гены LpxA и/или LpxD рекомбинантной бактерии могут быть инактивированы способами, хорошо известными специалистам в области техники. Например, может быть произведено нокаут генов.

Как правило, эндогенный ген LpxA мутирован, но может быть инактивирован или замещен, например, последовательностью SEQ ID NO: 2. Как правило, эндогенный ген LpxD инактивирован. В некоторых воплощениях инактивированы как эндогенный ген LpxA, так и эндогенный ген LpxD.

В некоторых воплощениях рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по изобретению содержит дополнительные генетические модификации, такие как экспрессия других эндогенных генов и/или инактивация других эндогенных генов. В качестве примеров, не являющихся исчерпывающими, (1) может быть инактивирован эндогенный ген ArnT (SEQ ID NO: 18), например, произведена его делеция или нокаут; (2) инактивирован ген эндогенного дермoneкротического токсина (DNT) (SEQ ID NO: 19), например, произведена его делеция или нокаут; (3) бактерия может экспрессировать PagL (SEQ ID NO: 16) из *Bordetella bronchiseptica*; (4) бактерия может экспрессировать белок LpxE из гетерологичной грамотрицательной бактерии (SEQ ID NO: 6 или 7) и/или (5) бактерия может экспрессировать белок LpxF из гетерологичной грамотрицательной бактерии (SEQ ID NO: 8).

Фосфатфосфатазы LpxE и LpxF

Фосфатфосфатаза LpxE (LpxE) и фосфатфосфатаза LpxF (LpxF) представляют собой гидролазы, которые могут своим действием отделять фосфатную группу от липида, содержащего фосфатную группу. Если отделяется одна фосфатная группа, липид А представляет собой «монофосфориллипид А». Что касается липида А, активность LpxE и LpxF может приводить к отделению фосфатных групп в C1 и C4' центрального дисахарида, соответственно.

Фосфатазы LpxE *Rhizobium leguminosarum* (LpxE_{RL}) и *Francisella novicida* (LpxE_{FN}) раскрыты в документах [65] и [66]. Фосфатфосфатаза LpxF из *Francisella novicida* (LpxF_{FN}) раскрыта в документе [67]. Авторы документов [68] и [69] дополнительно раскрывают гетерологичную экспрессию LpxE_{RL}, LpxE_{FN} и LpxF_{FN} в *E. coli*. Однако, в процитированных документах не раскрыто применение LpxE или LpxF в *Bordetella pertussis*.

Авторы данного изобретения исследовали экспрессию экзогенных LpxE и LpxF

Bordetella pertussis и продемонстрировали, что применение гетерологичных LpxE и/или LpxF изменяет структуру липида А и может также изменять характеристики липида А, например, эндотоксический профиль LPS *B. pertussis*.

Таким образом, штаммы *Bordetella pertussis* по изобретению могут содержать по меньшей мере один гетерологичный ген LpxE и/или по меньшей мере один гетерологичный ген LpxF. В частности, по меньшей мере один гетерологичный ген LpxE и/или по меньшей мере один гетерологичный ген LpxF интегрированы в геном бактерии.

LpxE представляет собой фосфатфосфатазу, которая специфически дефосфорилирует положение C1 центрального дисахарида. Предпочтительно, LpxE представляет собой гетерологичный ген LpxE из бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Rhizobium leguminosarum* (LpxE_{RI}) и *Francisella novicida* (LpxE_{FN}). Подходящие аминокислотные последовательности LpxE из *Rhizobium leguminosarum* и *Francisella novicida* представлены как SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, соответственно.

В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxE заменяет локус гена ArnT (Δ ArnT), кодирующего гликозилтрансферазу. В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxE находится под контролем промотора BP0840 (промотор порина внешней мембраны). В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность, кодируемая по меньшей мере одним гетерологичным геном LpxE, идентична по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% последовательности SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:7.

В одном конкретном воплощении гетерологичный ген LpxE представляет собой LpxE_{FN} под контролем промотора BP0840 (промотор порина внешней мембраны), встроенный в геном бактерии и замещающий локус гена ArnT (Δ ArnT).

В одном воплощении рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по изобретению экспрессирует гетерологичный ген LpxE и ген LpxA, кодирующий аминокислотную последовательность LpxA, содержащую остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229. Более конкретно, бактерия *B. pertussis* экспрессирует LpxAB_{ра} и ген LpxE, выбранный из группы, состоящей из LpxE_{RI} и LpxE_{FN}. В некоторых воплощениях гены LpxA и LpxE интегрированы в геном бактерии. В других воплощениях ген LpxA интегрирован в геном бактерии, тогда как ген LpxE экспрессируется эписомально.

LpxF представляет собой фосфатфосфатазу, которая специфически дефосфорилирует положение C4' центрального дисахарида. Предпочтительно, LpxF

представляет собой гетерологичный ген LpxF из *Francisella novicida* (LpxF_{Fn}). Подходящая аминокислотная последовательность LpxF из *Francisella novicida* представлена как SEQ ID NO: 8.

В некоторых воплощениях по меньшей мере один гетерологичный ген LpxF представляет собой ген LpxF из *Francisella novicida*. В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxF заменяет локус гена ArnT, кодирующего гликозилтрансферазу. В некоторых воплощениях гетерологичный ген LpxF находится под контролем промотора BP0840 (промотор порина внешней мембраны). В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность, кодируемая по меньшей мере одним гетерологичным геном LpxF, идентична по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% последовательности SEQ ID NO:8.

Ацильные цепи липида А

Как правило, липид А грамотрицательных бактерий состоит из β -(1→6)-связанного дисахарида, ацилированного жирными кислотами различной длины и сложности в количестве до восьми, а также заряженных заместителей, таких как фосфатные группы, остатки фосфоэтаноламина или положительно заряженные остатки сахара, и существует множество вариаций липида А различных видов бактерий. Ацилирование в положениях 2 и 2' дисахарида (восстанавливающие и концевые остатки сахара, соответственно) приводит к амидо-связанным липидам, что также справедливо для 3- и 3'-положений, когда ацилирован 3-амино-3-дезоксид-глюкозамин. Гидроксильные группы в положениях 3 и 3', а также 3-гидроксильные группы алифатических ацильных цепей также ацилированы, образуя присоединенные эфирной связью заместители. Степень ацилирования в положениях 4–8 ацильных групп, присоединенных к β -(1→6)-связанному дисахариду варьирует у разных биологических видов, и в составе липида А некоторых видов бактерий присутствует более одной формы.

Как правило, длина ацильных цепей в положениях C2, C2' и C3' липида А у *Bordetella pertussis* дикого типа представляет собой C₁₄. В данном описании «С» с нижним индексом в виде целого числа обозначает молекулу на основе углеродной цепи той длины, которая обозначена целым числом. Так, C₁₄ и C₁₀ будут обозначать молекулы, имеющие цепь с 14 атомами углерода и 10 атомами углерода, соответственно.

Рекомбинантная бактерия по изобретению производит липид А, у которого длина ацильной цепи в положении C2 и/или C2' и/или C3' уменьшена по сравнению с длиной соответствующих ацильных цепей липида А, образуемого грамотрицательными

бактериями дикого типа.

В предпочтительном воплощении рекомбинантная бактерия по изобретению производит липид А, у которого длина ацильной цепи в положении СЗ' уменьшена по сравнению с длиной соответствующих ацильных цепей липида А, образуемого грамотрицательными бактериями дикого типа. В некоторых воплощениях бактерия производит липид А, у которого длина ацильной цепи в положении С2 и/или С2' также уменьшена по сравнению с длиной соответствующих ацильных цепей липида А, образуемого грамотрицательными бактериями дикого типа.

В предпочтительном воплощении длина ацильной цепи в положении СЗ' является меньшей, чем С₁₄, такой как от С₆ до С₁₂, от С₈ до С₁₂ или от С₁₀ до С₁₂, в частности С₁₀ или С₁₂, например, С₆, С₈, С₁₀ или С₁₂. В наиболее предпочтительном воплощении длина ацильной цепи в положении СЗ' представляет собой С₁₀.

В частности, длина ацильной цепи в положении С2 является меньшей, чем С₁₄, такой как от С₆ до С₁₂, от С₈ до С₁₂ или от С₁₀ до С₁₂, в частности С₁₀ или С₁₂, например, С₆, С₈, С₁₀ или С₁₂. В частности, длина ацильной цепи в положении С2' является меньшей, чем С₁₄, такой как от С₆ до С₁₂, от С₈ до С₁₂ или от С₁₀ до С₁₂, в частности С₁₀ или С₁₂, например, С₆, С₈, С₁₀ или С₁₂. В частности, длина ацильной цепи в положении СЗ' является меньшей, чем С₁₄, такой как от С₆ до С₁₂, от С₈ до С₁₂ или от С₁₀ до С₁₂, в частности С₁₀ или С₁₂, например, С₆, С₈, С₁₀ или С₁₂.

В некоторых воплощениях длина ацильных цепей как в положении С2, так и в положении С2' является меньшей, чем С₁₄, такой как от С₆ до С₁₂, от С₈ до С₁₂ или от С₁₀ до С₁₂, в частности С₁₀ или С₁₂, например, С₆, С₈, С₁₀ или С₁₂. В некоторых воплощениях длина ацильных цепей как в положении С2, так и в положении СЗ' является меньшей, чем С₁₄, такой как от С₆ до С₁₂, от С₈ до С₁₂ или от С₁₀ до С₁₂, в частности С₁₀ или С₁₂, например, С₆, С₈, С₁₀ или С₁₂. В некоторых воплощениях длина ацильных цепей как в положении С2', так и в положении СЗ' является меньшей, чем С₁₄, такой как от С₆ до С₁₂, от С₈ до С₁₂ или от С₁₀ до С₁₂, в частности С₁₀ или С₁₂, например, С₆, С₈, С₁₀ или С₁₂. В некоторых воплощениях длина ацильных цепей в положении С2, в положении С2' и в положении СЗ' является меньшей, чем С₁₄, такой как от С₆ до С₁₂, от С₈ до С₁₂ или от С₁₀ до С₁₂, в частности С₁₀ или С₁₂, например, С₆, С₈, С₁₀ или С₁₂.

Липид А, продуцируемый рекомбинантной бактерией по изобретению может существовать в виде смеси видов, имеющих ацильные цепи различной длины.

Так, с учетом общей популяции липида А в клетке по меньшей мере 10%

ацильных цепей в положении C2 представляют собой C₁₀ или C₁₂ и/или по меньшей мере 10% ацильных цепей в положении C2' представляют собой C₁₀ или C₁₂ и/или по меньшей мере 10% ацильных цепей в положении C3' представляют собой C₁₀ или C₁₂. В частности, по меньшей мере 10% могут представлять собой C₁₀ или C₁₂, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% могут представлять собой C₁₀ или C₁₂. Предпочтительно, по меньшей мере 10% представляют собой C₁₀ или C₁₂, по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% представляют собой C₁₀ или C₁₂. Еще более конкретно приблизительно 100% представляет собой представляют собой C₁₀ или C₁₂.

Бактериальный рост

Рекомбинантные штаммы по изобретению являются стабильными и при этом также являются подходящими для выращивания в большом масштабе, например, в промышленности. Неожиданно, профиль роста рекомбинантных бактерий *Bordetella pertussis* по изобретению оказался сопоставимым с таковым родительского штамма дикого типа, указывая, что ни мутация(и) LpxA, ни мутация(и) LpxD, приведенные в качестве примеров, не являются пагубными для роста культуры.

Таким образом, рекомбинантные бактериальные штаммы по изобретению являются наиболее подходящими, например, для получения цельноклеточных бактериальных антигенов и/или OMV, которые затем могут применяться в качестве компонентов иммуногенных композиций, таких как вакцины.

Таким образом, скорость роста культуры рекомбинантных грамотрицательных бактерий по изобретению сопоставима с таковой культуры родительского штамма дикого типа. В частности, при стандартном процессе ферментации, например, при ферментации в объеме 10 л значения истекшего времени и скорости роста по существу схожи, например, отличаются менее чем на 20%, менее чем на 15%, менее чем на 10% или менее чем на 5%.

Везикулы внешней мембраны (OMV)

Второй аспект изобретения относится к везикуле внешней мембраны или к

популяции везикул внешней мембраны, происходящих из рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* по первому аспекту.

OMV представляют собой сферические частицы липидного бислоя в нанометровом диапазоне (10-500 нм в диаметре), естественным образом и постоянно высвобождаемые грамотрицательными бактериями во время роста. OMV образуются вследствие «выпячивания» внешней мембраны бактерий и, соответственно, они имеют состав, схожий с составом внешней мембраны бактерий, включая липополисахарид (LPS), глицерофосфолипиды, белки внешней мембраны бактерий и компоненты периплазмы. Как правило, везикулы внешней мембраны получают из бактерий искусственным путем, и их можно получать посредством обработки детергентами (например, дезоксихолатом) или способами без детергентов.

Методики для образования OMV включают обработку бактерий детергентом на основе соли желчных кислот (например, солей литохолевой кислоты, хенодезоксихолевой кислоты, урсodeзоксихолевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, холевой кислоты, урсохолевой кислоты и т.д.) или дезоксихолатом натрия [7 и 8]. Другие методики можно осуществлять по существу в отсутствие детергента [9 и 10] с применением таких методик, как воздействие ультразвука, гомогенизация, микрофлюидизация, кавитация, осмотический шок, измельчение, френч-пресс, блендирование и т.д. OMV, применяющиеся в изобретении, могут быть получены с применением экстрагирующего буфера, содержащего приблизительно 0,5% дезоксихолата или менее, например, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,1%, менее 0,05% или даже 0.

OMV могут также образовываться спонтанно в процессе роста бактерий и высвобождаться в культуральную среду. Таким образом, OMV могут быть получены путем культивирования бактерий по изобретению в культуральной среде, отделения цельных клеток от более мелких OMV в культуральной среде. Бактериальные везикулы можно удобно отделять от целых бактерий путем фильтрования, например, через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Бактериальные фильтраты можно просветлять путем центрифугирования, например, центрифугирования при высокой скорости (например, 20 000 x g в течение приблизительно 2 ч). Другой эффективный способ для получения OMV описан в [11] и включает ультрафильтрацию первичных OMV, вместо высокоскоростного центрифугирования. Способ может включать стадию ультрацентрифугирования после проведения ультрафильтрации. Простой способ для

очистки бактериальных везикул, описанный в [12], включает: (1) первую стадию фильтрации, на которой везикулы отделяют от бактерий на основании различий в их размере, с прохождением везикул в фильтрат, например, с применением микрофильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм; и (2) вторую стадию фильтрации, на которой везикулы остаются в ретентате, например, с применением микрофильтрации через фильтр с размером пор 0,1 мкм. На обеих стадиях можно применять фильтрацию с тангенциальным потоком.

OMV по изобретению будут включать LOS (также известный как LPS). Пирогенное действие LOS в составе OMV может быть меньше, чем наблюдаемое при таком же количестве очищенного LOS. Таким образом, при рассмотрении пирогенности, обычно предпочтительно сравнивать OMV из бактерий по изобретению с OMV, происходящими из родительского штамма. Уровни LOS выражаются в международных единицах (ME) эндотоксина и могут быть установлены в LAL-тесте (тесте с лизатом амёбоцитов мечехвоста). LOS могут присутствовать в количестве менее 2000 ME на мкг белка OMV.

В некоторых воплощениях изобретения OMV представляют собой OMV, экстрагированные детергентом (dOMV). Термин «dOMV» охватывает различные протеолипосомные везикулы, полученные путем разрушения внешней мембраны грамотрицательных бактерий, обычно в процессе экстрагирования детергентом, с образованием из нее везикул. Предпочтительно, OMV представляют собой экстрагированные детергентом OMV (dOMV). В частности, OMV по изобретению представляют собой dOMV, полученные с применением дезоксихолата. Более конкретно, приблизительно с 0,5% дезоксихолата или менее, например, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,1%, или приблизительно 0,05%.

Гранулометрический состав dOMV по изобретению может составлять от приблизительно 20 до приблизительно 500 нм, по результатам измерения методом динамического светорассеяния (DLS). В частности, гранулометрический состав dOMV по изобретению может составлять от приблизительно 50 до приблизительно 500 нм. Более конкретно, гранулометрический состав dOMV может составлять от приблизительно 75 до приблизительно 250 нм, например, от приблизительно 75 до приблизительно 150 нм. Еще более конкретно, dOMV по изобретению могут иметь средний диаметр приблизительно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90,

95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 нм.

В некоторых воплощениях бактерии по изобретению могут быть модифицированы для активации антигенов или для экспрессии гетерологичных антигенов (т.е. антигенов, не являющихся нативными для конкретного штамма бактерий). В результате такой модификации везикулы, полученные из модифицированных таким образом бактерий будут содержать повышенные уровни активированного(ых) или гетерологичного(ых) антигена(ов). Увеличение экспрессии в везикулах (измеряемое по отношению к соответствующему штамму дикого типа) активированного антигена предпочтительно составляет по меньшей мере 10% при измерении массы соответствующего антигена на единицу массы везикулы, и более предпочтительно составляет по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100% или более.

Цельноклеточные коклюшные антигены

Рекомбинантные бактерии *Bordetella pertussis* по изобретению можно применять в качестве цельноклеточных коклюшных антигенов (wP) в форме инактивированных клеток *B. pertussis*. Получение клеточных коклюшных антигенов хорошо описано в области техники и может осуществляться путем тепловой инактивации культуры клеток *B. pertussis* I фазы. Количество антигенов wP может быть выражено в международных единицах (МЕ). Например, NIBSC поставляет «Международный стандарт для коклюшной вакцины» (код NIBSC: 94/532), содержащий 40 МЕ на ампулу.

При использовании в иммуногенных композициях по изобретению клеточный коклюшный антиген обычно присутствует в количестве, способном вызывать при введении иммунный ответ. В идеале клеточный коклюшный антиген может вызывать защитный иммунный ответ. Количество антигена wP в иммуногенных композициях по изобретению обычно составляет по меньшей мере 4 МЕ/дозу. Антиген wP может быть абсорбирован или смешан с адьювантом солей алюминия, например, адьювантом фосфатом алюминия.

Сигнальный каскад TLR4

Бактерия по изобретению продуцирует липид А, эндотоксическая активность которого понижена по сравнению с эндотоксической активностью липида А из штамма дикого типа, в частности, при измерении в тесте с активацией TLR4 (толл-подобный рецептор 4).

Тесты с активацией TLR4 хорошо известны специалистам в области техники.

Стимуляция сигнального каскада TLR4 может привести к активации транскрипционных факторов NF- κ B и/или активирующего белка 1 (AP-1), которые вносят вклад в экспрессию нескольких провоспалительных цитокинов, например, IL-1, IL-6, IL-8 и TNF- α , и поэтому играют ключевую роль в воспалении. Для оценки активации сигнального каскада TLR4 можно применять определение транскрипционной активности определенных линий, например, клеток HEK-Blue™-hTLR4 (Invivogen). Более конкретно, индуцибельный ген-репортер секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) клеток HEK-Blue™-hTLR4 находится под контролем минимального промотора IL-12 p40, слитого с пятью сайтами связывания NF- κ B и AP-1. При стимуляции лигандом TLR4 активация NF- κ B и AP-1 вызывает секрецию щелочной фосфатазы, которую можно количественно оценить в надосадочной жидкости путем измерения оптической плотности при 655 нм (OD₆₅₅).

Эндотоксическую активность бактерий по изобретению, например, цельноклеточных антигенов или OMV, происходящих из бактерий по изобретению, можно определять при помощи теста с активацией TLR4, в частности, теста с активацией человеческого TLR4, более конкретно, теста с активацией человеческого TLR4 с измерением оптической плотности (OD) при 655 нм. В частности, эндотоксическую активность цельных клеток или OMV по изобретению сравнивают с таковой родительского штамма дикого типа. Способность активировать сигнальный каскад TLR4 при помощи OMV, происходящих из бактерий по изобретению, можно сравнивать с таковой OMV, происходящих из штаммов дикого типа, а также с таковой других бактериальных или коммерческих иммуногенных композиций, например, BEXSERO (вакцина против менингита B, содержащая OMV из *Neisseria*) или QUINVAXEM (цельноклеточная (wP) коклюшная вакцина).

Более конкретно, эндотоксическая активность OMV по изобретению демонстрирует уменьшенную или пониженную активацию сигнального каскада TLR4 по сравнению с эндотоксической активностью OMV, происходящих из бактерии дикого типа. В частности, значения OD₆₅₅, полученные с использованием теста со стимуляцией TLR4 при исследовании мутантов по LpxA и/или LpxD, должны быть схожими, например, приблизительно $\pm 0,5$ OD₆₅₅, со значениями OD₆₅₅ полученными с применением нестимулированных клеток и/или со значениями OD₆₅₅, наблюдающимися с клетками, стимулированными бесклеточной (aP) коклюшной вакциной.

В некоторых воплощениях тест со стимуляцией TLR4 показывает частичное

снижение активации сигнального каскада TLR4 для OMV по изобретению в сравнении с OMV, происходящими из бактерий дикого типа. В частности, значения OD₆₅₅, наблюдавшиеся с LpxA и/или LpxD бактерий или с OMV по изобретению могут быть выше (более чем или равны 0,5 OD₆₅₅), чем значения OD₆₅₅, наблюдавшиеся в нестимулированных клетках и/или значения OD₆₅₅ наблюдавшиеся с клетками, стимулированными aP вакциной, но ниже, чем значения OD₆₅₅, наблюдавшиеся с клетками, стимулированными OMV, происходящими из бактерий дикого типа и/или с wP вакциной и/или с OMV-содержащей вакциной MenB.

Иммуногенные композиции

В третьем аспекте изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим по меньшей мере одну везикулу внешней мембраны, происходящую из рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* по изобретению, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

OMV по изобретению могут найти применение в качестве активных ингредиентов в иммуногенных композициях. Аналогично, цельноклеточные антигены, содержащие целые клетки рекомбинантных *Bordetella pertussis* по изобретению, которые были убиты и дезактивированы (например, путем обработки формалином и/или нагреванием), также могут найти применение в качестве активных ингредиентов в составе иммуногенных композиций.

Термин «иммуногенная композиция» в широком смысле относится к любой композиции, которую можно вводить для индукции иммунного ответа, такого как гуморальный или клеточный иммунный ответ, против антигена или антигенов, присутствующих в композиции. Таким образом, композиции по изобретению являются иммуногенными.

Когда иммуногенные композиции предупреждают, улучшают течение, облегчают или устраняют заболевание у субъекта, такие композиции можно называть вакцинами. Вакцины по изобретению могут быть либо профилактическими (т.е. предупреждать инфекцию), либо терапевтическими (т.е. лечить инфекцию), но обычно являются профилактическими. В некоторых воплощениях иммуногенная композиция представляет собой вакцину. Профилактические вакцины не гарантируют полной защиты от заболевания, даже если у пациента вырабатываются антитела, может быть задержка или запаздывание, прежде чем иммунная система окажется способной побороть инфекцию. Таким образом, во избежание двусмысленного толкования, термин

профилактическая вакцина может также относиться к вакцинам, которые улучшают течение будущей инфекции, например, уменьшая тяжесть или продолжительность такой инфекции.

Термины «защита от инфекции» и/или «обеспечение защитного иммунитета» означают, что иммунная система субъекта может быть стимулирована (например, посредством вакцинации) для запуска иммунного ответа и противостояния инфекции. В частности, запущенный иммунный ответ может быть способен противостоять инфекции, вызванной *Bordetella pertussis*. Таким образом, вакцинированный субъект может быть инфицирован, но способен противостоять инфекции лучше, чем контрольный субъект. Иммуногенные композиции, используемые в качестве вакцин, содержат иммунологически эффективное количество антигена(ов), а также любые другие компоненты, при необходимости. Под «иммунологически эффективным количеством» понимают, что введение такого количества индивидууму, либо в однократной дозе, либо в составе серии, является эффективным для лечения или профилактики. Обычно желаемым результатом является продуцирование антигена (например, патоген)-специфического иммунного ответа, способного защищать или способствующего защите субъекта от патогена. Данное количество варьирует в зависимости от состояния здоровья и физического состояния индивидуума, подлежащего лечению, возраста, таксономической группы индивидуума, подлежащего лечению (например, примата, не относящегося к человеку, примата, и т.д.), способности иммунной системы индивидуума синтезировать антитела, степени необходимой защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других значимых факторов. Предполагается, что количество будет находиться в относительно широком диапазоне, который можно установить с помощью рутинных исследований.

Термин «антиген» относится к веществу, которое при введении субъекту вызывает иммунный ответ, направленный против вещества. В контексте данного изобретения OMV по изобретению представляют собой антигены. В частности, при введении субъекту иммуногенные композиции будут вызывать иммунный ответ, направленный против *Bordetella*, например, *Bordetella pertussis*. В частности, иммунный ответ, направленный против *Bordetella*, является защитным, что означает, он может предупреждать или уменьшать инфекцию или колонизацию, вызванную *Bordetella*, в частности, *Bordetella pertussis*. Таким образом, композиции могут быть фармацевтически приемлемыми. Как правило, иммуногенные композиции включают дополнительные

компоненты помимо антигенов, например, они обычно включают один или более фармацевтически приемлемых фармацевтических носителей и/или эксципиентов. Данные компоненты подробно обсуждаются в документе [13].

«Фармацевтически приемлемый носитель» представляет собой носитель, который сам не вызывает образование антител. Такие носители хорошо известны специалистам в области техники и в качестве примеров, не являющихся исчерпывающими, включают полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, сополимеры аминокислот, сахарозу, трегалозу, лактозу и агрегаты липидов (такие как капли масла или липосомы). Иммуногенные композиции могут также содержать разбавители, такие как воду, физиологический раствор, глицерин и тому подобные. Стерильный апиrogenный фосфатно-солевой буферный раствор является типичным разбавителем. Такие композиции также могут включать в себя вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие вещества, буферизующие вещества для поддержания pH и т.п.

Обычно композиции вводят субъекту, например, пациенту, в частности, подходящему млекопитающему, такому как человек, в водной форме. Однако, перед введением композиция может находиться в неводной форме. Например, хотя некоторые вакцины изготавливают в водной форме, затем заполняют флаконы, транспортируют и вводят также в водной форме, другие вакцины лиофилизируют в процессе изготовления и восстанавливают в водную форму непосредственно перед применением. Таким образом, композиция по изобретению может быть высушенной, такой как лиофилизированный состав.

Композиция может включать консервант, такой как мертиолят или 2-феноксэтанол. Однако, предпочтительно, чтобы вакцина по существу не содержала (т.е. содержала менее 5 мкг/мл) соединения ртути, например, не содержала мертиолята. Более предпочтительны вакцины, не содержащие ртути. Наиболее предпочтительны вакцины, не содержащие мертиолята.

Для контроля тоничности можно включать физиологическую соль, такую как натриевая соль. Можно применять хлорид натрия (NaCl), который может присутствовать в количестве от 1 до 20 мг/мл, например, приблизительно 10 ± 2 мг/мл NaCl.

Обычно композиции имеют осмолярность от 200 мОсм/кг до 400 мОсм/кг, в частности, от 240 до 360 мОсм/кг, и более конкретно, в диапазоне 290 - 310 мОсм/кг.

Композиции могут включать один или более буферов. Типичные буферы

включают: фосфатный буфер, Трис буфер, боратный буфер, сукцинатный буфер, гистидиновый буфер или цитратный буфер. Обычно включают буферы в диапазоне 5-20 мМ.

Значение рН композиции обычно составляет от 5,0 до 8,1, и более конкретно, в диапазоне от 6,0 до 8,0, например, от 6,5 до 7,5, или от 7,0 до 7,8.

Предпочтительно, композиция является стерильной. В частности, композиция является апиrogenной, например, содержит менее 1 ЕЭ (единиц эндотоксина, стандартная единица измерения) на дозу, например, менее 0,1 ЕЭ на дозу. Композиция может быть безглютеновой.

Композиция может включать в себя материал для однократной иммунизации или может включать в себя материал для многократных иммунизаций (т.е. «многодозовый» набор). В многодозовые варианты предпочтительно включать консервант. В качестве альтернативы (или дополнения) к включению консерванта в многодозовые композиции, композиции могут находиться в контейнере, имеющем асептический адаптор для извлечения материала.

Иммуногенные композиции, например, человеческие вакцины обычно вводят в объеме дозы приблизительно 0,5 мл, хотя можно вводить и половинные дозы (т.е. приблизительно 0,25 мл), например, детям.

Иммуногенные композиции по изобретению могут также содержать одно или более иммунорегуляторных веществ. Предпочтительно, одно или более иммунорегуляторных веществ включают один или более адъювантов. В данном описании «адъювант» означает соединение или вещество (или комбинацию соединений или веществ), которые при введении субъекту вместе с антигеном или антигенами, например, как часть иммуногенной композиции или вакцины, повышают или усиливают иммунный ответ субъекта на введенный антиген или антигены (по сравнению с иммунным ответом, полученным в отсутствие адъюванта). Адъюванты могут включать адъювант ТН1 и/или адъювант ТН2, более подробно изложенные ниже.

Адъюванты, которые могут применяться в композициях по изобретению, включают минерал-содержащие композиции, такие как соли алюминия и соли кальция. Композиции по изобретению могут включать в себя соли минералов, такие как гидроксиды (например, гидроокиси), фосфаты (например, гидроксифосфаты, ортофосфаты), сульфаты и т.д. [см., например, главы 8 и 9 документа 14] или смеси различных минеральных соединений, при этом соединения могут находиться в любой

подходящей форме (например, гелевой, кристаллической или аморфной и т.д.), предпочтительна адсорбция. Минерал-содержащие композиции также могут быть составлены в виде частиц соли металла.

Адьюванты, известные как «гидроксид алюминия» обычно представляют собой соли оксигидроксида алюминия, которые обычно по меньшей мере частично являются кристаллическими. Оксигидроксид алюминия, который можно представить формулой $\text{AlO}(\text{OH})$, можно отличить от других соединений алюминия, таких как гидроксид алюминия $\text{Al}(\text{OH})_3$, при помощи инфракрасной (ИК) спектроскопии, в частности, наличием полосы поглощения при 1070 см^{-1} и выраженного плеча при $3090\text{--}3100 \text{ см}^{-1}$ [глава 9 документа 14]. Степень кристалличности адьюванта гидроксида алюминия отражается шириной полосы дифракции на половине высоты (WHH), при этом слабокристаллические частицы демонстрируют большее расширение линии вследствие меньшего размера кристаллов. Площадь поверхности увеличивается с увеличением WHH , и замечено, что адьюванты с более высокими значениями WHH способны лучше адсорбировать антиген. Адьювантам на основе гидроксида алюминия характерна волокнистая морфология (которая видна, например, на снимках, полученных с помощью электронного микроскопа). Значения pI адьювантов гидроксида алюминия обычно составляет приблизительно 11, т.е. поверхность самого адьюванта имеет положительный заряд при физиологических значениях pH . Для адьювантов гидроксида алюминия описана адсорбирующая способность от 1,8 до 2,6 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Адьюванты, известные как «фосфат алюминия» обычно представляют собой соли гидроксифосфата алюминия, также содержащие небольшое количество сульфата (т.е. алюминия гидроксифосфата сульфат). Они могут быть получены путем преципитации, и условия реакции и концентрации в ходе преципитации влияют на степень замещения фосфата на гидроксил в составе соли. Гидроксифосфаты обычно имеют молярное отношение PO_4/Al от 0,3 до 1,2. Гидроксифосфаты можно отличить от самого AlPO_4 по наличию гидроксильных групп. Например, полоса ИК спектра при 3164 см^{-1} (например, при нагреве до 200°C) указывает на наличие гидроксильных групп в структуре [глава 9 документа 14].

Молярное отношение $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ адьюванта фосфата алюминия может составлять от 0,3 до 1,2, в частности, от 0,8 до 1,2, и более конкретно, $0,95 \pm 0,1$. Фосфат алюминия может быть аморфным, в частности, в случае гидроксифосфатных солей. Типичный адьювант представляет собой аморфный гидроксифосфат алюминия с молярным

отношением PO_4/Al от 0,84 до 0,92, при включении по 0,6 мг Al^{3+} /мл. Фосфат алюминия обычно будет в форме частиц (например, с пластинчатой морфологией, которая наблюдается на снимках, полученных с помощью электронного микроскопа). Типичный диаметр частиц находится в диапазоне от 0,5 до 20 мкм (например, приблизительно 5-10 мкм) после адсорбирования любого антигена. Для адъювантов фосфата алюминия описана адсорбирующая способность от 0,7 до 1,5 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Точка нулевого заряда (PZC) фосфата алюминия обратно пропорциональна степени замещения фосфата гидроксидом, и данная степень замещения может варьировать в зависимости от условий реакции и концентрации участвующих в реакции веществ, используемых для получения соли путем преципитации. PZC также меняется при изменении концентрации свободных фосфат-ионов в растворе (больше фосфата, соответственно, более кислые значения PZC) или при добавлении буфера, такого как гистидиновый буфер (делает значения PZC более основными). Фосфаты алюминия, используемые по изобретению, могут иметь значения PZC от 4,0 до 7,0, в частности, от 5,0 до 6,5, например, приблизительно 5,7.

Суспензии солей алюминия, используемые для получения композиций по изобретению, могут содержать буфер (например, фосфатный или гистидиновый или Трис буфер), но это не всегда обязательно. Предпочтительно, суспензии являются стерильными и апирогенными. Суспензия может включать в себя свободные ионы фосфата в водном растворе, например, присутствующие в концентрации от 1,0 до 20 mM, от 5 до 15 mM, в частности, приблизительно 10 mM. Суспензии могут также содержать хлорид натрия.

В некоторых воплощениях компонент адъювант включает в себя смесь как гидроксида алюминия, так и фосфата алюминия. В этом случае фосфата алюминия может быть больше, чем гидроксида, например, в массовом соотношении по меньшей мере 2:1, например, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$ и так далее. В некоторых воплощениях компонент адъювант включает в себя фосфат алюминия. В некоторых воплощениях компонент адъювант включает в себя гидроксифосфат сульфат алюминия.

Концентрация Al^{+++} в композиции для введения пациенту может составлять от 10 мг/мл до 0,01 мг/мл, например, менее 5 мг/мл, менее 4 мг/мл, менее 3 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, например, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 0,3 мг/мл, приблизительно 0,05 мг/мл или приблизительно 0,01 мг/мл.

Конкретный диапазон составляет от приблизительно 0,3 мг/мл до приблизительно 1 мг/мл. В некоторых воплощениях предпочитают максимум 0,85 мг/дозу, например, приблизительно 0,5 мг/л или приблизительно 0,3 мг/мл.

Композиции в виде масляных эмульсий для применения в изобретении в качестве адъювантов включают эмульсии сквален-в-воде, такие как MF59 [глава 10 документа 14; см. также документ 15] (5% сквален, 0,5% Твин 80 и 0,5% Span 85, составленные в виде частиц субмикронного размера с применением микрофлюидизатора). Также можно использовать полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (IFA).

В изобретении также могут использоваться составы на основе сапонины. Сапонины представляют собой гетерогенную группу стероидных гликозидов и тритерпеноидных гликозидов, которые обнаруживаются в коре, листьях, стеблях, корнях и даже цветах у большого числа видов растений. Сапонин из коры дерева *Quillaia saponaria* Molina подробно изучали в качестве адъювантов. Также коммерчески доступен сапонин из *Smilax ornata* (сарсапарели), *Gypsophilla paniculata* (гипсофилы ползучей) и *Saponaria officianalis* (мыльного корня). Составы с адъювантом сапонином включают очищенные составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOM. QS21 представлен под коммерческим названием Stimulon™.

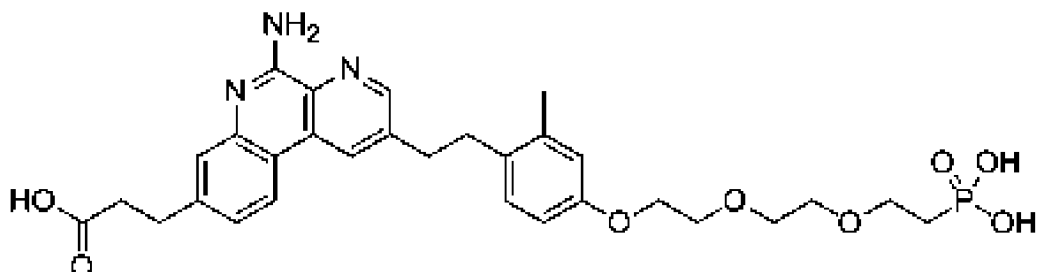
AS01 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфорил липид А), QS21 ((*Quillaja saponaria* Molina, фракция 21) Antigenics, New York, NY, USA) и липосомы. AS01B представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL, QS21 и липосомы (50 мкг MPL и 50 мкг QS21). AS01E представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL, QS21 и липосомы (25 мкг MPL и 25 мкг QS21). В одном воплощении иммуногенная композиция или вакцина содержит AS01. В другом воплощении иммуногенная композиция или вакцина содержит AS01B или AS01E. В конкретном воплощении иммуногенная композиция или вакцина содержит AS01E. AS02 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL и QS21 в эмульсии масло/вода. AS02V представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL и QS21 в эмульсии масло/вода (50 мкг MPL и 50 мкг QS21). AS03 представляет собой адъювантную систему, содержащую α -токоферол и сквален в эмульсии масло/вода (м/в). AS03A представляет собой адъювантную систему, содержащую α -токоферол и сквален в эмульсии м/в (11,86 мг токоферола). AS03B представляет собой адъювантную систему, содержащую α -токоферол и сквален в эмульсии м/в (5,93 мг токоферола). AS03C представляет собой адъювантную систему, содержащую α -токоферол и сквален

в эмульсии м/в (2,97 мг токоферола). В одном воплощении иммуногенная композиция или вакцина содержит AS03. AS04 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (50 мкг MPL), адсорбированный на соли алюминия (500 мкг Al³⁺). В одном воплощении иммуногенная композиция или вакцина содержит AS04. Система, в которой применяется QS21 и 3D-MPL, изложена в WO 94/00153. Композиция, в которой QS21 гасится холестерином, изложена в WO 96/33739. Дополнительный адъювантный состав, включающий QS21, 3D-MPL и токоферол в эмульсии масло в воде, описан в WO 95/17210. В одном воплощении иммуногенная композиция дополнительно содержит сапонин, который может представлять собой QS21. Состав может также содержать эмульсию масло в воде и токоферол (WO 95/17210). Олигонуклеотиды, содержащие неметирированные CpG (WO 96/02555) и другие иммуномодуляторные олигонуклеотиды (WO 0226757 и WO 03507822), также являются предпочтительными индукторами ответа TH1 и подходят для применения в данном изобретении.

Дополнительные адъюванты включают агонисты Toll-подобных рецепторов (в частности, агонист Toll-подобного рецептора 2, агонист Toll-подобного рецептора 3, агонист Toll-подобного рецептора 4, агонист Toll-подобного рецептора 7, агонист Toll-подобного рецептора 8 и агонист Toll-подобного рецептора 9). Композиции по изобретению могут включать в себя один или более низкомолекулярных иммуностимуляторов. Например, композиция может включать в себя агонист TLR2 (например, Pam3CSK4), агонист TLR4 (например, аминокислотилглюкозаминидфосфат, такой как E6020), агонист TLR7 (например, имиквимод), агонист TLR8 (например, резиквимод (также агонист TLR7)) и/или агонист TLR9 (например, IC31). Любой такой агонист в идеале имеет молекулярную массу менее 2000 Да.

Агонисты TLR7, используемые в изобретении, включают по меньшей мере одну адсорбирующую группировку. Включение таких группировок в состав агонистов TLR позволяет им адсорбировать нерастворимые соли алюминия (например, путем обмена лигандами или любым другим подходящим механизмом) и улучшает их иммунологическое поведение. Фосфор-содержащие адсорбирующие группировки особенно эффективны, и поэтому адсорбирующая группировка может содержать фосфат, фосфонат, фосфинат, фосфонит, фосфинит и так далее. Агонист TLR может включать в себя по меньшей мере одну фосфонатную группу. В конкретных воплощениях композиция по изобретению может включать агонист TLR7, включающий в себя фосфонатную группу. Фосфонатная группа может обеспечивать адсорбцию

агониста на нерастворимой соли алюминия. В некоторых воплощениях агонист TLR представляет собой 3-(5-амино-2-(2-метил-4-(2-(2-(2-фосфоэтокси)этокси)этокси)фенэтил)бензо[f]-[1,7]нафтиридин-8-ил)пропановую кислоту, которая показана ниже.



Предпочтительные агонисты TLR являются водорастворимыми. Так, они могут образовывать гомогенный раствор при смешивании в водном буфере с водой при pH 7 при 25°C и давлении 1 атмосфера (0,1 МПа) с образованием раствора, имеющего концентрацию по меньшей мере 50 мкг/мл. Таким образом, термин «водорастворимый» исключает вещества, которые являются лишь слабо растворимыми при указанных условиях.

Композиции по изобретению можно изготавливать в различных формах. Например, композиции можно изготавливать в виде инъекционных препаратов, как в виде жидких растворов, так и в виде суспензий. Также можно изготавливать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией (например, лиофилизированную композицию или высушенную распылительной сублимационной сушкой). Композиция может быть изготовлена для поверхностного нанесения, например, в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть изготовлена для введения в легкие, например, в виде ингаляции, с использованием тонкодисперсного порошка или спрея. Композиция может быть изготовлена для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Композиция может быть выполнена в форме набора, сделанного таким образом, чтобы комбинированную композицию растворяли непосредственно перед введением пациенту. Такие наборы могут содержать один или более антигенов в жидкой форме и один или более лиофилизированных антигенов.

Когда композицию следует приготовить непосредственно перед применением (например, когда компонент представлен в лиофилизированной форме) и она выполнена в виде набора, набор может содержать два флакона или может содержать один предварительно заполненный шприц и один флакон, при этом содержимое шприца

применяют для реактивации содержимого флакона перед инъекцией.

Комбинированные вакцины

Иммуногенные композиции по изобретению как правило будут представлять собой вакцины и, помимо OMV по изобретению могут включать в себя дополнительный(е) защитный(е) антиген(ы) *Bordetella pertussis* и по меньшей мере еще один патоген, отличный от *Bordetella pertussis*.

Дополнительные защитные антигены могут быть вирусными и/или бактериальными. Помимо *Bordetella pertussis*, типичные бактериальные патогены включают, без ограничения: *Corynebacterium diphtheriae*; *Clostridium tetani*; *Haemophilus influenzae* типа b. Типичные вирусные патогены включают, без ограничения: вирус полиомиелита и вирус гепатита В. Во избежание двусмысленного толкования, упоминание дополнительных антигенов предназначено для обозначения дополнительных антигенных компонентов, включенных в иммуногенные композиции по изобретению помимо составляющих OMV. Например, небольшие количества коклюшного анатоксина могут обнаруживаться в качестве составляющих OMV, однако упоминание коклюшного анатоксина в качестве дополнительного антигена относится к количеству коклюшного анатоксина, который специально добавляют в дополнение и сверх составляющих OMV, например, в качестве выделенного белкового антигена.

Бесклеточные коклюшные антигены

Помимо OMV по изобретению иммуногенные композиции по изобретению могут дополнительно содержать один или более бесклеточных коклюшных антигенов (aP), в частности, выбранных из следующих хорошо известных и хорошо охарактеризованных антигенов *B. pertussis*: (1) обезвреженного коклюшного токсина (коклюшного анатоксина, или «РТ»); (2) филаментного гемагглютиниона («FHA»); (3) пертактина (также известного, как «PRN» или «69 кДа белок внешней мембраны»); (4) фимбрий типа 2 («FIM2»); (5) фимбрий типа 3 («FIM 3»). Наиболее предпочтительно применение и обезвреженного РТ, и FHA. В некоторых воплощениях применяют РТ, FHA и PRN. Эти антигены предпочтительно получают путем выделения из культуры *B. pertussis*, выращиваемой в модифицированной жидкой среде Stainer-Scholte. РТ и FHA могут быть выделены из кондиционированной среды (например, путем адсорбции на гидроксипатитном геле), тогда как пертактин может быть выделен из клеток путем тепловой обработки и образования хлопьев (например, с применением хлорида бария). Антигены могут быть очищены путем последовательных стадий хроматографии и/или

преципитации. РТ и FHA могут быть очищены путем хроматографии гидрофобных взаимодействий, аффинной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. Пертактин может быть очищен путем ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобных взаимодействий и эксклюзионной хроматографии.

Перед применением по изобретению FHA и пертактин можно обрабатывать формальдегидом. РТ можно обезвреживать путем обработки формальдегидом и/или глутаральдегидом. В качестве альтернативы такой процедуре химического обезвреживания РТ может быть мутантным РТ, в котором ферментативная активность была снижена в результате мутагенеза, например, генетически обезвреженным РТ, предпочтительно, РТ-9К/129G.

В некоторых воплощениях иммуногенные композиции по изобретению дополнительно содержат антигены фимбрий FIM2 и FIM3.

Антигены аР могут применяться в неадсорбированном состоянии или перед применением могут быть адсорбированы на один или более адъювантов солей алюминия. Как правило, аР антигены по существу не содержат консервантов на основе ртути, таких как мертиолят.

Бесклеточные коклюшные антигены могут присутствовать в иммуногенных композициях по изобретению в количестве, способном вызывать при введении иммунный ответ. В идеале бесклеточные коклюшные антигены могут вызывать защитный иммунный ответ. Количества бесклеточных коклюшных антигенов обычно выражают в микрограммах. Концентрация РТ в вакцине обычно составляет от 5 до 50 мкг/мл. Типичными концентрациями являются 5 мкг/мл, 16 мкг/мл, 20 мкг/мл или 50 мкг/мл, например, приблизительно 20 мкг на дозу или приблизительно 25 мкг на дозу. Концентрация FHA в вакцине обычно составляет от 10 до 50 мкг/мл. Типичными концентрациями являются 10 мкг/мл, 16 мкг/мл или 50 мкг/мл, например, приблизительно 20 мкг на дозу или приблизительно 25 мкг на дозу. Концентрация пертактина в вакцине обычно составляет от 5 до 16 мкг/мл. Типичными концентрациями пертактина являются 5 мкг/мл, 6 мкг/мл или 16 мкг/мл, например, приблизительно 3 мкг на дозу или приблизительно 8 мкг на дозу. FIM2 и FIM3 могут присутствовать в концентрации 5 и 16 мкг/мл. Типичными концентрациями FIM2 и FIM3 являются 5 мкг/мл, 10 мкг/мл или 20 мкг/мл, например, приблизительно 5 мкг на дозу или приблизительно 10 мкг на дозу. Бустерные вакцины для подростков и взрослых обычно содержат от 2,5 до 8 мкг РТ, от 4 до 8 мкг FHA и от 2,5 до 8 мкг пертактина на дозу 0,5

мл. Обычно бустерная вакцина содержит 4 мкг РТ, 4 мкг FHA и 8 мкг пертактина, более предпочтительно 5 мкг РТ, 2,5 мкг FHA и 2,5 мкг пертактина на дозу 0,5 мл. Вакцина для детей обычно содержит 7 мкг РТ, 10 мкг FHA и 10 мкг пертактина на дозу 0,5 мл.

Когда водный компонент включает каждый из РТ, FHA и пертактина, их массовые соотношения могут варьировать, но могут составлять, например, приблизительно 16:16:5, приблизительно 5:10:6, приблизительно 20:20:3 и приблизительно 25:25:8 или приблизительно 10:5:3 (РТ:FHA:PRN).

Дифтерия

Дифтерию вызывает *Corynebacterium diphtheriae*. Дифтерийный токсин можно обрабатывать (например, при помощи формалина или формальдегида) для устранения токсичности, при этом сохраняя способность индуцировать специфические антитела против токсина после инъекции. Дифтерийные анатоксины, используемые в дифтерийных вакцинах хорошо известны в области техники. Предпочтительные дифтерийные анатоксины получают посредством обработки формальдегидом. Дифтерийный анатоксин может быть получен путем выращивания *C. diphtheriae* в культуральной среде (например, среде Fenton или среде Linggoud & Fenton), в которую может быть добавлен говяжий экстракт, с последующей обработкой формальдегидом, ультрафильтрацией и преципитацией. В частности, культуральная среда для выращивания *C. diphtheriae* не содержит компонентов животного происхождения. Затем превращенный в анатоксин материал может поступать в процесс, включающий стерилизацию фильтрованием и/или диализ. В альтернативном варианте можно использовать генетически обезвреженный дифтерийный токсин (например, CRM197), который может быть обработан формальдегидом для сохранения стабильности при хранении в течение длительного времени.

Дифтерийный токсин может быть адсорбирован на адъювант, такой как адъювант на основе соли алюминия.

Количества дифтерийного токсина и/или анатоксина в композиции обычно измеряют в единицах «Lf» («флокулирующих единицах», или «наименьшей флокулирующей дозы», или «порога флокуляции»), определяемых как количество токсина/анатоксина, которое при смешивании с 1 МЕ антитоксина приводит к оптимальной флокуляции смеси [16, 17]. Например, NIBSC предоставляет «Дифтерийный анатоксин, обыкновенный» [18], содержащий 300 LF на ампулу, а также предоставляет «2й международный референс-реагент для дифтерийного анатоксина для флокуляционной

пробы» (NIBSC Code: 02/176), содержащий 900 Lf на ампулу. Концентрацию дифтерийного токсина или анатоксина в композиции можно легко определить при помощи флокуляционной пробы путем сравнения с референтным материалом, калиброванным против таких референс-реагентов.

Иммунизирующая активность дифтерийного анатоксина в композиции обычно выражается в международных единицах (МЕ). Активность можно оценивать путем сравнения защиты лабораторных животных (обычно морских свинок), обеспечиваемой композицией, с референтной вакциной, калиброванной в МЕ. NIBSC поставляет «4й Международный стандарт ВОЗ для дифтерийного анатоксина (Адсорбированный)» (код NIBSC: 07/216), содержащий 213 МЕ на ампулу, подходящий для калибрования таких тестов.

Для определения активности композиций по изобретению можно применять тест с тремя разведениями. После иммунизации у морских свинок забирают кровь или заражают либо подкожным, либо внутрикожным путем. В альтернативном воплощении вместо морских свинок используют мышей. При заборе крови у морских свинок или мышей проводят титрование уровней антитоксина у отдельных животных при помощи тестов нейтрализации токсина с применением серологических методов *in vivo* или *in vitro*, валидированных на вакцинах того же типа, что и исследуемые вакцины. В одном воплощении для валидации используют дифтерийные анатоксины, произведенные в кондиционированной среде, содержащей компоненты животного происхождения. Активность композиций по изобретению рассчитывают с использованием соответствующих статистических методов. Для тестов с тремя разведениями пределы 95% доверительных интервалов оценки активности находятся в пределах 50-200% расчетной активности, если нижний предел 95% доверительного интервала расчетной активности не выше 30 МЕ на одну человеческую дозу. Показано, что при выполнении тестов с одним разведением активность исследуемой вакцины оказывается существенно выше 30 МЕ на человеческую дозу.

При измерении МЕ композиции обычно включают по меньшей мере 30 МЕ/дозу. Композиции обычно включают от 20 до 80 Lf/мл дифтерийного анатоксина, как правило, приблизительно 50 Lf/мл. Бустерные вакцины для подростков и взрослых обычно содержат от 4 Lf/мл до 8 Lf/мл дифтерийного анатоксина, например, 2,5 Lf, предпочтительно 4 Lf, на дозу 0,5 мл. Вакцины для детей обычно содержат от 20 до 50 Lf/мл дифтерийного анатоксина, например, 10 Lf или 25 Lf на дозу 0,5 мл.

Чистота белкового препарата может выражаться отношением конкретного белка к общему белку. Чистота дифтерийного анатоксина в композиции обычно выражается в единицах Lf дифтерийного анатоксина на единицу массы азота белка (недиализуемого). Например, очень чистый токсин/анатоксин может иметь чистоту более 1700 Lf/мг N, указывая, что весь или почти весь белок в композиции представляет собой дифтерийный токсин/анатоксин [19].

Столбняк

Столбняк вызывает *Clostridium tetani*. Столбнячный токсин можно подвергать обработке для получения защитного анатоксина. Анатоксины применяют в столбнячных вакцинах и хорошо известны в области техники. Так, комбинированная вакцина по изобретению может включать в себя столбнячный анатоксин. Предпочтительные столбнячные анатоксины получают посредством обработки формальдегидом. Столбнячный анатоксин может быть получен путем выращивания *C.tetani* в культуральной среде (например, среде Latham на основе бычьего казеина) с последующей обработкой формальдегидом, ультрафильтрацией и преципитацией. Культуральная среда для выращивания *C.tetani* может не содержать компонентов животного происхождения. Затем материал может поступать в процесс, включающий стерилизацию фильтрованием и/или диализ.

Столбнячный анатоксин может быть адсорбирован на адъювант, например, адъювант соли алюминия.

Количества столбнячного анатоксина могут выражаться в единицах «Lf» (см. выше), определяемых как количество анатоксина, которое при смешивании с 1 ME антитоксина приводит к оптимальной флокуляции смеси [14]. NIBSC поставляет «2й международный референс-реагент для столбнячного анатоксина для флокуляционной пробы» (NIBSC Code: 04/150), содержащий 690 LF на ампулу, который можно использовать для калибровки измерений.

Бустерные вакцины для подростков и взрослых обычно содержат 5 Lf столбнячного анатоксина на дозу 0,5 мл. Вакцины для детей обычно содержат от 5 до 10 Lf столбнячного анатоксина на дозу 0,5 мл.

Иммунизирующую активность столбнячного анатоксина можно измерять в международных единицах (ME) путем сравнения защиты лабораторных животных (обычно морских свинок), обеспечиваемой композицией, с референтной вакциной, например, с использованием «Третьего международного стандарта адсорбированного

столбнячного анатоксина, 2000» NIBSC [20, 21], содержащего 469 IU на ампулу. Активность столбнячного анатоксина в композиции по изобретению должна составлять по меньшей мере 35 ME на дозу, например, по меньшей мере 70 ME/мл. Более конкретно, активность столбнячного анатоксина в композиции по изобретению составляет по меньшей мере 40 ME на дозу. Однако, в бустерных вакцинах для взрослых и подростков допускается сниженная активность 20 ME/дозу, из-за пониженного содержания антигена по сравнению с вакцинами для детей, предназначенными для первичной иммунизации.

Для определения активности композиций по изобретению можно применять тест с множественными разведениями. После иммунизации у морских свинок забирают кровь или заражают либо подкожным, либо внутрикожным путем. В альтернативном варианте вместо морских свинок можно использовать мышей. При заборе крови у морских свинок или мышей проводят титрование уровней антитоксина у отдельных животных при помощи тестов нейтрализации токсина с применением серологических методов *in vivo* или *in vitro*, валидированных на вакцинах того же типа, что и исследуемые вакцины. Активность композиций по изобретению рассчитывают с использованием соответствующих статистических методов. При использовании тестов с множественными разведениями нижний и верхний пределы 95% доверительного интервала должны находиться в пределах 50-200% расчетной активности, соответственно. Нижний 95% доверительный интервал расчетной активности столбнячной вакцины, используемой для первичной иммунизации детей должен быть не менее 40 ME на однократную человеческую дозу.

Чистота дифтерийного анатоксина в композиции обычно выражается в единицах Lf столбнячного анатоксина на единицу массы азота белка (недиализуемого). Столбнячный анатоксин должен иметь чистоту по меньшей мере 1000 Lf/мг N.

Hib

Haemophilus influenzae типа b («Hib») вызывает бактериальный менингит. Вакцины Hib обычно имеют в своей основе капсульный сахаридный антиген, получение которого хорошо описано в области техники. Бактерии *H. influenzae* можно культивировать в отсутствие компонентов животного происхождения. Сахарид Hib конъюгирован с белком-носителем с целью улучшения его иммуногенности, особенно у детей. Типичными белками-носителями в этих конъюгатах являются столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин, производное дифтерийного токсина CRM197 или комплекс белков внешней мембраны (ОМРС) менингококка серогруппы B. Так,

комбинированная вакцина по изобретению может включать в себя капсульный сахарид Hib, конъюгированный с белком-носителем.

При конъюгировании сахаридов Hib можно использовать любой подходящий способ химической активации и/или химического присоединения линкеров. Перед конъюгацией обычно осуществляют активацию или функционализацию сахара. Активация может включать, например, цианилирующие реагенты, такие как CDAP (например, 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборат [30, 31]). В других подходящих способах используют карбодиимиды, гидразиды, активные эфиры, норборан, р-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S-NHS, EDC, TSTU; см. также раздел «Введение» документа 32).

Присоединение через линкерную группу можно осуществлять, используя любой известный способ, например, способы, описанные в документах 33 и 34. Один тип присоединений включают восстановительное аминирование полисахарида, присоединение образованной аминогруппы к одному концу адипиновой кислоты, являющейся линкерной группой, а затем присоединение белка к другому концу адипиновой кислоты, являющейся линкерной группой [35, 36, 37]. Другие линкеры включают β-пропионамидо[38], нитрофенил-этиламин [39], галоацил галиды [40], гликозидные связи [41, 42, 43], 6-аминокапроевую кислоту [44], гидразид адипиновой кислоты ADH [45], группировки C₄ - C₁₂ [46] и так далее. Альтернативой применению линкера является непосредственное связывание. Непосредственное связывание с белком может включать окисление полисахарида с последующим восстановительным аминированием с использованием белка, как описано, например, в документах 46 и 47.

Столбнячный анатоксин, который может использоваться в конъюгате, обычно обозначают PRP-T. PRP-T может быть получен путем активации капсульного полисахарида Hib с применением цианоген бромида, присоединения активированного полисахарида к линкеру на основе адипиновой кислоты (такого как (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид), как правило, в виде хлористоводородной соли), а затем проведения реакции элемента линкер-сахарид с белком-носителем столбнячного анатоксина.

Другим предпочтительным белком-носителем Hib является дифтерийный анатоксин CRM197 [47, 48, 49]. Предпочтительный конъюгат содержит сахарид Hib, ковалентно связанный с CRM197 через двухосновной сложный эфир адипиновой кислоты и янтарной кислоты [50, 51].

Сахаридная группировка конъюгата может содержать полноразмерный полирибозилрибитол фосфат (PRP) полученный из бактерий Hib, и/или фрагменты полноразмерного PRP. Конъюгаты с соотношением сахарид:белок (масс./масс.) от приблизительно 1:5 (т.е. с избытком белка) до 5:1 (т.е. с избытком сахара) можно использовать, например, в соотношениях от 1:2 до 5:1 и в соотношениях от 1:1,25 до 1:2,5. Однако, в предпочтительных вакцинах массовое отношение сахара к белку-носителю составляет от 1:2,5 до 1:3,5. В вакцинах, в которых столбнячный анатоксин присутствует как в виде антигена, так и в виде белка-носителя, массовое отношение сахара к белку-носителю в составе конъюгата может находиться в диапазоне от 1:0,3 до 1:2 [52].

Количества антигенов Hib обычно выражают в микрограммах сахара. Концентрация сахара в вакцине обычно составляет от 3 до 30 мкг/мл, например, 20 мкг/мл. Введение конъюгата Hib предпочтительно приводит к концентрации антител против PRP $\geq 0,15$ мкг/мл, и более предпочтительно, ≥ 1 мкг/мл. В некоторых воплощениях изобретения полирибозилрибитолфосфат является синтетическим, например, как описано в [53 или 54].

Вирус гепатита В

Вирус гепатита В (HBV) является причиной вирусного гепатита. Вирин HBV состоит из внутреннего ядра, окруженного внешней белковой оболочкой, или капсидом, а ядро содержит вирусную геномную ДНК. Основным компонентом капсида является белок, известный как поверхностный антиген HBV, или чаще, «HBsAg», который обычно представляет собой полипептид из 226 аминокислот с молекулярной массой приблизительно 24 кДа. Все существующие вакцины против гепатита В содержат HBsAg, и когда данный антиген вводят нормальному пациенту, он стимулирует выработку антител к HBsAg, которые защищают против инфекции HBV. Таким образом, иммуногенные композиции по изобретению могут включать в себя HBsAg.

Для изготовления вакцин HBsAg может быть получен различными способами. Например, путем экспрессии белка методами рекомбинации ДНК. HBsAg для применения в способе по изобретению должен быть рекомбинантно экспрессирован, например, в клетках дрожжей. Подходящие дрожжи включают таких хозяев, как *Saccharomyces* (такие как *S.cerevisiae*), *Hanensula* (такие как *H.polymorpha*) или *Pichia*. Дрожжи можно культивировать в отсутствие компонентов животного происхождения. Экспрессированный в дрожжах HBsAg обычно является негликозилированным, и

поэтому является наиболее предпочтительной формой HBsAg для применения в иммуногенных композициях по изобретению. Экспрессированный в дрожжах HBsAg является высоко иммуногенным, и может быть получен без риска контаминации препаратами крови. В области техники известно множество способов очистки HBsAg из рекомбинантных дрожжей.

Как правило, HBsAg будет в форме, по существу сферических частиц (со средним диаметром приблизительно 20 нм), включающих липидный матрикс, содержащий фосфолипиды. Частицы экспрессированного в дрожжах HBsAg могут включать фосфатидилинозитол, который не обнаруживается в вирионах HBV естественного происхождения. Частицы могут также включать LPS в нетоксических количествах для стимуляции иммунной системы [55]. В частицах может сохраняться неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20), если его использовали в ходе разрушения дрожжей [56].

Предпочтительно, HBsAg происходит из HBV подтипа adw2.

Предпочтительный способ очистки HBsAg включает, после разрушения клеток: ультрафильтрацию, эксклюзионную хроматографию; анионообменную хроматографию; ультрацентрифугирование; обессоливание и стерилизацию путем фильтрования. После разрушения клеток лизаты можно подвергать осаждению (например, с применением полиэтиленгликоля), оставляя HBsAg в растворе, готовым для ультрафильтрации.

После очистки HBsAg можно подвергать диализу (например, цистеином), который можно применять для удаления любых консервантов на основе ртути, использованных в процессе получения HBsAg, таких как мертиолят [57].

Количества HBsAg обычно выражают в микрограммах. Комбинированные вакцины, содержащие HBsAg, обычно содержат от 5 до 60 мкг/мл. Концентрация HBsAg в композиции по изобретению предпочтительно составляет менее 60 мкг/мл, например, не более 55 мкг/мл, не более 50 мкг/мл, не более 45 мкг/мл, не более 40 мкг/мл и так далее. Типичной является концентрация приблизительно 20 мкг/мл, например, 10 мкг на дозу. В некоторых воплощениях изобретения композиция включает «низкую дозу» HBsAg. Это означает, что концентрация HBsAg в композиции составляет не более 5 мкг/мл, например, менее 4, менее 3, менее 2,5, менее 2, менее 1 и так далее. Таким образом, в типичной однократной дозе объемом 0,5 мл количество HBsAg составляет менее чем 2,5 мкг, например, менее 2, менее 1,5, менее 1, менее 0,5, и так далее.

Вирус полиомиелита

Вирус полиомиелита вызывает полиомиелит. Инактивированная вакцина на основе вируса полиомиелита (IPV), более подробно изложенная в главе 24 документа 1, известна в течение многих лет. Так, комбинированная вакцина по изобретению может включать в себя инактивированный антиген вируса полиомиелита.

Вирусы полиомиелита можно выращивать в культуре клеток, и предпочтительно используют культуру клеток линии Vero, полученных из почки обезьяны. Клетки Vero могут быть удобными культивируемыми носителями для микроорганизмов. После выращивания вирионы можно очищать с применением таких способов, как ультрафильтрация, диафильтрация и хроматография. Когда в культуре клеток используют материалы животного происхождения (и, в частности, крупного рогатого скота), они должны быть получены из источников, не зараженных трансмиссивными губчатыми энцефалопатиями (TSE) и, в частности, не зараженных губчатой энцефалопатией крупного рогатого скота (BSE). Предпочтительно, вирусы полиомиелита выращивают в клетках, культивируемых в среде, не содержащей компонентов животного происхождения.

Перед введением пациентам вирусы полиомиелита должны быть инактивированы, и это может достигаться путем обработки формальдегидом (или, предпочтительно, веществом, не являющимся альдегидом). Полиомиелит может быть вызван одним из трех типов вирусов полиомиелита. Эти три типа схожи и вызывают идентичные симптомы, но по антигенным характеристикам сильно различаются, и инфицирование одним типом не защищает от инфекции другими. Таким образом, предпочтительно использовать три антигена вирусов полиомиелита по изобретению: вирус полиомиелита типа 1 (например, штамм Mahoney), вирус полиомиелита типа 2 (например, штамм MEF-1) и вирус полиомиелита типа 3 (например, штамм Saukett). В области техники известны и могут также применяться другие штаммы вируса полиомиелита типа 1, типа 2 и типа 3. Вирусы предпочтительно выращивают, очищают и инактивируют по-отдельности, а затем объединяют с получением нефасованной трехвалентной смеси для применения по изобретению.

Количества IPV обычно выражают в единицах «DU» («D-антигенная единица» [58]). Комбинированная вакцина обычно содержит от 1 до 100 DU на тип вируса полиомиелита на дозу, например, приблизительно 40 DU вируса полиомиелита типа 1, приблизительно 8 DU вируса полиомиелита типа 2 и приблизительно 32 DU вируса полиомиелита типа 3, но возможно применять более низкие дозы, чем указанные [59,

60], например, 10-20 DU для типа 1, 2-4 DU для типа 2 и 8-20 DU для типа 3. Комбинированная вакцина по изобретению может включать в себя «низкую дозу» вируса полиомиелита. Для вируса полиомиелита типа 1 это означает, что концентрация вируса в композиции составляет менее чем 20 DU/мл, например, менее 18, менее 16, менее 14, менее 12, менее 10, и так далее. Для вируса полиомиелита типа 2 это означает, что концентрация вируса в композиции составляет менее чем 4 DU/мл, например, менее 3, менее 2, менее 1, менее 0,5 и так далее. Для вируса полиомиелита типа 3 это означает, что концентрация вируса в композиции составляет не менее чем 16 DU/мл, например, менее 14, менее 12, менее 10, менее 8, менее 6, и так далее. Когда присутствуют все три типа вируса полиомиелита, три антигена могут присутствовать в соотношении DU 5:1:4, соответственно, или в любом другом подходящем соотношении, например, в соотношении 15:32:45 при использовании штаммов Sabin [61]. Особенно эффективна низкая доза антигена штаммов Sabin, менее чем 10 DU типа 1, менее чем 20 DU типа 2 и менее чем 30 DU типа 3 (на единицу дозы, обычно 0,5 мл).

При использовании компонента IPV и выращивании вирусов полиомиелита на клетках Vero, вакцинная композиция предпочтительно содержит менее 10 нг/мл, предпочтительно менее чем 1 нг/мл, например, менее чем 500 пг/мл или менее чем 50 пг/мл ДНК клеток Vero, например, менее 10 нг/мл ДНК клеток Vero длиной более чем 50 пар нуклеотидов.

Получение комбинированной вакцины

Антигенные компоненты из указанных патогенов для применения в вакцинах обычно обозначают укороченными названиями: «D» для дифтерийного анатоксина; «T» для столбнячного анатоксина; «P» для коклюшных антигенов, при этом «aP» означает бесклеточный (например, включающий по меньшей мере OMV по изобретению, PT и FHA и, возможно, пертактин и/или FIM2/FIM3); HBsAg для поверхностного антигена гепатита В; «Hib» для конъюгированного капсульного сахара *H.influenzae* b и «IPV» для 3-валентного инактивированного вируса полиомиелита.

Воплощения изобретения включают комбинации вакцин, содержащие следующие компоненты, но не ограничиваются перечисленными:

- D, T, aP
- D, T, aP, IPV
- D, T, aP, HBsAg
- D, T, aP, Hib

- D, T, aP, Hib, IPV
- D, T, aP, HBsAg, Hib
- D, T, aP, HBsAg, IPV
- D, T, aP, HBsAg, IPV, Hib

Указанные комбинированные вакцины могут состоять по существу только из перечисленных антигенов или могут дополнительно включать антигены из дополнительных патогенов. В частности, указанные комбинированные вакцины содержат только перечисленные антигены в качестве активных ингредиентов, но могут дополнительно содержать эксципиенты, такие как адъюванты, буферы и тому подобное. В некоторых воплощениях компонент aP состоит из OMV по изобретению, PT (предпочтительно, генетически обезвреженного PT) и FHA. В некоторых воплощениях компонент aP состоит из OMV по изобретению, PT (предпочтительно, генетически обезвреженного PT), FHA и PRN. В некоторых воплощениях компонент aP состоит из OMV по изобретению, PT (предпочтительно, генетически обезвреженного PT), FHA и FIM2/FIM3. В некоторых воплощениях компонент aP состоит из OMV по изобретению, PT (предпочтительно, генетически обезвреженного PT), FHA, PRN и FIM2/FIM3.

Для комбинированных вакцин, применяемых в педиатрии, соотношение D:T обычно выше 1 (то есть вакцины, применяемые в педиатрии, обычно имеют избыток D в единицах Lf) и обычно составляет от 2:1 до 3:1 (измеряемое в единицах Lf), например, 2,5:1. Напротив, для бустерных вакцин, которые вводят подросткам или взрослым (которые обычно получали по меньшей мере одну комбинированную вакцину, применяемую в педиатрии, содержащую D и T), соотношение T:D обычно выше 1 (то есть бустерные вакцины обычно имеют избыток T в единицах Lf) и обычно составляет от 1,5:1 до 2,5:1, например, 2:1.

Одна эффективная вакцина включает OMV по изобретению и 2 Lf D, 5 Lf T, 4 мкг PT-9K/129G, 4 мкг FHA и 8 мкг пертактина на единицу дозы. Другая эффективная вакцина включает OMV по изобретению и 25 Lf D, 10 Lf T, 25 мкг PT-9K/129G, 25 мкг FHA и 8 мкг пертактина на единицу дозы.

При объединении антигенных компонентов для получения мультивалентной композиции антигены можно добавлять по-отдельности или их можно предварительно смешивать. Когда комбинированная вакцина содержит антигены D и T и дополнительные антигены, в получении комбинированной вакцины может применяться предварительно смешанный компонент D-T. Такой двухвалентный компонент можно

объединять с дополнительными антигенами. Когда для получения комбинированной вакцины применяют смесь D-T, соотношение дифтерийного анатоксина и столбнячного анатоксина в смеси может составлять от 2:1 до 3:1 (при измерении в единицах Lf), предпочтительно от 2,4:1 до 2,6:1, например, предпочтительно 2,5:1.

Способы лечения

В четвертом аспекте изобретения OMV или иммуногенная композиция может применяться для индукции иммунного ответа у млекопитающего, в частности, подходящего млекопитающего. Подходящим млекопитающим, предпочтительно, является человек; иммунный ответ предпочтительно является защитным и предпочтительно включает антитела.

Иммуногенные и фармацевтические композиции по изобретению предназначены для применения *in vivo* для индукции иммунного ответа против иммуногена, представляющего интерес. Как изложено в данном документе, предложены способы выработки у млекопитающего иммунного ответа, включающие стадию введения эффективного количества иммуногенной композиции или фармацевтической композиции по изобретению. Иммунный ответ, предпочтительно, является защитным и, предпочтительно, включает антитела и/или клеточно-опосредованный иммунитет. Способ может вызывать бустерный ответ.

В изобретении также предложена иммуногенная композиция или фармацевтическая композиция по изобретению для применения в способе выработки у млекопитающего иммунного ответа.

В изобретении также предложено применение OMV или популяции OMV по изобретению в изготовлении лекарственного средства для выработки у млекопитающего иммунного ответа.

Благодаря выработке у млекопитающего иммунного ответа при помощи указанных применений и способов млекопитающее может быть защищено против вирусных заболеваний и/или инфекций, например, бактериальных и/или вирусных заболеваний, как обсуждалось выше. OMV и композиции являются иммуногенными и, более предпочтительно, являются вакцинными композициями. Вакцины по изобретению могут быть либо профилактическими (т.е. предупреждать инфекцию), либо терапевтическими (т.е. лечить инфекцию), но обычно являются профилактическими.

Млекопитающее, в частности, подходящее млекопитающее, может быть человеком или крупным млекопитающим, которому оказывают ветеринарную помощь

(например, лошадьми, крупным рогатым скотом, оленями, козами и свиньями). Когда вакцины предназначены для профилактического применения, человек предпочтительно представляет собой ребенка (например, преддошкольного или грудного возраста) или подростка; когда вакцина предназначена для терапевтического применения, человек предпочтительно представляет собой подростка или взрослого. Вакцину, предназначенную для детей, также можно вводить взрослым, например, для оценки безопасности, дозировки, иммуногенности и так далее.

Вакцины, приготовленные согласно изобретению, могут применяться в лечении и детей, и взрослых. Так, пациент, являющийся человеком, может иметь возраст менее 1 года, менее 5 лет, 1-5 лет, 5-15 лет, 15-55 лет или по меньшей мере 55 лет. В некоторых воплощениях ребенок является индивидуумом в возрасте менее 1 года, например, в возрасте менее одного дня, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 4 недель, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, менее чем приблизительно 12 месяцев).

Особыми группами пациентов для получения вакцин являются пожилые пациенты (например, 20~50-летние, примерно 60-летние и, предпочтительно, примерно 65-летние), молодые пациенты (например, примерно 5-летнего возраста или грудного возраста менее приблизительно 12 месяцев), госпитализированные пациенты, работники системы здравоохранения, служащие в вооруженных силах и военные, беременные женщины, страдающие хроническими заболеваниями или страдающие иммунодефицитом пациенты. Однако, вакцины не являются подходящими исключительно для этих групп и могут применяться более широко в популяции.

Композиции по изобретению, как правило, вводят непосредственно пациенту. Непосредственное введение может осуществляться путем парентеральной инъекции (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно или в интерстициальное пространство ткани). Альтернативные пути доставки включают ректальное, пероральное (например, в виде таблеток, спреев), трансбуккальное, подъязычное, вагинальное, поверхностное, трансдермальное или чрескожное, интраназальное, глазное, ушное, легочное введения или иное нанесение на слизистую оболочку. Внутрикожное и внутримышечное введение представляет собой два

предпочтительных пути. Инъекцию можно осуществлять при помощи иглы (например, иглы для подкожного введения), однако, в альтернативном варианте можно осуществлять безыгольную инъекцию. Типичная внутримышечная доза составляет приблизительно 0,5 мл.

Изобретение можно применять для индукции системного и/или мукозного иммунитета, предпочтительно для индукции усиленного системного и/или мукозного иммунитета.

Указанные применения и способы предпочтительно предназначены для профилактики и/или лечения заболевания, вызванного *Bordetella pertussis* и возможно одним или более из: *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *haemophilus influenzae* серотипа b, вируса полиомиелита и вируса гепатита В. В одном предпочтительном воплощении указанные применения и способы предназначены для профилактики заболевания, вызванного *Bordetella pertussis*.

Субъект, у которого предупреждают заболевание, может не быть тем же самым субъектом, который получает иммуногенную композицию по изобретению. Например, иммуногенную композицию можно вводить лицам женского пола (до или во время беременности) для защиты потомства (так называемая «материнская иммунизация»). Иммунизация беременной женщины обеспечивает антитело-опосредованный иммунитет новорожденному благодаря пассивному иммунитету в результате переноса материнских антител («пассивный материнский иммунитет»). Пассивный иммунитет возникает естественным путем, при переносе материнских антител плоду через плаценту. Пассивный иммунитет особенно важен для новорожденных, поскольку они рождаются без какого-либо приобретенного активным образом иммунитета. Введение композиций по изобретению беременной женщине усиливает иммунитет у женщины, а антитела передаются новорожденному через плаценту, обеспечивая новорожденному пассивный материнский иммунитет. Однако, пассивный иммунитет у детей грудного возраста является лишь временным и начинает снижаться после первых нескольких недель или месяцев жизни. Поскольку пассивный иммунитет является лишь временным, для ребенка грудного возраста может быть важно получить введение композиции по изобретению для индукции активного иммунитета у ребенка грудного возраста, до того как понизится пассивный иммунитет. Введение второй иммуногенной композиции грудному ребенку после рождения индуцирует активный иммунитет у ребенка грудного возраста и продляет иммунитет, полученный от матери во время беременности.

Дозировка может представлять собой схему однократных введений или схему многократных введений. Многократные введения можно осуществлять в режиме первичной иммунизации и/или в режиме бустерной иммунизации. При схеме, включающей многократные введения, различные дозы можно вводить одинаковыми или разными путями, например, осуществлять первичную иммунизацию парентерально и бустерное введение в слизистую, первичную иммунизацию введением в слизистую и парентеральное бустерное введение и так далее. Многократные дозы будут, как правило, вводиться с интервалом, по меньшей мере, 1 неделя (например, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 6 недель, около 8 недель, около 12 недель, около 16 недель, и так далее). В одном воплощении многократные дозы можно вводить приблизительно через 6 недель, 10 недель и 14 недель после рождения, например, в возрасте 6 недель, 10 недель и 14 недель, как часто производят в Расширенной программе по иммунизации («ЕРИ») Всемирной Организации Здравоохранения. В альтернативном воплощении вводят две первичные дозы с интервалом приблизительно два месяца, например, с интервалом 7, 8 или 9 недель, после чего вводят одну или более бустерных доз через 6 месяцев - 1 год после второй первичной дозы, например, через 6, 8, 10 или 12 месяцев после второй первичной дозы. В следующем воплощении вводят три первичные дозы с интервалом приблизительно два месяца, например, с интервалом 7, 8 или 9 недель, после чего вводят одну или более бустерных доз через 6 месяцев - 1 год после третьей первичной дозы, например, через 6, 8, 10 или 12 месяцев после третьей первичной дозы.

Способы модулирования реактогенности липида А

В пятом аспекте изобретение относится к способу модулирования реактогенности липида А бактерии *Bordetella pertussis*, включающему стабильную интеграцию в геном бактерии по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из LpxA и LpxD, где:

(1) ген LpxA кодирует белок LpxA, обладающий по меньшей мере 80%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2, и где белок содержит серин в положении 170 (S170) и/или аланин в положении 229 (A229), при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 1 или 2; и/или

(2) ген LpxD кодирует белок LpxD, обладающий по меньшей мере 90%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. Как описано выше, реактогенность липида А грамотрицательной бактерии, в частности, бактерии *B. pertussis* можно модулировать путем экспрессии экзогенных ферментов пути

биосинтеза липида А, например, ацетилтрансфераз LpxA и LpxD.

Интеграция генов LpxA и LpxD в геном позволяет стабильно экспрессировать экзогенную ДНК без необходимости отбора с применением антибиотиков. Кроме того, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что такие штаммы не страдают нарушениями роста, известными в уровне техники.

Определения

В описании и формуле изобретения все термины, использованные в единственном числе, охватывают термины во множественном числе, за исключением случаев, когда из контекста явным образом не следует противоположное; то есть единственное число означает «один или более», если не указано противоположное.

Термин «и/или», используемый в таком выражении, как «А и/или В» включает «А и В», «А или В», «А» и «В». Аналогично, термин «и/или», используемый в таком выражении, как «А, В и/или С» охватывает каждое из следующих воплощений: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

Термин «содержащий» охватывает «включающий», например, композиция, «содержащая» X может включать что-то дополнительное, например, X + Y. Термин «по существу» не исключает «полностью», например, композиция, которая «по существу не содержит» Y, может полностью не содержать Y. В некоторых воплощениях термин «содержащий» относится к включению указанного активного агента, такого как перечисленные полипептиды, а также к включению других активных агентов и фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов, смягчающих веществ, стабилизаторов и так далее, известных в фармацевтической промышленности. В некоторых воплощениях термин «по существу состоящий из» относится к композиции, единственный активный ингредиент которой представляет собой указанные активные ингредиенты, например, антигены, однако могут быть включены другие ингредиенты, предназначенные для стабилизации, консервации композиции и так далее, но которые непосредственно не задействованы в терапевтическом эффекте указанного активного ингредиента. Использование переходной фразы «по существу состоящий из» означает, что объем пункта формулы изобретения следует интерпретировать как охватывающий конкретные материалы или стадии, упомянутые в пункте формулы изобретения, и те, что не влияют материальным образом на существенные и новые признаки заявленного изобретения. См. в документе Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976)

(выделено в оригинале); см. также МРЕР § 2111.03. Таким образом, когда в пункте формулы данного изобретения используется термин «по существу состоящий из», его не следует считать эквивалентным термину «содержащий». Термин «состоящий из» и его варианты означают «ограниченный», если явным образом не указано иное. В некоторых случаях термин «содержащий активный ингредиент, состоящий из» может использоваться вместо «по существу состоящий из».

Термин «приблизительно» в отношении численных значений x означает нахождение в пределах приемлемого диапазона контекстуальной ошибки для конкретного значения, определенного специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение измеряется или определяется, т.е. ограничения системы измерения или степени точности, необходимой для конкретной цели, например, $x \pm 10\%$, $x \pm 5\%$, $x \pm 4\%$, $x \pm 3\%$, $x \pm 2\%$, $x \pm 1\%$.

Термин «по существу» не исключает «полностью», например, композиция, которая «по существу не содержит» Y , может полностью не содержать Y , но может охватывать условия, которые работают во всех важных аспектах как свободные условия, но где численные значения указывают наличие некоторых примесей или веществ. Где это необходимо, термин «по существу» может быть пропущен в определении изобретения. Когда в описании и формуле изобретения используются конкретные значения, если не указано иное, термин «по существу» означает в пределах допустимого диапазона погрешностей для конкретного значения.

Когда способы относятся к стадиям введения, например, (a), (b), (c) и так далее, предполагается, что они являются последовательными, то есть стадия (c) следует за стадией (b), которой предшествует стадия (a). Антитела, как правило, будут специфичными в отношении своей мишени, то есть они будут обладать более высокой аффинностью к мишени по сравнению с нерелевантным белком, служащим контролем, таким как бычий сывороточный альбумин.

Все документы, патенты или заявки на патенты, процитированные в данном описании, включены в данный документ путем ссылки.

ЧАСТНЫЕ ВОПЛОЩЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Воплощение 1. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая:

(1) по меньшей мере один геномный ген *LpxA*, кодирующий белок *LpxA*, где белок *LpxA* содержит мутацию в положении 170 и/или мутацию в положении 229 относительно SEQ ID NO: 1; и/или

(2) по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD.

Воплощение 2. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 1, содержащая по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит замену в положении 170 и/или замену в положении 229 относительно SEQ ID NO: 1.

Воплощение 3. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 1 или 2, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и/или остаток аланина в положении 229 относительно SEQ ID NO: 1.

Воплощение 4. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 3, где белок LpxA содержит (1) остаток серина в положении 170 и (2) остаток аланина в положении 229 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO:1.

Воплощение 5. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 4, содержащая ген LpxA, кодирующий белок LpxA, обладающий по меньшей мере 80%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 или 2.

Воплощение 6. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предыдущих воплощений, содержащая ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где ген LpxA происходит из *Bordetella parapertussis* (LpxA_{Bpa}).

Воплощение 7. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предыдущих воплощений, содержащая ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA имеет SEQ ID NO: 2.

Воплощение 8. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предшествующих воплощений, где гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, обладающий по меньшей мере 90%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

Воплощение 9. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 8, где гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, обладающий по меньшей мере 95%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

Воплощение 10. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 9, где гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

Воплощение 11. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из

предшествующих воплощений, где эндогенный ген *LpxA* инактивирован и/или эндогенный ген *LpxD* инактивирован.

Воплощение 12. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предшествующих воплощений, продуцирующая липид А, где (1) по меньшей мере 30% ацильных цепей C3' имеют длину от приблизительно C10 до приблизительно C12; и/или (2) по меньшей мере 30% ацильных цепей C2' имеют длину от приблизительно C10 до приблизительно C12; и/или (3) по меньшей мере 30% ацильных цепей C2 имеют длину от приблизительно C10 до приблизительно C12.

Воплощение 13. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предшествующих воплощений, продуцирующая липид А, где (1) по меньшей мере 30% ацильных цепей C3' имеют длину от приблизительно C10 до приблизительно C12.

Воплощение 14. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предшествующих воплощений, продуцирующая липид А, где (1) по меньшей мере 30% ацильных цепей C3' имеют длину C10.

Воплощение 15. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предшествующих воплощений, продуцирующая липид А, где по существу все ацильные цепи C3' липида А имеют длину C10.

Воплощение 16. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предшествующих воплощений, продуцирующая липид А с пониженной эндотоксической активностью по сравнению с эндотоксической активностью липида А, продуцируемого родительским штаммом, в частности, при измерении с использованием тестов с активацией TLR4, в частности тестов с активацией человеческого TLR4.

Воплощение 17. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предшествующих воплощений, где кривая роста бактериальной популяции указанных бактерий сопоставима с кривой роста популяции родительского штамма.

Воплощение 18. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из предшествующих воплощений, где бактерия происходит от штамма Tohama I и экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 19. Выделенная везикула внешней мембраны (OMV), происходящая из рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 1 - 18, содержащая модифицированный липид А, инкорпорированный в мембрану, где по существу все ацильные цепи C3' липида А имеют длину C10 и/или где по существу все ацильные цепи C2 и C2' липида А имеют длину C12.

Воплощение 20. Выделенная везикула внешней мембраны по воплощению 19, содержащая модифицированный липид А, инкорпорированный в мембрану, где по существу все ацильные цепи СЗ' липида А имеют длину С10.

Воплощение 21. Выделенная везикула внешней мембраны по воплощению 19 или 20, которая по существу свободна от дермoneкротического токсина и/или которая содержит эндогенный генетически обезвреженный коклюшный анатоксин.

Воплощение 22. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере одну выделенную OMV по воплощениям 19 - 21 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Воплощение 23. Иммуногенная композиция по воплощению 22, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, состоящей из (1) коклюшного анатоксина (PT), (2) FHA, (3) пертактина (PRN), (4) FIM2/FIM3, (5) аденилатциклазы, (6) дифтерийного анатоксина (DT), (7) столбнячного анатоксина (TT), (8) инаktivированного вируса полиомиелита (IPV), (9) поверхностного антигена гепатита В и (10) Hib PRP (полирибозилрибитолфосфат *Haemophilus influenzae* типа В).

Воплощение 24. OMV по воплощениям 19 - 21 или иммуногенная композиция по воплощению 22 или 23 для применения в индукции иммунного ответа у подходящего млекопитающего, например, человека.

Воплощение 25. OMV по воплощениям 19 - 21 или иммуногенная композиция по воплощению 22 или 23 для применения в профилактике или в качестве вакцины, например, для применения в профилактике заболевания, вызванного *Bordetella pertussis*.

Воплощение 26. OMV по воплощениям 19 - 21 или иммуногенная композиция по воплощению 22 или 23 для применения в профилактике заболевания, вызванного *Bordetella pertussis*.

Воплощение 27. Способ модулирования реактогенности липида А бактерии *Bordetella pertussis*, включающий стабильную интеграцию в геном бактерии по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из LpxA и LpxD, где:

(1) ген LpxA кодирует белок LpxA, обладающий по меньшей мере 80%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2, и где белок содержит серин в положении 170 (S170) и/или аланин в положении 229 (A229), при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 1 или 2; и/или

(2) ген LpxD кодирует белок LpxD, обладающий по меньшей мере 80%-ной идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:

4.

Воплощение 28. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая: по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%-ной идентичностью с SEQ ID NO: 1 или 2.

Воплощение 29. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере один эписомальный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%-ной идентичностью с SEQ ID NO: 1 или 2.

Воплощение 30. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая (1) по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1 или 2 и (2) по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательностям SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

Воплощение 31. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере один эписомальный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1 или 2 и (2) по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательностям SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

Воплощение 32. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

Воплощение 33. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая: по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%-ной идентичностью с SEQ ID NO: 1 или 2 и где бактерия происходит от штамма Tohama и экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 34. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере один эписомальный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 или 2 и где бактерия происходит от штамма Tohama I и экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 35. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая (1) по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1 или 2 и (2) по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательностям SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4, и где бактерия происходит от штамма Tohama I и экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 36. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере один эписомальный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1 или 2 и (2) по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательностям SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4, и где бактерия происходит

от штамма Tohama I и экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 37. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4, и где бактерия происходит от штамма Tohama I и экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 38. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1 или 2, и где бактерия происходит от штамма Tohama I, экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G и не экспрессирует ген дермoneкротического токсина (DNT) (SEQ ID NO: 19).

Воплощение 39. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере один эписомальный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1 или 2, и где бактерия происходит от штамма Tohama I, экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G и не экспрессирует ген дермoneкротического токсина (DNT) (SEQ ID NO: 19).

Воплощение 40. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая (1) по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1 или 2 и (2) по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4, и где бактерия происходит от штамма Tohama I, экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G и не экспрессирует ген дермoneкротического токсина (DNT) (SEQ ID NO: 19).

Воплощение 41. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая (1) по меньшей мере один эписомальный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и остаток аланина в положении 229 (относительно SEQ ID NO: 1) и где ген LpxA кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1 или 2 и (2) по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4 и где бактерия происходит от штамма Tohama I, экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G и не экспрессирует ген дермoneкротического токсина (DNT) (SEQ ID NO: 19).

Воплощение 42. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD, где гетерологичный ген LpxD кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4, и где бактерия происходит от штамма Tohama I, экспрессирует генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G и не экспрессирует ген дермoneкротического токсина (DNT) (SEQ ID NO: 19).

Воплощение 43. Выделенная везикула внешней мембраны (OMV), происходящая из рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 28 - 42, содержащая модифицированный липид А, инкорпорированный в мембрану, где по существу все ацильные цепи C3' липида А имеют длину C10 и/или где по существу все ацильные цепи C2 и C2' липида А имеют длину C12.

Воплощение 44. Выделенная везикула внешней мембраны (OMV), происходящая из рекомбинантной бактерии *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 28 - 42, содержащая модифицированный липид А, инкорпорированный в мембрану, где по существу все ацильные цепи C3' липида А имеют длину C10.

Воплощение 45. Иммуногенная композиция, в частности, фармацевтическая композиция, такая как вакцина, содержащая иммунологически эффективное количество выделенных OMV по воплощению 43 или 44 и фармацевтически приемлемый носитель.

Воплощение 46. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 1 - 18, где бактерия содержит геномную вставку гетерологичного гена LpxE.

Воплощение 47. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 46, где гетерологичный ген LpxE происходит из *Rhizobium leguminosarum* (LpxE_{RI}).

Воплощение 48. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 47,

где аминокислотная последовательность, кодируемая гетерологичным геном LpxE, представляет собой SEQ ID NO:6.

Воплощение 49. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 46, где гетерологичный ген LpxE происходит из *Francisella novicida* (LpxE_{Fn}).

Воплощение 50. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 49, где аминокислотная последовательность, кодируемая гетерологичным геном LpxE, представляет собой SEQ ID NO:7.

Воплощение 51. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 46 - 50, где гетерологичный ген LpxE находится под контролем промотора BP0840.

Воплощение 52. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 46 - 51, где гетерологичный ген LpxE встроен в геном бактерии.

Воплощение 53. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 52, где гетерологичный ген LpxE заменяет локус гена ArnT (Δ ArnT).

Воплощение 54. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 1 - 18, где бактерия содержит геномную вставку гетерологичного гена LpxF.

Воплощение 55. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 54, где гетерологичный ген LpxF происходит из *Francisella novicida* (LpxF_{Fn}).

Воплощение 56. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 55, где аминокислотная последовательность, кодируемая гетерологичным геном LpxF, представляет собой SEQ ID NO:8.

Воплощение 57. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 54 - 56, где гетерологичный ген LpxF находится под контролем промотора BP0840.

Воплощение 58. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из воплощений 54 - 57, где гетерологичный ген LpxF встроен в геном бактерии.

Воплощение 59. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по воплощению 58, где гетерологичный ген LpxF заменяет локус гена ArnT (Δ ArnT).

ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактериальные штаммы и последовательности генов

В Таблицах 1 - 3 приведены использованные ключевые бактериальные штаммы, последовательности ДНК и аминокислотные последовательности.

Таблица 1. Бактериальные штаммы и описание

Штамм	Описание
Tohama I PTg	<i>B. pertussis</i> Tohama I дикого типа, экспрессирующий генетически обезвреженный коклюшный анатоксин PT-9K/129G (Tohama I PTg)
ΔLpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}	Tohama I с геномной интеграцией LpxA _{Вра} и нокаутом эндогенных генов LpxA _{Вре}
ΔArnT/ΔLpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}	Tohama I с геномной интеграцией LpxA _{Вра} и нокаутом эндогенных LpxA _{Вре} и ArnT
ΔLpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}/ΔDNT/LpxD_{Pa}	Tohama I с геномной интеграцией LpxA _{Вра} и LpxD _{Pa} и нокаутом эндогенных генов LpxA _{Вре} и DNT
LpxA_{Вра}/ΔLpxA_{Вре}/ΔDNT/LpxD_{Pa}/ΔLpxD_{Вре}	Tohama I с геномной интеграцией LpxA _{Вра} and LpxD _{Pa} и нокаутом генов LpxA _{Вре} , LpxD _{Вре} и DNT
ΔArnT/PagL_{Bbr}	Tohama I с геномной интеграцией PagL и нокаутом эндогенного гена ArnT
LpxD_{Pa}	Tohama I с эписомальной экспрессией LpxD из <i>P. aeruginosa</i>

LpxA_{Вра}	Tohama I с эписомальной экспрессией LpxA из <i>B. parapertussis</i>
LpxE_{Fn}	Tohama I с эписомальной экспрессией LpxE из <i>Francisella novicida</i>
LpxE_{Rl}	Tohama I с эписомальной экспрессией LpxE из <i>Rhizobium leguminosarum</i>
LpxE_{Fn}/ΔArnT	Tohama I с встраиванием в геном и экспрессией LpxE из <i>Francisella novicida</i> в локусе эндогенного гена ArnT.
LpxE_{Fn} /ΔArnT/ΔLpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}	Tohama I с геномной интеграцией LpxA _{Вра} , LpxE _{Fn} и нокаутом эндогенных LpxA _{Вре} и ArnT
Tohama I	<i>B. pertussis</i> Tomaha I дикого типа (ATCC BAA-589 / NCTC 13251)

Таблица 2. Ключевые аминокислотные последовательности

Номер последовательности	Аминокислотная последовательность	Ref.: ID
1	LpxA <i>Bordetella pertussis</i>	UniProt: Q7VYB8
2	LpxA <i>Bordetella parapertussis</i>	GenBank: BBH97344

3	LpxD <i>Comamonas testosteroni</i>	GenBank: WP 012839123
4	LpxD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GenBank: WP 003098585
5	PagL <i>Bordetella bronchiseptica</i>	GenBank: CAE35745
6	LpxE <i>Francisella novicida</i>	UniProt: Q66RM6
7	LpxE <i>Rhizobium leguminosarum</i>	UniProt: A0A2K9Z9T7
8	LpxF <i>Francisella novicida</i>	UniProt: A0Q4N6

Таблица 3. Ключевые последовательности ДНК

Номер последовательности	Нуклеиновокислотная последовательность	GenBank ID
9	LpxA <i>Bordetella parapertussis</i>	NC_018828.1:2648346-2649140
10	LpxD <i>Comamonas testosteroni</i>	BBQP01000023.1:16517588
11	LpxD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LR590473.1:19088931909954

12	LpxD <i>Comamonas testosteroni</i> (кодонный состав оптимизирован для экспрессии в <i>B. pertussis</i>)	N/A
13	LpxD <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (кодонный состав оптимизирован для экспрессии в <i>B. pertussis</i>)	N/A
14	N-концевая вставка для интеграции в геном <i>B.</i> <i>pertussis</i>	N/A
15	C-концевая вставка для интеграции в геном <i>B.</i> <i>pertussis</i>	N/A
16	PagL <i>Bordetella bronchiseptica</i>	BX640448:164131-163595
17	Промотор порина (BP0840 promoter)	BX640413.1:174494-174789
18	ArnT <i>Bordetella pertussis</i>	
19	DNT <i>Bordetella pertussis</i>	
20	Конструкция для ArnT КО	N/A

21	Конструкция для замены DNT на LpxD <i>P. aeruginosa</i>	N/A
22	LpxE <i>Francisella novicida</i> (кодонный состав оптимизирован для экспрессии в <i>B. pertussis</i>)	N/A
23	LpxE <i>Rhizobium leguminosarum</i> (кодонный состав оптимизирован для экспрессии в <i>B. pertussis</i>)	N/A
24	LpxF <i>Francisella novicida</i> (кодонный состав оптимизирован для экспрессии в <i>B. pertussis</i>)	N/A

Получение и культивирование рекомбинантных бактериальных штаммов

Гетерологичные гены Lpx экспрессировали в *Bordetella pertussis* либо посредством интеграции в геном, либо посредством эписомальной (не-геномной) экспрессии.

Интеграция в геном

Синтетические последовательности, содержащие представляющую интерес последовательность Lpx_{АВра} (SEQ ID NO: 9) и расположенные против и по ходу транскрипции участки гомологии для обеспечения гомологичной рекомбинации (SEQ ID NO: 14 и 15), клонировали в вектор pSORTP1 [62], используя фланкирующие сайты рестрикции EcoRI и HindIII. Вектор pSORTP1 содержит ориджин конъюгативного переноса, маркеры селекции по гентамицину и ампициллину и копию гена *gpl* обеспечивающего чувствительность к стрептомицину.

Векторами pSORTP1 трансформировали *E. coli* SM10 λ pir и культивировали рекомбинантные клоны совместно с устойчивым к налидиксовой кислоте/стрептомицину штамму *B. pertussis* Tohama I для обеспечения конъюгативного переноса вектора. Устойчивость данного штамма к стрептомицину обеспечивала мутация в гене *grsL*. Плазмида не способна реплицироваться в *B. pertussis* и должна быть интегрирована в геном бактерии путем гомологичной рекомбинации для обеспечения устойчивости к гентамицину. Рекомбинантные *B. pertussis* получали путем последовательного отбора на гентамицине (для устранения *B. pertussis* дикого типа) и налидиксовой кислоте (для устранения донорского штамма *E. coli* SM10). Внедрение в геном вектора pSORTP1, содержащего функциональную копию гена *grsL*, придает *B. pertussis* чувствительность к стрептомицину. Отбор на стрептомицине форсирует удаление остова вектора в результате второго события гомологичной рекомбинации в другой части трансгена для получения безмаркерной мутации. Используя указанный подход, авторы изобретения получили рекомбинантный штамм *B. pertussis* Tohama I, экспрессирующий последовательность *LpxA* из *B. parapertussis*. Конструировали ряд дополнительных штаммов следующим образом:

В штамме Δ ArnT/PagL_{Вbr} локус ArnT в геноме *B. pertussis* заменяли на копию *B. bronchiseptica* PagL под контролем промоторной области *B. pertussis* BP0840 (порин внешней мембраны). Рекомбинантную последовательность конструировали с областями ArnT против и по ходу транскрипции, содержащими последовательность PagL *B. bronchiseptica*. Рекомбинантную последовательность клонировали в вектор pSORTP1 с использованием фланкирующих сайтов рестрикции EcoRI и HindIII. После трансформации, как описано выше, в полученном штамме были объединены нокаут гена ArnT и экспрессия гена PagL.

В штамме Δ ArnT/ Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра} произведен нокаут локуса ArnT (SEQ ID NO: 20) в геноме *B. pertussis*.

В штамме Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}/ Δ DNT/LpxD_{Pa}/ Δ LpxD_{Вре}, копию LpxD_{Pa} интегрировали в геном (SEQ ID NO: 21), заменяя ген дермoneкротического токсина (DNT) (SEQ ID NO: 19). Затем осуществляли нокаут LpxD_{Вр} дикого типа.

В штамме LpxE_{Fn}/ Δ ArnT/ Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}, локус ArnT (SEQ ID NO: 20) в геноме *B. pertussis* заменяли копией гена *LpxE Francisella novicida* (SEQ ID NO: 22) под контролем промоторной области *B. pertussis* BP0840 (порин внешней мембраны SEQ ID NO: 17). Рекомбинантную последовательность конструировали с областями ArnT,

расположенными против хода и по ходу транскрипции, содержащими последовательность *LpxE Francisella novicida*. Рекомбинантную последовательность клонировали в вектор pSORTP1 с использованием фланкирующих сайтов рестрикции EcoRI и HindIII. После трансформации, как описано выше, в полученном штамме были объединены нокаут гена *ArnT* и экспрессия гена *LpxE*.

Эписомальная экспрессия

Синтетические последовательности клонировали в вектор pMMB67EH (ATCC Ref.: 37622), используя фланкирующие сайты Acc65I и HindIII. Кодонный состав последовательностей, кодирующих *LpxD_{Ct}*, *LpxD_{Pa}*, *LpxE_{Fn}*, *LpxE_{Rl}* и *LpxF_{Fn}* оптимизировали для экспрессии в *B. pertussis* (PriorityGENE service, GENEWIZ).

Векторами pMMB67EH, содержащими гетерологичные гены *LpxD*, *LpxE* или *LpxF*, трансформировали *E. coli* SM10 *λpir* и культивировали рекомбинантные клоны совместно с устойчивым к налидиксовой кислоте/стрептомицину штамму *B. pertussis* Tohama I для обеспечения конъюгативного переноса вектора. Затем рекомбинантную *B. pertussis*, содержащую плазмиду pMMB67EH, отбирали на ампициллине и налидиксовой кислоте. Стабильную трансформацию *B. pertussis* Tohama I соответствующими конструкциями pMMB67EH подтверждали путем определения гетерологичной последовательности *Lpx* при помощи ПЦР.

Рекомбинантные штаммы *B. pertussis* выращивали в доступной для приобретения среде (см. 63) в стандартных условиях; в среду добавляли 1 мМ IPTG для эписомальной экспрессии.

Оценка роста рекомбинантной *B. pertussis* Δ*LpxA_{Bpe}*/*LpxA_{Bpa}*

Для оценки любого возможного влияния на бактериальный рост исследовали рекомбинантный штамм Δ*LpxA_{Bpe}*/*LpxA_{Bpa}* при ферментации в объеме 10 л.

Вкратце, две полные чашки с агаром Борде-Жангу использовали для инокуляции двух 30 мл 24-часовых прекультур. Затем прекультурами объемом 30 мл инокулировали две дополнительные 24-часовые прекультуры объемом 1 л; эти две вторые прекультуры (приблизительно 1,5 л) затем использовали для инокуляции 10-литрового ферментера при OD_{650nm} 1.

Падение концентрации растворенного кислорода (DO) наблюдалось примерно через 9 часов; это падение связано с увеличением потребления кислорода из-за экспоненциальной скорости роста культуры. Затем регулировали DO скоростью перемешивания.

Окончание процесса ферментации через 37,5 часов характеризовалось снижением скорости перемешивания, вызванным уменьшением потребления кислорода, свидетельствующим об истощении основного источника углерода (Na-L-глутамата). Оптическая плотность (OD_{650nm}) во время сбора составляла 10,1, при этом жизнеспособность клеток составляла $6,3 \cdot 10^{10}$ (КОЕ/мл).

В целом, профиль ферментации $\Delta LpxA_{Vpe}/LpxA_{Vra}$ был сопоставим с профилем штамма Tohama I PTg, с аналогичными показателями времени ферментации и времени, истекшего до DO (Таблица 5, Фиг. 3–5).

Таблица 5. Параметры ферментации для *B. pertussis* $\Delta LpxA_{Vpe}/LpxA_{Vra}$ и Tohama I PTg.

	$\Delta LpxA_{Vpe}/LpxA_{Vra}$	Средние значения для Tohama I PTg (n=3)
Время, истекшее до регулирования концентрации растворенного кислорода (DO), ч	9	9,1 +/- 2,1
Длительность ферментации (ч)	37,5	36,7 +/- 3,7
Оптическая плотность (OD_{650nm})	10,1	9,2 +/- 0,3
Жизнеспособность (КОЕ/мл)	$6,3 \cdot 10^{+10}$	$3,6 \cdot 10^{+10} \pm 1,1 \cdot 10^{+10}$

Получение OMV

Везикулы наружной мембраны (OMV) получали из бактериальных культур для масс-спектрометрического анализа структуры LPS, а также для стимуляции *in vitro* человеческого рецептора TLR4. OMV получали экстракцией детергентом из бактериального осадка после 24 часов культивирования.

Вкратце, бактериальные осадки ресуспендировали в 20 mM Трис-НСl, 2 mM ЭДТА и 50 ЕД/мл бензоназы, рН 8,6, и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Для экстракции OMV детергентом добавляли 0,1% DOC и инкубировали суспензию 30 мин при 40°C. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин (4°C), а надосадочную жидкость стерилизовали фильтрованием (0,22 мкм). Затем стерильный супернатант подвергали ультрацентрифугированию (145000 g, 2 часа, 4°C), ресуспендировали в 1x PBS (с 5 mM ЭДТА), ультрацентрифугировали второй раз (в тех же условиях), ресуспендировали в 1x PBS (без EDTA) и стерилизовали фильтрованием (0,22 мкм).

Характеристика структуры LPS с помощью масс-спектрометрии

Препараты OMV анализировали с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS) для определения влияния геномной мутации LpxA и/или LpxD (или LpxE) и эписомальной экспрессии гетерологичных генов LpxA и/или LpxD, LpxE или LpxF на структуру LPS. В качестве контроля использовали препараты OMV из штамма дикого типа Toham I PTg.

Вкратце, препараты OMV осаждали 95% этанолом, осадки осушали и солюбилизировали в 50% метаноле и обрабатывали ультразвуком. Обработанный ультразвуком материал центрифугировали и 5 мкл супернатанта вводили в колонку ВЭЖХ для масс-спектрометрического анализа структуры LOS.

Рекомбинантные по LpxA штаммы

Геномная интеграция и экспрессия LpxA_{Вра} оказывала существенное влияние на структуру LPS OMV из рекомбинантной *B. pertussis* ΔLpxA_{Врс}/LpxA_{Вра}, при этом 100% ацильных цепей в положении C3' демонстрировали уменьшение длины от C₁₄ до C₁₀ (Фиг. 6(В) - пунктирные линии показывают уменьшение C₁₄ до C₁₀). Для сравнения, экспрессия эписомального LpxA_{Вра} в *B. pertussis* Toham I оказывала очень слабое, не поддающееся количественной оценке влияние (штамм LpxA_{Вра}); что касается экспрессии эписомального LpxA_{Вра}, хотя вариант с уменьшением C₁₄ до C₁₀ присутствует лишь в качестве минорного, на Фиг 7(В) тем не менее показано, где он может отличаться от дикого типа (уменьшение длины от C₁₄ до C₁₀). Для справки, структурный анализ LOS из *B. pertussis* Toham I Ptg дикого типа показан на Фиг. 13.

Геномная интеграция и экспрессия LpxA_{Вра} оказывали аналогичное влияние на структуру LPS при комбинации с ΔAmT, при этом 100% ацильных цепей в положении C3' демонстрировали уменьшение длины от C₁₄ до C₁₀ (Фиг. 8).

Важно отметить, что геномная интеграция и экспрессия LpxA_{Вра} также оказывали такое же влияние на длину ацильной цепи C3' у штаммов Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}/ Δ DNT/LpxD_{Pa} и Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}/ Δ DNT/LpxD_{Pa}/ Δ LpxD_{Вре}, у которых также экспрессировался LpxD из *Pseudomonas* (Фиг. 9 и 10). Экспрессия экзогенного гена LpxD в сочетании с инактивацией соответствующего эндогенного LpxD не оказывала отрицательного влияния на активность экзогенного гена LpxA. Кроме того, существенных различий в росте не наблюдалось.

Аналогично, у штаммов, в которых также экспрессировался LpxE_{Fn}, влияние геномной интеграции и экспрессии LpxA_{Вра} на длину ацильной цепи C3' оставалось неизменным, при этом 100% имели длину C₁₀.

Рекомбинантные по LpxD штаммы

Эписомальная экспрессия LpxD из *P. aeruginosa* (LpxD_{Pa}) оказывала лишь частичное влияние на структуру LPS OMV из рекомбинантной *B. pertussis* (Фиг. 11), при этом только 36% общего количества LPS демонстрировали уменьшенную длину либо обеих ацильных цепей C2 и C2' (24%), либо только одной из ацильных цепей C2 или C2' (12%).

Геномная экспрессия LpxD_{Pa} усиливала влияние на LPS, при этом длина ацильных цепей как C2, так и C2' была уменьшена у 70% LPS, а длина только одной из C2 или C2' была уменьшена у 30% LPS (Фиг. 9). Удаление остаточной активности LpxD_{Вре} приводило к 100% уменьшению длины цепи в обоих положениях (Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}/ Δ DNT/LpxD_{Pa}/ Δ LpxD_{Вре}, Фиг. 10).

Рекомбинантные по Δ ArgT/PagL штаммы

Инактивация ArgT и геномная интеграция PagL приводила к 100% удалению сложного эфира C₁₀ в положении C3 (Фиг. 12). Для справки, структурный анализ OMV из *B. pertussis* Tomaha I Ptg дикого типа показан на Фиг. 13.

Рекомбинантные по LpxE штаммы

Для LpxE из *F. novicida* (штамм B2982, 9.8), LpxE_{Fn}, эписомальная экспрессия приводила к 25% монофосфорилилипида А. Геномная экспрессия LpxE_{Fn}фон на фоне дикого типа увеличивала фракцию монофосфорилилипида А до 91%. Однако экспрессия той же конструкции на фоне мутации LpxA неожиданно продуцировала только 24% монофосфорилилипида А. Аналогичные результаты наблюдались с LpxE из *R. leguminosarum* (штамм B2983, 9.9).

Структурные данные для рекомбинантных штаммов, экспрессирующих LpxE_{Fn} и

LpxE_{rc} на фоне дикого типа, представлены на Фиг. 18 и 19 (описание характеристик для других комбинаций отдельно не приведено).

Рекомбинантные по LpxF штаммы

Что касается LpxF из *F. novicida* (штамм B2981, 9.10), то в ограниченной серии экспериментов не наблюдалось заметного влияния на структуру LOS (Фиг. 20).

Оценка активации сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4 *in vitro*

Стимуляция сигнального каскада TLR4 может привести к активации факторов транскрипции NF-κB и/или активирующего белка 1 (AP-1), которые способствуют экспрессии нескольких провоспалительных цитокинов, например IL-1, IL-6, IL-8 и TNF-α и, таким образом, играют ключевую роль в воспалении.

Чтобы проанализировать, снижалась ли активация сигнального пути TLR4 при использовании очищенных OMV из рекомбинантной *B. pertussis*, определяли TLR4-зависимую транскрипционную активность в клетках HEK-Blue™-hTLR4 (Invivogen).

При стимуляции лигандом TLR4 активация NF-κB и AP-1 индуцирует секрецию щелочной фосфатазы, которую можно обнаружить в надосадочной жидкости с помощью колориметрического анализа QUANTI-Blue™. Ответ рецептора TLR4 определяли, измеряя NF-κB- и AP-1-зависимую продукцию SEAP в надосадочной жидкости при длине волны 655 нм. Для каждого образца исследовали три разных разведения в трех повторностях. Доля сигнала, относящаяся к стимуляции TLR4, визуализируется посредством специфического блокирования рецептора TLR4 антителом против TLR4, с использованием в качестве контроля постороннего антитела (анти-M72). Способность OMV, полученных из различных рекомбинантных штаммов *B. pertussis*, активировать передачу сигналов TLR4 сравнивали с таковой OMV, полученных из штамма Tohama I PTg (Фиг. 14-17).

Для тестов с нормализацией по содержанию белка в качестве контроля включали BEXSERO (вакцина MenB, содержащая OMV MenB), QUINVAXEM (wP вакцина) и INFANRIX HEXA (aP вакцина). Для тестов с нормализацией по содержанию LPS включали очищенный LPS из *B. pertussis*, обезвреженный (мутант LpxL1) очищенный LPS из *Neisseria* и отрицательный контроль без стимуляции.

Данные, полученные на HEK-hTLR4, показали заметное снижение активации сигнального каскада TLR4 с помощью OMV из отдельного мутанта ΔLpxA_{вр}/LpxA_{вр}. Профиль активации был сравним (± 0,5 OD) с профилем INFANRIX HEXA, т.е. низкая активация сигнального каскада TLR4.

Аналогичные результаты были получены со всеми рекомбинантными штаммами *B. pertussis* с геномной вставкой LpxA_{Вра}, а именно Δ ArnT/ Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}, Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}/ Δ DNT/LpxD_{Pa} и Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}/ Δ DNT/LpxD_{Pa}/ Δ LpxD_{Вре}.

В соответствии с их частичным влиянием на структуру LPS те мутанты LpxD, у которых LpxD экспрессировался эпизомально, вызывали более умеренное снижение активации сигнального каскада TLR4. Более конкретно, значения OD₆₅₅, наблюдаемые с мутантами LpxD, были выше ($\geq 0,5$ OD₆₅₅), чем значения OD₆₅₅, наблюдаемые в нестимулированных клетках, и/или значения OD₆₅₅, наблюдаемые с клетками, стимулированными аР-вакциной, но ниже, чем значения OD₆₅₅, наблюдаемые с клетками, стимулированными OMV, полученными из грамотрицательной бактерии дикого типа. Снижение наблюдалось в тестах с нормализацией как по белку, так и по LPS.

Влияние мутации Δ ArnT в штамме Δ ArnT/ Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра} не может быть легко установлено, поскольку снижение стимуляции TLR4, обеспечиваемое мутацией Δ LpxA_{Вре}/LpxA_{Вра}, уже приводит к подавлению показателей, и дальнейшее снижение наблюдаться не может. С другой стороны, с OMV из штамма Δ ArnT/PagL_{Вб} наблюдается усиление стимуляции TLR4. Учитывая, что такое увеличение не наблюдается в обоих мутантных штаммах Δ ArnT, предполагается, что это увеличение вызвано удалением ацильной цепи C3 вследствие активности PagL_{Вб}.

Интересно, что в то время как у мутантов LpxE изменялась структура липида А, в проведенных тестах не было обнаружено значительного снижения стимуляции TLR4 (Фиг. 21 и 22).

Исследование эффективности, проведенное на модели колонизации носоглотки у мышей Balb/c

Задача данного исследования состояла в оценке влияния вакцин-кандидатов dOMV при совместном введении с DTPa на модели колонизации носоглотки (NP) против штамма *Bordetella Pertussis* дикого типа Tohama I при сравнении с мышами, вакцинированными вакцинами DTPa или DTPw, или с ранее зараженными мышами (реконвалесцентными мышами).

Схема эксперимента:

25 самок мышей BALB/c в возрасте 6 недель отнесли к одной из групп, приведенных в Таблицах 6 и 7 ниже. В Таблице 6 подробно описано первое исследование, включавшее 25 мышей. Всех этих мышей ранее заражали 10^6 CF/10 мкл

штамма *Bordetella Pertussis* дикого типа Tohama I (реконвалесцентные мыши). Это исследование получило название «LIMS 20190306». Второе исследование подробно описано в Таблице 7 и обозначено «LIMS 20190307».

Оба исследования были спланированы таким образом, чтобы заражение 10^5 CF/10 мкл штамма *Bordetella Pertussis* Tohama I производилось в один и тот же день. Следовательно, реконвалесцентные мыши (из LIMS 20190306) были старше вакцинированных мышей (из LIMS 20190307).

Предполагается, что среднее число колониеобразующих единиц (КОЕ), измеренное путем подсчета роста колоний на чашках с угольным агаром с добавлением цефалексина или путем количественного определения с помощью ПЦР, подчиняется логнормальному распределению. Статистический метод представляет собой дисперсионный анализ (ANOVA) (классический или количественный), оценивающий влияние 2 факторов (вакцина и день) и их взаимодействия на $\log_{10}$ значений.

Таблица 6.

Группа	Кол-во животных	Воздействие		Схема иммунизации	Заражение	Забор образцов
		Доза вакцины	Доза адъюванта– Al(OH) ₃ (мкг)			
1	25	Не вакцинированы			Штамм Tohama Bp Д0 Д58	Забор крови Д29 – Д57 – носовая полость 2ч- 4-7-14-21 дни после второго заражения

Таблица 7.

Группа	Кол-во животных	Вакцины (введение в разных участках)					Схема иммунизации	Заражение	Забор образцов
		Участок 1	Доза (Общий белок) /доза Al(OH) ₃	Участок 2	HD/доза Al	Объем и путь введения			
1	25	Не вакцинированы	-	Не вакцинированы	-	-	-	Штамм Tohama Вр Д29	Забор крови Д28 – носовая полость 2ч-4-7-14-21 дни после заражения
2	25	-	-	InfanrixTM AC14B249C1	1/4 /125 мкг	1x125 мкл (п/к)	Д0-21		
3	25	-	-	Easy-FiveTM E5PFS8016	1/4 /62,5 мкг	1x125 мкл (п/к)	Д0-21		
4	25	OMV WT-(OMV034) /Al(OH) ₃	25 мкг/125 мкг	InfanrixTM AC14B249C1	1/4 /125 мкг	2x125 мкл (п/к)	Д0-21		
5	25	OMV LpxA-(OMV035) / Al(OH) ₃	25 мкг/125 мкг	InfanrixTM AC14B249C1	1/4th /125 мкг	2x125 мкл (п/к)	Д0-21		

Результаты:

Гуморальные иммунные ответы показаны на Фиг. 23. На Фиг. 23 представлены индивидуальные титры IgG антител против PPRN, измеренные с помощью ELISA на 28-й день, а также средние геометрические титры (GMT), полученные с применением модели ANOVA, а также их 95% доверительные интервалы. Следует отметить, что в исследовании 20190306 оценку группы проводили на 28 и 56 дни.

Для анти-PRN IgG, измеренных с помощью ELISA на 28-й день, иммуногенность наблюдалась во всех вакцинированных группах (Infanrix, Easy Five, OMV LPXA и OMV WT). Однако после вакцинации Easy Five наблюдалась более низкая иммуногенность (GMR более 3) по сравнению с другими вакцинированными группами. Более того, значительно более низкая иммуногенность (GMT 136 и 346, соответственно) показана для реконвалесцентных мышей по сравнению с вакцинированными группами в 2 временных точках Д28 и Д56.

Оценка защиты касается бактериальной нагрузки, определяемой как среднее число колониеобразующих единиц (КОЕ) на носовую полость для каждого времени забора (+2 часа и 4, 7, 13, 21 дни после заражения). Описательная статистика представлена на Фиг. 24.

Отмечалась значительная разница в бактериальной нагрузке между группой без вакцины (т. е. невакцинированной группой 1 в Таблице 7) и всеми другими группами, что позволяло предположить некоторый уровень защитного иммунного ответа против назальной колонизации после вакцинации или повторного заражения.

Снижение КОЕ более чем на $10 \log$ (GMR=258) наблюдали у выздоравливающих животных (Таблица 6) по сравнению с невакцинированным животным, что подтверждало пригодность этой группы в качестве положительного контроля.

В целом это говорит о том, что данная модель позволяет обнаруживать меньшую назальную колонизацию.

Снижение КОЕ более чем на $1 \log$ наблюдалось при использовании OMV LpxA-Infanrix (GMR=61) (группа 5 Таблицы 7) и OMV WT-Infanrix (GMR=48) (группа 4 Таблицы 7) по сравнению с невакцинированными животными, а также по сравнению с Infanrix в отдельности (GMR = 17,7 и 13,8 соответственно), но не по сравнению с группой невакцинированных (реконвалесцентных мышей) (GMR = 4,2 и GMR = 5,4, соответственно).

Вакцинация обеими вакцинами OMV при совместном введении с DTPa схожим

образом уменьшала назальную колонизацию после заражения штаммом *Bordetella Pertussis* Tohama I по сравнению как с невакцинированными мышами, так и с мышами, вакцинированными Infanrix (DTPa). Это указывает на дополнительное значение OMV для предотвращения колонизации носоглотки по сравнению с вакциной DTPa. Это также указывает на то, что обезвреживание липида А не оказало негативного влияния на снижение носовой колонизации.

Исследование эффективности, проведенное на модели очищения легких у мышей Balb/c

Основная задача данного исследования состояла в том, чтобы оценить дополнительное преимущество защитной эффективности вакцин dOMV при совместном введении с DTPa против штамма *Bordetella Pertussis* PRN(-) на мышинной модели.

Профилактическую эффективность оценивали путем определения бактериальной нагрузки на легкое для каждого времени забора (+2 часа и 2, 5 и 8 дни после заражения) по среднему числу колониеобразующих единиц (КОЕ - log10).

Схема эксперимента:

Двадцать самок BALB/c в возрасте 6 недель были случайным образом распределены в одну из групп исследования, подробно описанных в Таблице 8. На 29-й день мышей заражали 5×10^6 КОЕ/50 мкл штамма *Bordetella Pertussis* FR5388 PRN(-).

Таблица 8.

Группа	Кол-во животных	Вакцины (введение в разных участках)					Схема иммунizations	Заражение	Забор образца
		Участок 1	Доза (общий белок)/ доза Al(OH) ₃	Участок 2	HD/доза Al	Объем и путь введения			
1	20	Не вакцинированы	-	Не вакцинированы	-	-	-	PRN(-) штамм Br FR5388 Д29	Забор крови Д28 – Легкое 2ч-2-5-8 дни после заражения Забор крови Д28
2	20	-	-	InfanrixTM	1/4 /125 мкг	1x125 мкл (п/к)	Д0-21		
3	20	-	-	Easy-FiveTM	1/4 /62,5 мкг	1x125 мкл (п/к)	Д0-21		
4	20	OMV WT /Al(OH) ₃	25 мкг/125 мкг	InfanrixTM	1/4 /125 мкг	2x125 мкл (п/к)	Д0-21		

5	20	OMV LpxA Al(OH) ₃	25 мкг/125 мкг	InfanrixTM	1/4 /125 мкг	2x125 мкл (п/к)	Д0-21		
6	20	OMV LpxA/Lpx D /Al(OH) ₃	25 мкг/125 мкг	InfanrixTM	1/4 /125 мкг	2x125 мкл (п/к)	Д0-21		

Результаты:

Гуморальные иммунные ответы показаны на Фиг. 25. На Фиг. 25 представлены индивидуальные титры анти-PRN IgG, измеренные с помощью ELISA на 28-й день (за 1 день до заражения), а также средние геометрические титры (GMT), полученные с помощью модели ANOVA, а также их 95% доверительные интервалы. Получение вакцины подтверждалось во всех вакцинированных группах, о чем свидетельствуют анти-PRN IgG на Фиг. 25. Во всех группах был индуцирован схожий ответ против PRN, за исключением группы «Easy-Five», в которой расчетные значения GMT были примерно в 3 раза ниже, чем в других группах. Эти различия расценивали как статистически значимые.

Оценка защиты от коклюша касается бактериальной нагрузки, определяемой по среднему числу колониеобразующих единиц (КОЕ) на легкое для каждого времени забора (+2 часа и 2, 5, 8 дни после заражения). Описательная статистика представлена на Фиг. 26. Как показано на Фиг. 26, отмечалась значительная разница между группой, не получавшей вакцины, и другими группами, что позволяло предположить защитный иммунный ответ после вакцинации вакциной от коклюша. Частичная защита наблюдалась в группе, иммунизированной Infanrix или Easy Five. Значительная разница наблюдалась между группой, иммунизированной Infanrix, и группой, также получавшей dOMV при совместном введении, что указывало на дополнительное преимущество dOMV при очищении легких от штамма PRNneg по сравнению с вакциной DTPa.

Ожидалось получение различных кинетических профилей в зависимости от группы (например, Infanrix и Easy Five должны отличаться от всех других групп), и в статистическом анализе это отражается значительным взаимодействием между «группой» и «днем».

Более выраженное снижение КОЕ наблюдается после вакцинации OMV (GMR от 130000 до 42000 на 5-й день и равно 127439 на 8-й день) по сравнению с невакцинированной группой (GMR менее 2000 на 5-й и 8-й день) по сравнению с группами Infanrix или Easy Five. Никаких различий между указанными 3 группами OMV не наблюдалось. Эти результаты являются положительными, поскольку они показывают,

что OMV LpxA и OMV LpxA/LpxD столь же эффективно препятствуют легким PRN-отрицательным штаммом *B. pertussis* колонизации, как и OMV WT.

Стимуляция человеческих МПКК

Схема эксперимента:

Проводили эксперимент для оценки профиля секреции биомаркеров реактогенности (врожденных цитокинов) стимулированными мононуклеарными клетками периферической крови человека (МПКК). Замороженные МПКК, собранные у 3 здоровых доноров крови, размораживали и высевали отдельно в 96-луночный планшет в концентрации 5Е6 клеток на мл. Затем клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C с эквивалентными по белку составами. Готовили восемь последовательных разведений с 5-кратным шагом между ними, как подробно описано в Таблице 9. В конце инкубации измеряли цитокины с помощью мультиплексного анализа в собранных культуральных надосадочных жидкостях.

Для тестирования готовили человеческий стандарт и контроли. В данном тесте исследовали следующие цитокины: IL-6, IL-10, TNF- α («TFNa»), IL-1 α («IL-1a»), IL-1 β («IL-1b») и MIP-1 α («MIP1a»).

Таблица 9. Условия активации:

	Исходная концентрация белка (мкг/мл)	Конечная концентрация дозы №1 (мкг/мл)	Конечная концентрация дозы №8 (мкг/мл)
Bexsero	50	1,25	0,000016
Quinvaxem	50	1,25	0,000016
Infanrix Hexa	50	1,25	0,000016
Vaxelis	50	1,25	0,000016
Easy Five	50	1,25	0,000016
dOMV WT неадсорбированный (PTg WT)	730	1,25	0,000016

dOMV WT адсорбированный на Al(OH) ₃ (PTg WT)	200	1,25	0,000016
dOMV LpxA неадсорбированный	310	1,25	0,000016
dOMV LpxA адсорбированный на Al(OH) ₃	200	1,25	0,000016
dOMV LpxA/LpxD неадсорбированный	870	1,25	0,000016
dOMV LpxA/LpxD адсорбированный на Al(OH) ₃	200	1,25	0,000016

Результаты:

Шесть цитокинов (т.е.: IL-6, IL-10, TNF- α («TFNa»), IL-1 α («IL-1a»), IL-1 β («IL-1b») и MIP-1 α («MIP1a»)), о которых известно, что они связаны с механизмами реактогенности, измеряли в культуральных надосадочных жидкостях для различных последовательных разведений. Фиг. 27 соответствует среднему значению по 3 донорам, где данные сгруппированы в зависимости от стимуляции и цитокина (за исключением разведения №1, нарушавшего жизнеспособность клеток в условиях данного эксперимента).

На Фиг. 27 показано, что OMV LpxA демонстрирует сниженную секрецию врожденных цитокинов человеческими PBMC по сравнению с OMV дикого типа (WT), что свидетельствует о сниженной реактогенности OMV, несущих мутацию LpxA.

При анализе площади под кривой (AUC) с помощью критерия Краскала-Уоллиса с группированием по цитокинам и разведениям (но по-прежнему, с исключением разведения №1) для всех разведений (см. Фиг. 27 и Таблицу 9), обнаружили, что уровень врожденных цитокинов был достоверно выше по сравнению с Infanrix Hexa только при условии индукции dOMV WT, адсорбированными на Al(OH)₃. При других условиях

статистически значимых различий не наблюдалось. Неадсорбированные dOMV с мутацией LpxA или LpxA/LpxD, демонстрировали тенденцию к снижению секреции врожденных цитокинов человеческими PBMC по сравнению с OMV WT, что позволяло предположить сниженную реактогенность OMV, несущих мутации LpxA или LpxA/D. Уровень секреции врожденных цитокинов, индуцированный OMV LpxA, находился в том же диапазоне, что и в случае Bexsero, и имел тенденцию быть ниже по сравнению с цельноклеточной вакциной.

Следует понимать, что были описаны лишь примеры осуществления изобретения, и возможны любые модификации, остающиеся в границах и в духе изобретения, суть которого изложена прилагающейся формулой изобретения.

Литература

[1] Acevedo R. et al., Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front. Immunol.* 2014 Mar 24;5:121.

[2] Maeshima N., Fernandez R.C. (2013) Recognition of lipid A variants by the TLR4/MD-2 receptor complex. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3:3.

[3] WO2018/167061

[4] Sweet C.R., Preston A., Toland E., Ramirez S.M., Cotter R.J., Maskell D.J., Raetz C.R. (2002) Relaxed acyl chain specificity of *Bordetella* UDP-N-acetylglucosamine acyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* 277(21):18281-90.

[5] Bartling C.M., Raetz C.R. (2009) Crystal structure and acyl chain selectivity of *Escherichia coli* LpxD, the N-acyltransferase of lipid A biosynthesis. *Biochemistry* 48(36):8672-83

[6] Steeghs L, Berns M, ten Hove J, de Jong A, Roholl P, van Alphen L, Tommassen J, van der Ley P. (2002) Expression of foreign LpxA acyltransferases in *Neisseria meningitidis* results in modified lipid A with reduced toxicity and retained adjuvant activity. *Cell Microbiol.* 2002 Sep;4(9):599-611.

[7] EP0011243

[8] Fredriksen et al. (1991) Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelsa": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. *NIPH Ann.* 14(2):67-80

[9] WO2004/019977

[10] US6,558,677

[11] WO2005/004908

- [12] WO2011/036562
 - [13] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
 - [14] Vaccine Design (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 - [15] WO90/14837.
 - [16] Module 1 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Galazka)
 - [17] Lyng (1990) *Biologicals* 18:11-17
 - [18] NIBSC code: 69/017
 - [19] Kuhmlann & Rieger (1995) *Immunol Infect Dis* 5:10-4
 - [20] Sesardic *et al.* (2002) *Biologicals* 30:49-68
 - [21] NIBSC code: 98/552
 - [22] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36
 - [23] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168
 - [24] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii
 - [25] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567
 - [26] EP-A-0477508
 - [27] US patent 5,306,492
 - [28] WO1998/42721
 - [29] *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-
- 114
- [30] Lees *et al.* (1996) *Vaccine* 14:190-198
 - [31] WO1995/08348
 - [32] WO1998/42721
 - [33] US patent 4,882,317
 - [34] US patent 4,695,624
 - [35] EP-B-0477508
 - [36] *Mol. Immunol.* 1985, **22**, 907-919
 - [37] EP-A-0208375
 - [38] WO2000/10599
 - [39] Geveer *et al.* (1979) *Med. Microbiol. Immunol.* 165:171-288
 - [40] US patent 4,057,685
 - [41] US patent 4,673,574

- [42] US patent 4,761,283;
- [43] US patent 4,808,700
- [44] US patent 4,459,286
- [45] US patent 4,965,338
- [46] US patent 4,663,160
- [47] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002)
- [48] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238
- [49] Anderson *et al.* (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59
- [50] Kanra *et al.* (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427
- [51] Ravenscroft *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 35-47
- [52] WO96/40242
- [53] Verez-Bencomo V, Fernández-Santana V, Hardy E, Toledo ME, Rodríguez MC, Heynngnezz L, Rodriguez A, Baly A, Herrera L, Izquierdo M, Villar A, Valdés Y, Cosme K, Deler ML, Montane M, Garcia E, Ramos A, Aguilar A, Medina E, Toraño G, Sosa I, Hernandez I, Martínez R, Muzachio A, Carmenates A, Costa L, Cardoso F, Campa C, Diaz M, Roy R. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science*. 2004 Jul 23;305(5683):522-5.
- [54] WO2018/020046
- [55] Vanlandschoot *et al.* (2005) *J Gen Virol* 86:323-31
- [56] WO2007/054820
- [57] WO2003/066094
- [58] Module 6 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Robertson)
- [59] WO2008/028956
- [60] WO2008/028957
- [61] Liao *et al.* (2012) *J Infect Dis.* 205:237-43
- [62] Stibitz S, Black W, Falkow S. The construction of a cloning vector designed for gene replacement in *Bordetella pertussis*. *Gene*. 1986;50(1-3):133-140.
- [63] Goffin P, Slock T, Smessaert V, De Rop P, Dehottay P. A versatile, non genetically modified organism (GMO)-based strategy for controlling low-producer mutants in *Bordetella pertussis* cultures using antigenic modulation. *Biotechnol J*. 2015 Aug;10(8):1269-80.

[65] Karbarz M.J., Kalb S.R., Cotter R.J., Raetz C.R. (2003) Expression cloning and biochemical characterization of a *Rhizobium leguminosarum* lipid A 1-phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 278(41):39269-79.

[66] Wang X., Karbarz M.J., McGrath S.C., Cotter R.J., Raetz C.R. (2004) MsbA transporter-dependent lipid A 1-dephosphorylation on the periplasmic surface of the inner membrane: topography of *Francisella novicida* LpxE expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biological*

[67] Wang X., McGrath S.C., Cotter R.J., Raetz C.R. (2006) Expression cloning and periplasmic orientation of the *Francisella novicida* lipid A 4'-phosphatase LpxF. *Journal of Biological Chemistry* 281(14):9321-30.

[68] WO2013/130779

[69] WO2015/179270

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis*, содержащая:

(1) по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит мутацию в положении 170 и/или мутацию в положении 229 по сравнению с SEQ ID NO: 1; и/или

(2) по меньшей мере одну геномную вставку гетерологичного гена LpxD.

2. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по п. 1, содержащая по меньшей мере один геномный ген LpxA, кодирующий белок LpxA, где белок LpxA содержит замену в положении 170 и/или замену в положении 229 по сравнению с SEQ ID NO: 1.

3. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по п. 1 или п. 2, где белок LpxA содержит остаток серина в положении 170 и/или остаток аланина в положении 229 по сравнению с SEQ ID NO: 1.

4. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по п. 3, где белок LpxA содержит (1) остаток серина в положении 170 и (2) остаток аланина в положении 229 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO:1.

5. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по п. 4, содержащая ген LpxA, кодирующий белок LpxA, обладающий по меньшей мере 80%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 или 2.

6. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по п. 4, содержащая ген LpxA, кодирующий белок LpxA, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

7. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из п.п.1-6, где гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, обладающий по меньшей мере 90%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

8. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по п. 6, где гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, обладающий по меньшей мере 95%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

9. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по п. 7, где гетерологичный ген LpxD кодирует белок LpxD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.

10. Рекомбинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из п.п.1-9, где

эндогенный ген *LpxA* инактивирован и/или эндогенный ген *LpxD* инактивирован.

11. Рекombинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из п.п.1-10, продуцирующая липид А, где (1) по меньшей мере 30% ацильных цепей C3' имеют длину от приблизительно C₁₀ до приблизительно C₁₂; и/или (2) по меньшей мере 30% ацильных цепей C2' имеют длину от приблизительно C₁₀ до приблизительно C₁₂; и/или (3) по меньшей мере 30% ацильных цепей C2 имеют длину от приблизительно C₁₀ до приблизительно C₁₂.

12. Рекombинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из п.п.1-11, продуцирующая липид А с пониженной эндотоксической активностью по сравнению с эндотоксической активностью липида А, продуцируемого родительским штаммом, в частности, при измерении с использованием тестов со стимуляцией TLR4 (толл-подобный рецептор 4), в частности тестов со стимуляцией человеческого TLR4.

13. Рекombинантная бактерия *Bordetella pertussis* по любому из п.п.1-12, где кривая роста бактериальной популяции указанных бактерий сопоставима с кривой роста популяции родительского штамма.

14. Выделенная везикула внешней мембраны (OMV), происходящая из рекombинантной бактерии *Bordetella pertussis* по любому из п.п. 1-12, содержащая модифицированный липид А, заключенный в мембрану, где по существу все ацильные цепи C3' липида А имеют длину C₁₀ и/или где по существу все ацильные цепи C2 и C2' липида А имеют длину C₁₂.

15. Выделенная везикула внешней мембраны по п. 13, которая по существу не содержит дермoneкротического токсина и/или которая содержит эндогенный генетически обезвреженный коклюшный анатоксин.

16. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере одну выделенную OMV по любому из пп. 13-15 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

17. Иммуногенная композиция по п. 16, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, состоящей из (1) коклюшного анатоксина (PT), (2) FHA (филаментного гемагглютини́на), (3) пертактина (PRN), (4) FIM2/FIM3 (фимбрий типа 2/ фимбрий типа 3), (5) аденилатциклазы, (6) дифтерийного анатоксина (DT), (7) столбнячного анатоксина (TT), (8) инактивированного вируса полиомиелита (IPV), (9) поверхностного антигена гепатита В и (10) Hib PRP (полирибозилрибитолфосфат *Haemophilus influenzae* типа В).

18. OMV по любому из п.п. 13-15 или иммуногенная композиция по п. 16 или

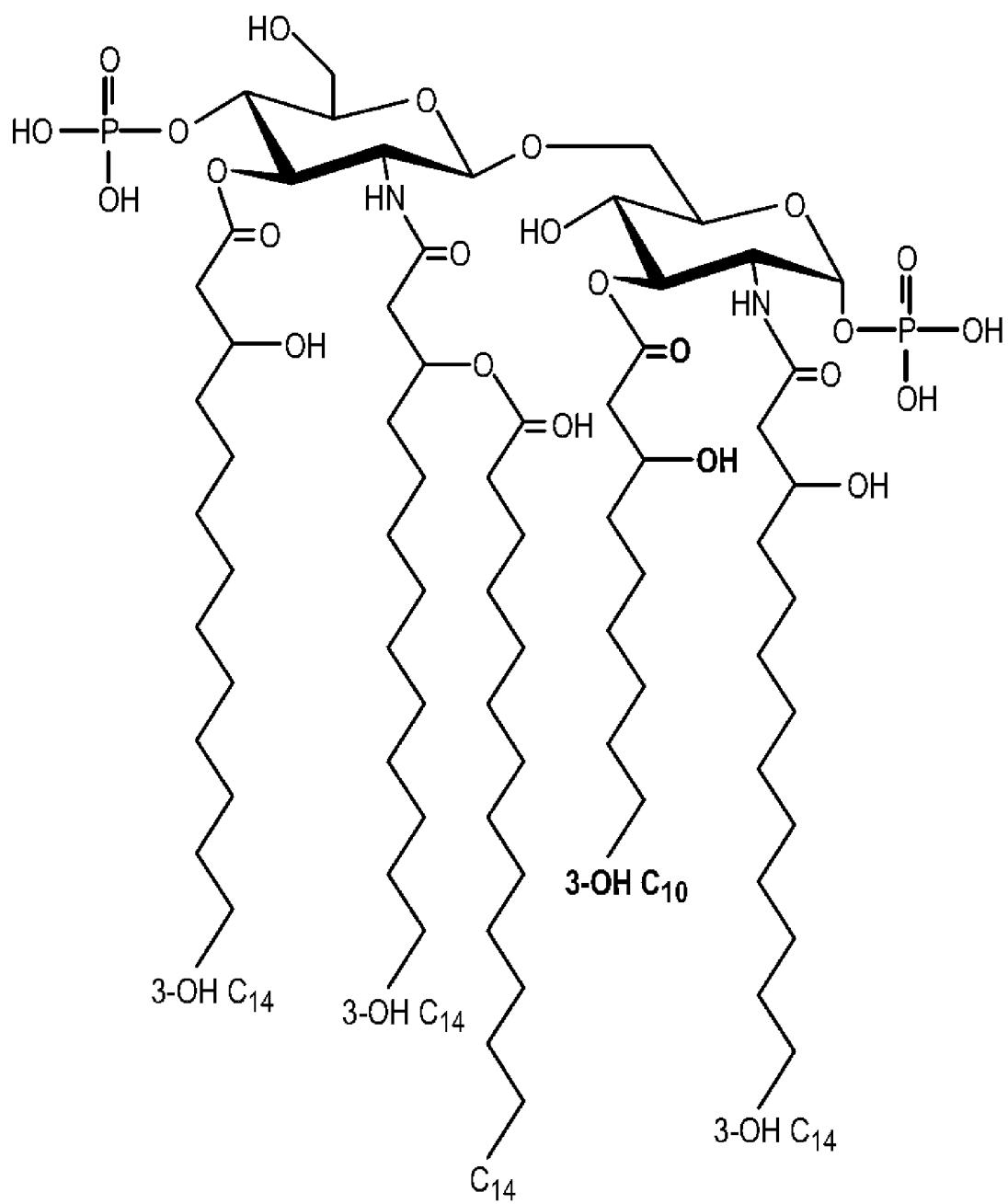
п. 17 для применения в индукции иммунного ответа у подходящего млекопитающего, например человека.

19. OMV по любому из п.п. 13-15 или иммуногенная композиция по п. 16 или п. 17 для применения в профилактике или в качестве вакцины.

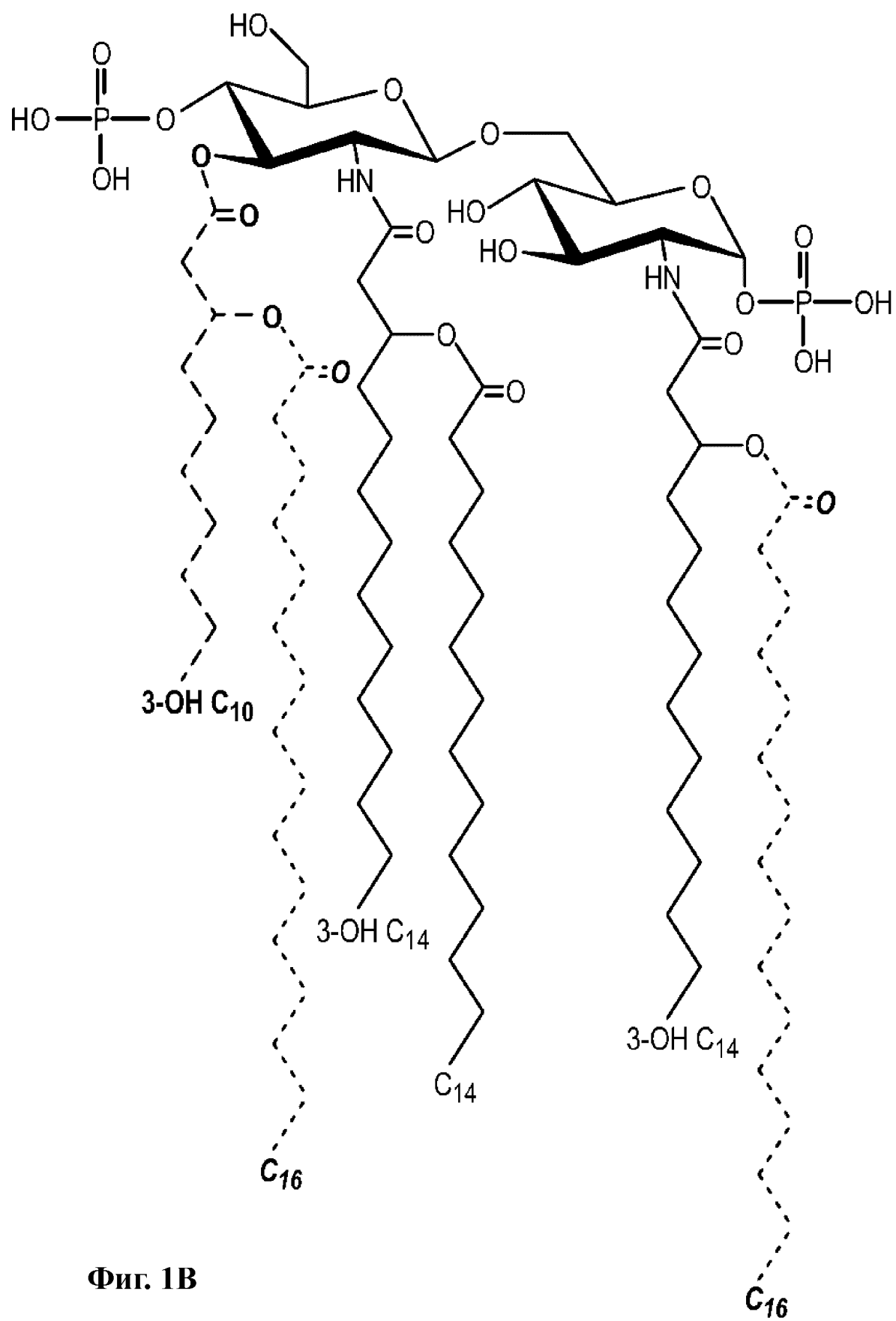
20. Способ модулирования реактогенности липида А бактерии *Bordetella pertussis*, включающий стабильную интеграцию в геном этой бактерии по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из LpxA и LpxD, где:

(1) ген LpxA кодирует белок LpxA, обладающий по меньшей мере 80%-ной идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или 2, и где белок содержит серин в положении 170 (S170) и/или аланин в положении 229 (A229), при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 1 или 2; и/или

(2) ген LpxD кодирует белок LpxD, обладающий по меньшей мере 90%-ной идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 4.



Фиг. 1А



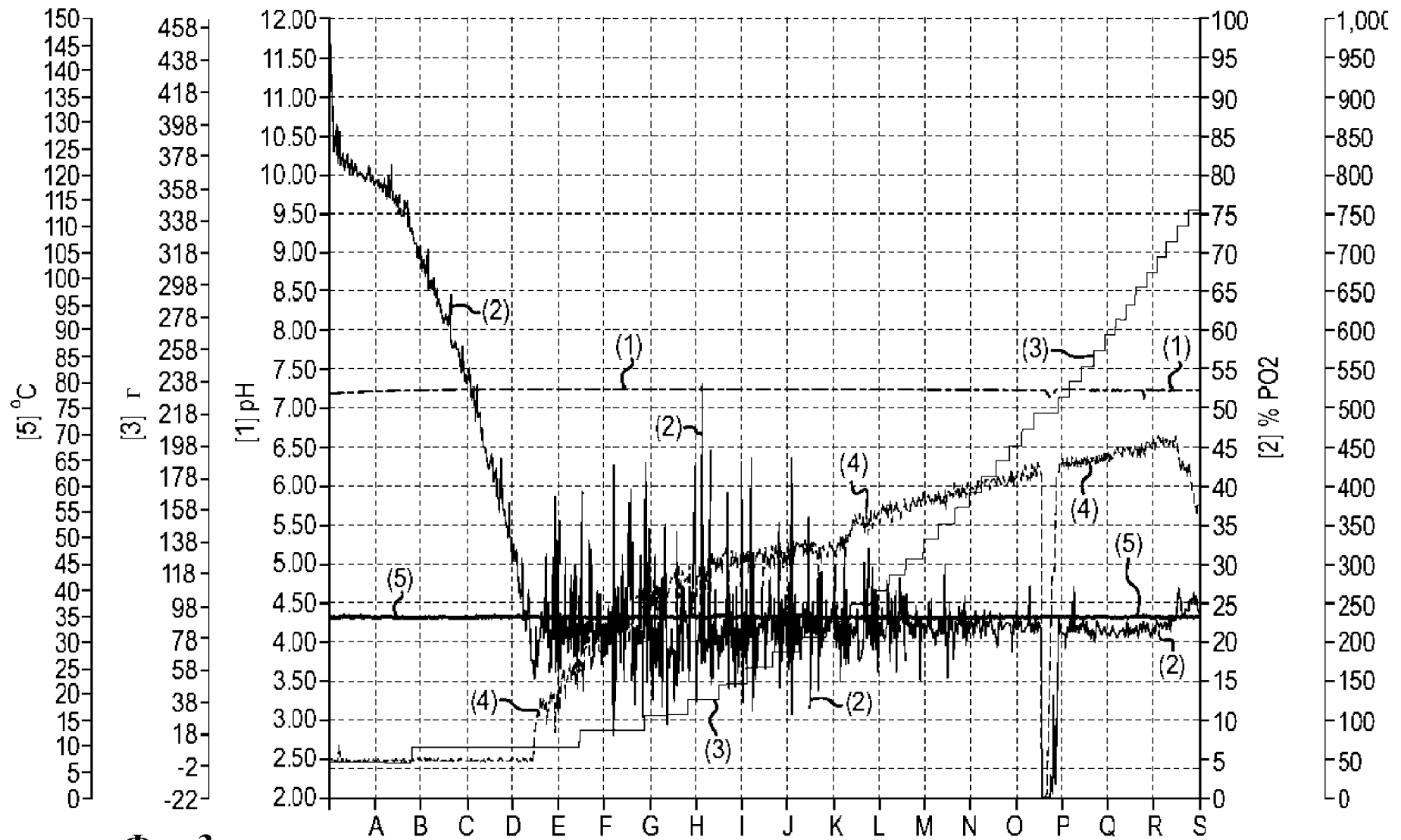
Фиг. 1В

Фиг. 2

		ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ			
		*	3	*	40
		20			
Bpertussis-NP_880173	:	MSGNIHPTAVVDPAAC	IDSSVV	IGPYSVVGF	GVSLAAGTE
Bparapertussis-WP_010928085	:	MSGNIHPTAVVDPAAC	IDSSVV	IGPYSVVGF	GVSLAAGTE
Bbronchiseptica-WP_033475418	:	MSGNIHPTAVVDPAAC	IDSSVV	IGPYSVVGF	GVSLAAGTE
Bhinzii-WP_029581195	:	MSANIHP	TAVVDPAAR	IDSSVT	IGPYSVVGF
Bholmesii-WP_005013906	:	MSANIHP	TAVVDPAAR	IDSSAK	IGPYCVVGF
Bavium-WP_012417415	:	MSANIHP	TAVVDPAAR	IDSTVT	IGPYSVVGF
Btrematum-WP_025515969	:	MSANIHP	TAVVDPAAR	IDSSVI	IGPYSVVGF
		*	100	*	120
Bpertussis-NP_880173	:	VREFTTFNTGTVQDGGV	TSIGDDNW	IMAYVHIAHDCHI	IGN
Bparapertussis-WP_010928085	:	VREFTTFNTGTVQDGGV	TSIGDDNW	IMAYVHIAHDCHI	IGN
Bbronchiseptica-WP_033475418	:	VREFTTFNTGTVQDGGV	TSIGDDNW	IMAYVHIAHDCHI	IGN
Bhinzii-WP_029581195	:	VREFTTFNTGTVQDGGV	TTLGNDNW	IMAYVHIAHDCHI	IGS
Bholmesii-WP_005013906	:	VREFTTFNTGTVQDGGV	TTVCNDNW	IMAYVHIAHDCHI	IAN
Bavium-WP_012417415	:	VREFTTFNTGTVQDGG	LTITGNDNW	IMAYVHIAHDCHI	IGN
Btrematum-WP_025515969	:	VREFTTFNTGTVQDGG	ATTVGDDNW	IMAYVHIAHDCHI	IAS
		180	*	200	*
Bpertussis-NP_880173	:	DAPPEFVLAAGNPCR	PVG	NVEGLKRRGF	SAAAI
Bparapertussis-WP_010928085	:	DAPPEFVLAAGNPCR	PVG	NVEGLKRRGF	SAAAI
Bbronchiseptica-WP_033475418	:	DAPPEFVLAAGNPCR	PVG	NVEGLKRRGF	SAAAI
Bhinzii-WP_029581195	:	DTPPYVLSAGNPCR	PVG	INVEGLKRRGF	SPASISALREAY
Bholmesii-WP_005013906	:	DTPPYVLSAGNPCR	PVG	NVEGLKRRGF	SPASISALREAY
Bavium-WP_012417415	:	DTPPYVLSAGNPCR	PVG	INVEGLKRRGF	SPASISALREAY
Btrematum-WP_025515969	:	DAPPEFVLSAGNPCR	PVG	INVEGLKRRGF	SPASISALREAY

	*	60	*	80	
VG	AH	CV	LD	GV	TS
IG	RD	NR	FY	RF	CS
IG	MP	QD	KK	YS	SG
EP	TRL	VIG	DR	NT	:
88					
VG	AH	CV	LD	GV	TS
IG	RD	NR	FY	RF	CS
IG	MP	QD	KK	YS	SG
EP	TRL	VIG	DR	NT	:
88					
VG	AH	CV	LD	GV	TS
IG	RD	NR	FY	RF	CS
IG	MP	QD	KK	YS	SG
EP	TRL	VIG	DR	NT	:
88					
IG	PH	CV	LD	GV	TT
IG	RD	NR	FY	RF	CS
IG	MP	QD	KK	YA	GE
AT	RL	VIG	DR	NT	:
88					
IG	PH	CV	LD	GV	TT
IG	RD	NR	FY	RF	CS
IG	MP	QD	KK	YA	GE
EP	TRL	VIG	DR	NT	:
88					
IG	PH	CV	LD	GV	TT
IG	RD	NR	FY	RF	CS
IG	MP	QD	KK	YA	GE
EP	TRL	VIG	DR	NT	:
88					
	*	140	*	160	*
NT	IL	AN	SV	QL	GG
HV	QV	GD	WA	IV	GG
LT	GV	HQ	FA	KI	GA
HS	MT	GG	NS	SL	MQ
:	176				
NT	IL	AN	SV	QL	GG
HV	QV	GD	WA	IV	GG
LT	GV	HQ	FA	KI	GA
HS	MT	GG	NS	SL	MQ
:	176				
NT	IL	AN	SV	QL	GG
HV	QV	GD	WA	IV	GG
LT	GV	HQ	FA	KI	GA
HS	MT	GG	NS	SL	MQ
:	176				
NT	IL	AN	SV	QL	GG
HV	QV	GD	WA	IV	GG
LT	GV	HQ	FA	KI	GA
HS	MT	GG	NS	SL	MQ
:	176				
NT	IL	AN	SV	QL	GG
HV	QV	GD	WA	IV	GG
LT	GV	HQ	FA	KI	GA
HS	MT	GG	NS	SL	MQ
:	176				
NT	IL	AN	SV	QL	GG
HV	QV	GD	WA	IV	GG
LT	GV	HQ	FA	KI	GA
HS	MT	GG	NS	SL	MQ
:	176				
NT	IL	AN	SV	QL	GG
HV	QV	GD	WA	IV	GG
LT	GV	HQ	FA	KI	GA
HS	MT	GG	NS	SL	MQ
:	176				
NT	IL	AN	SV	QL	GG
HV	QV	GD	WA	IV	GG
LT	GV	HQ	FA	KI	GA
HS	MT	GG	NS	SL	MQ
:	176				
	220	*	240	*	260
KS	IY	RR	GL	SL	DE
GR	AE	LR	AR	QQ	AE
PD	VA	EH	LQ	TM	LD
FL	DA	STR	GI	IR	:
264					
KS	IY	RR	GL	SL	DE
GR	AE	LR	AR	QQ	AE
PD	VA	EH	LQ	TM	LD
FL	DA	STR	GI	IR	:
264					
KS	IY	RR	GL	SL	DE
GR	AE	LR	AR	QQ	AE
PD	VA	EH	LQ	TM	LD
FL	DA	STR	GI	IR	:
264					
KI	LY	RR	GL	AL	DE
AR	AE	LR	AR	QQ	SE
PD	VA	EV	LQ	VL	LD
FL	DA	SN	RG	IR	:
264					
KI	LY	RR	GL	SL	EE
AR	AE	LR	VR	QQ	AE
PE	VA	AD	LQ	VL	LD
FL	DA	VS	NR	GI	IR
:	264				
KI	LY	RR	GL	AL	EE
AR	AE	LR	AR	QQ	AE
PE	VA	EA	AE	LQ	VM
LD	FL	DA	VS	SR	GI
IR	:	264			
KI	LY	RR	GL	TL	DQ
AR	AE	LR	ER	QQ	EE
VA	AG	PL	QV	IL	LD
FL	DA	SN	RG	IR	:
264					

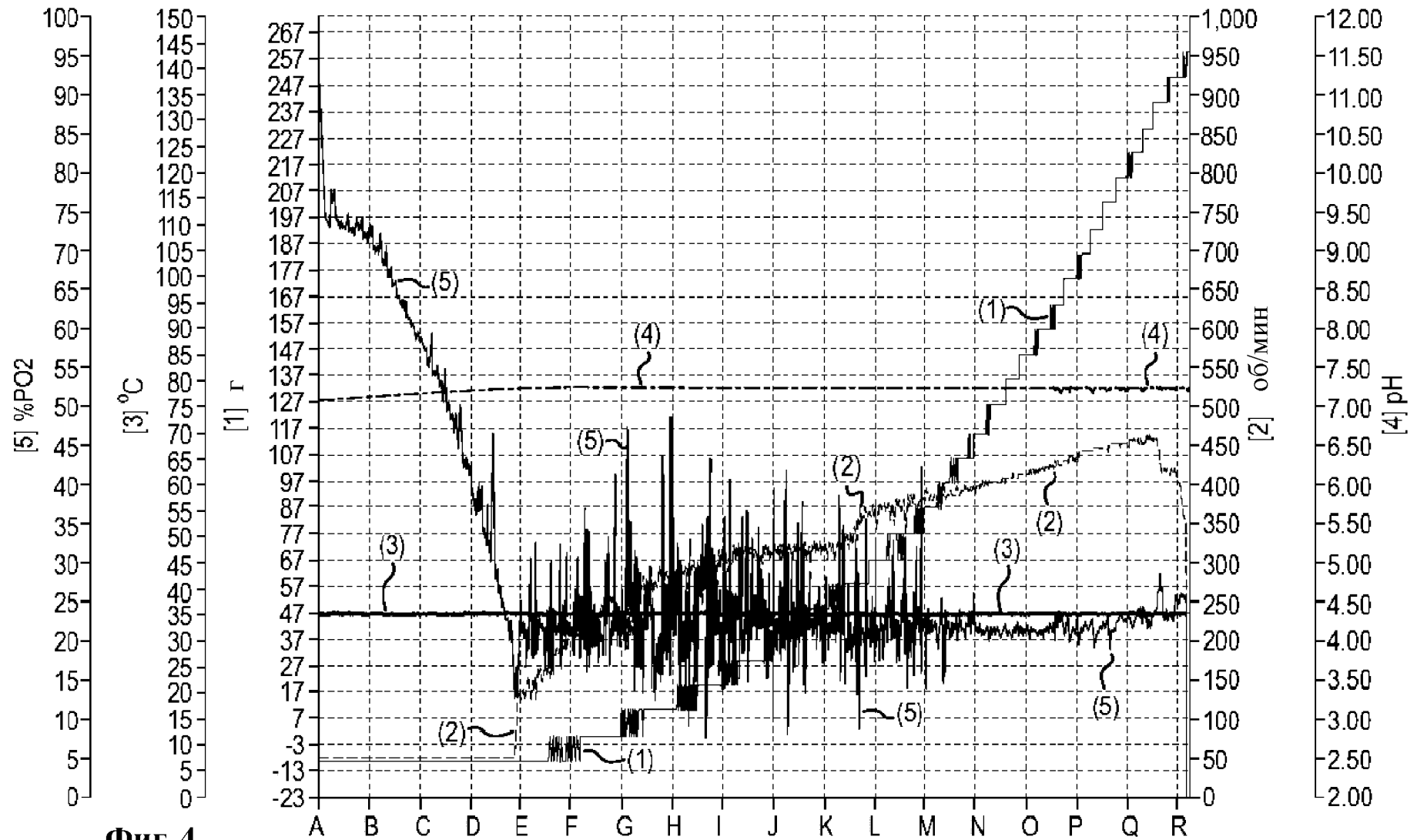
Фиг. 2 (продолж)



Фиг. 3

Ключевые			
(1) -----	[1] pH - Ferm03_AT103\PV: Ferm03 измерение pH	(2) ———	[2]% PO2 - Ferm03_AT104\PV: Ferm03 измерение PO2
(3) ———	[3] gr - Ferm03_PdsConsAcid: Вес потребление кислорода	(4) -----	[4] rpm - Ferm03_ST105\PV: Ferm03 измерение скорости
(5) ———	[5] °C - Ferm03_TE101\PV: Ferm03 измерение температуры t		
A: 29 АВГ 2018 11:00:00 B: 29 АВГ 2018 13:00:00 C: 29 АВГ 2018 15:00:00 D: 29 АВГ 2018 17:00:00 E: 29 АВГ 2018 19:00:00 F: 29 АВГ 2018 21:00:00 G: 29 АВГ 2018 23:00:00 H: 30 АВГ 2018 01:00:00 I: 30 АВГ 2018 03:00:00 J: 30 АВГ 2018 05:00:00 K: 30 АВГ 2018 07:00:00 L: 30 АВГ 2018 09:00:00 M: 30 АВГ 2018 11:00:00 N: 30 АВГ 2018 13:00:00 N: 30 АВГ 2018 15:00:00 P: 30 АВГ 2018 17:00:00 Q: 30 АВГ 2018 19:00:00 R: 30 АВГ 2018 21:00:00 S: 30 АВГ 2018 23:00:00			

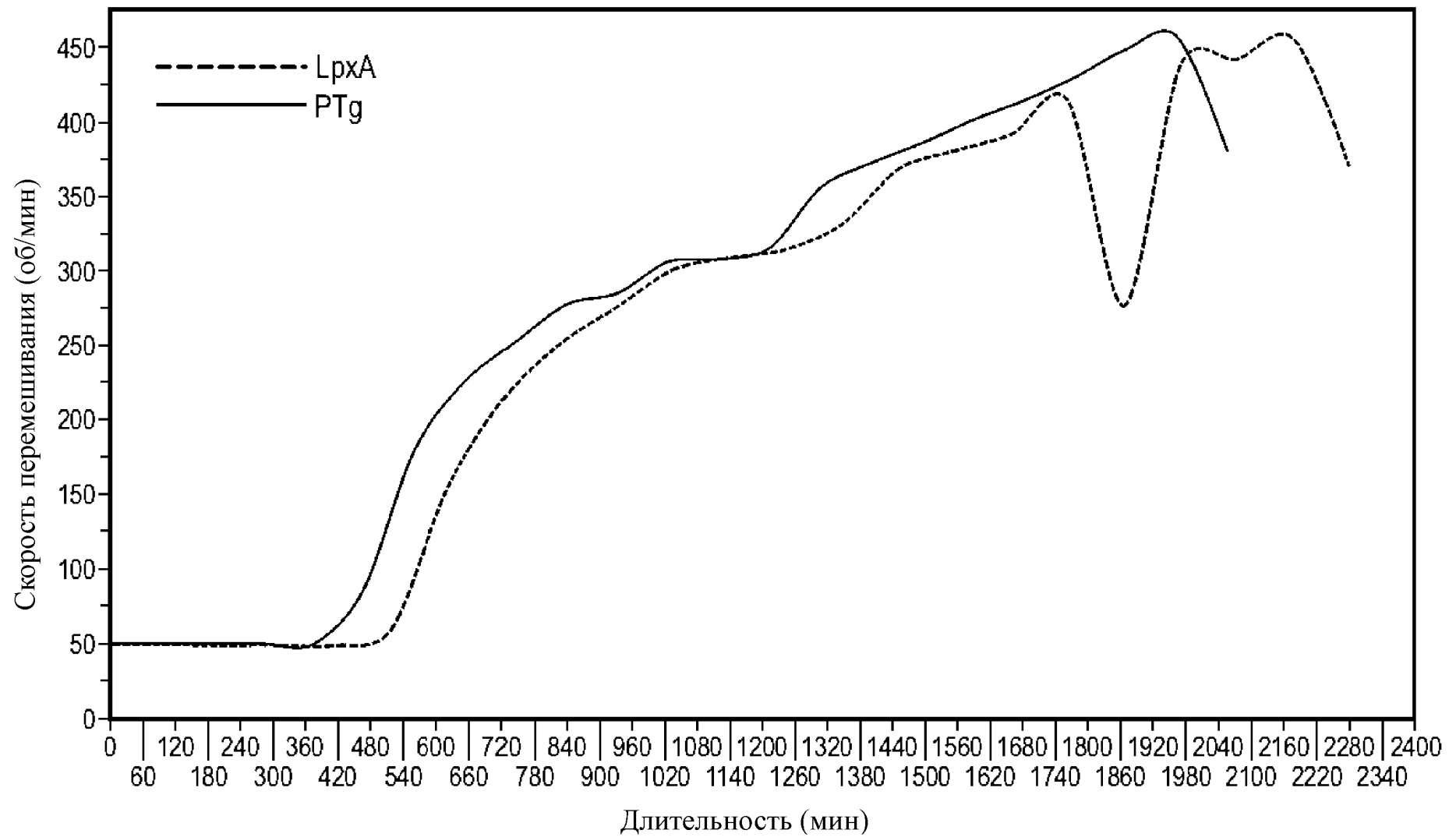
Фиг. 3 (продолж)



Фиг. 4

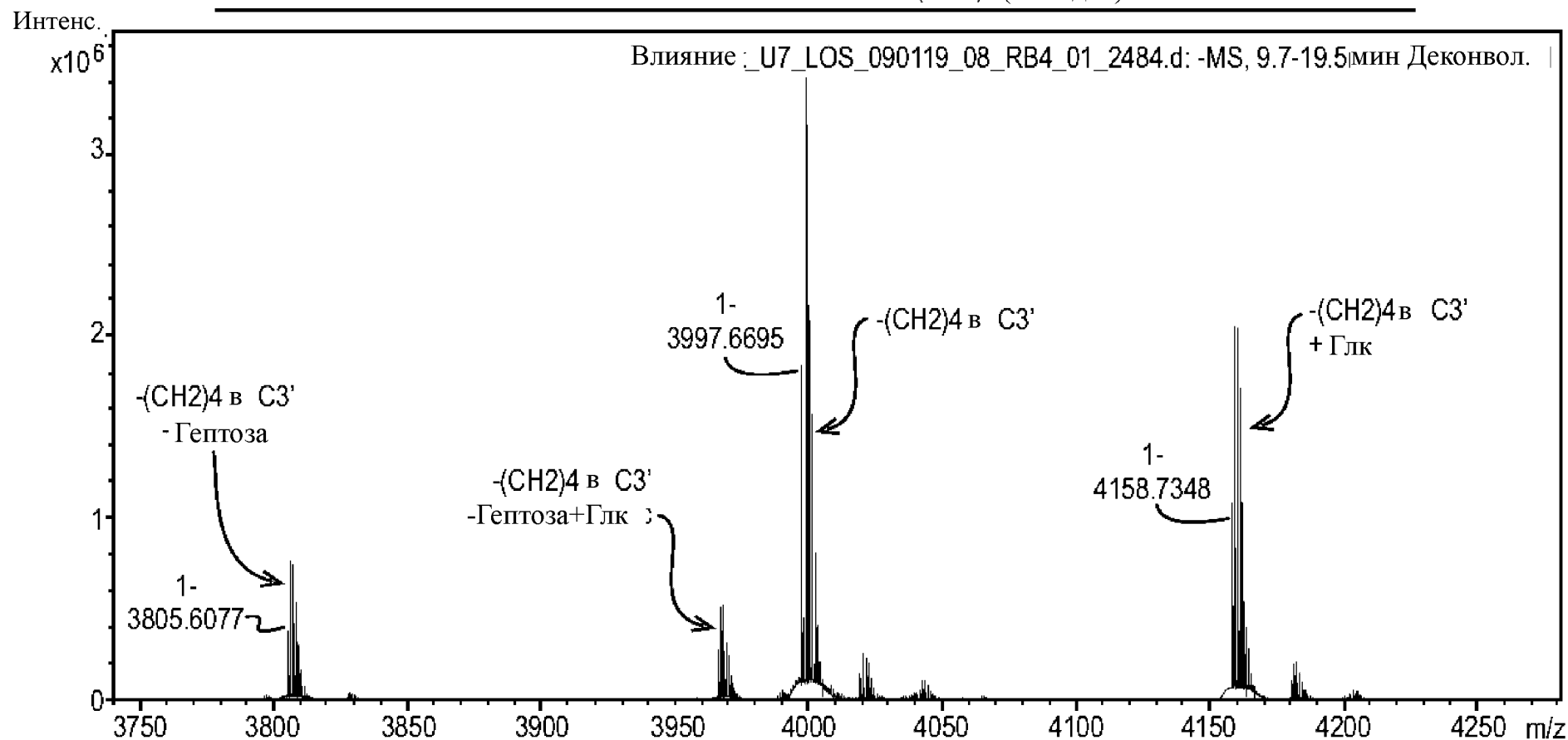
Ключевые			
(1) —————	[1] gr - Ferm02_PdsConsAcid: Вес потребление кислорода	(2) -----	[2] rpm - Ferm02_ST105\PV: Ferm02 измерение скорости
(3) —————	[3] °C - Ferm02_TE101\PV: Ferm02 измерение температуры	(4) -----	[4] pH - Ferm02_AT103\PV: Ferm02 измерение pH
(5) —————	[5]% PO2 - Ferm02_AT104\PV: Ferm02 измерение PO2		
A: 07 Ноя 2018 10:46:57 B: 07 Ноя 2018 12:46:57 C: 07 Ноя 2018 14:46:57 D: 07 Ноя 2018 16:46:57 E: 07 Ноя 2018 18:46:57 F: 07 Ноя 2018 20:46:57 G: 07 Ноя 2018 22:46:57 H: 08 Ноя 2018 00:46:57 I: 08 Ноя 2018 02:46:57 J: 08 Ноя 2018 04:46:57 K: 08 Ноя 2018 06:46:57 L: 08 Ноя 2018 08:46:57 M: 07 Ноя 2018 10:46:57 N: 07 Ноя 2018 12:46:57 N: 07 Ноя 2018 14:46:57 P: 08 Ноя 2018 16:46:57 Q: 08 Ноя 2018 18:46:57 R: 08 Ноя 2018 20:46:57			

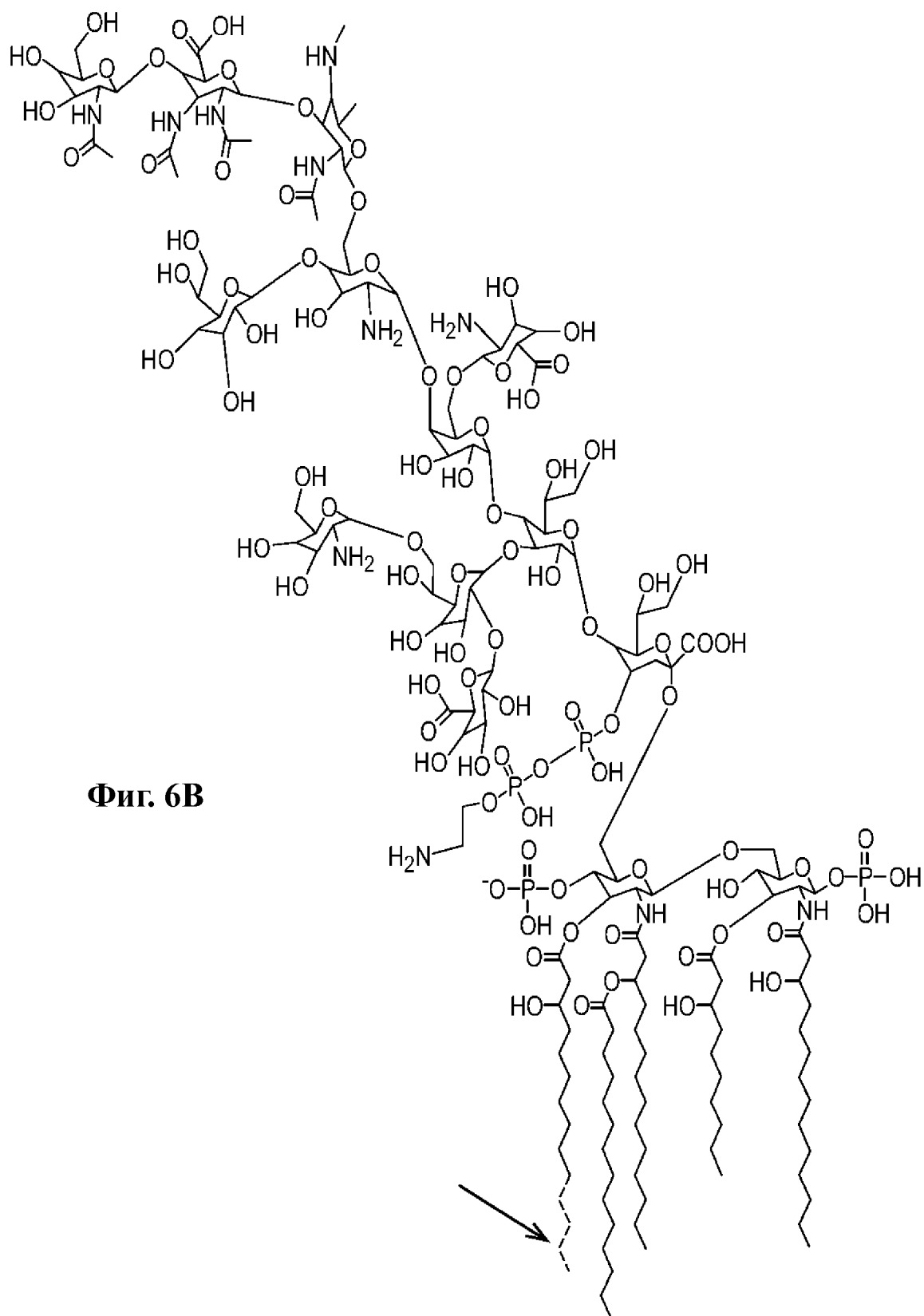
Фиг. 4 (продолж)

Фиг. 5 Скорость перемешивания (об/мин) в зависимости от длительности (мин)

Фиг. 6А

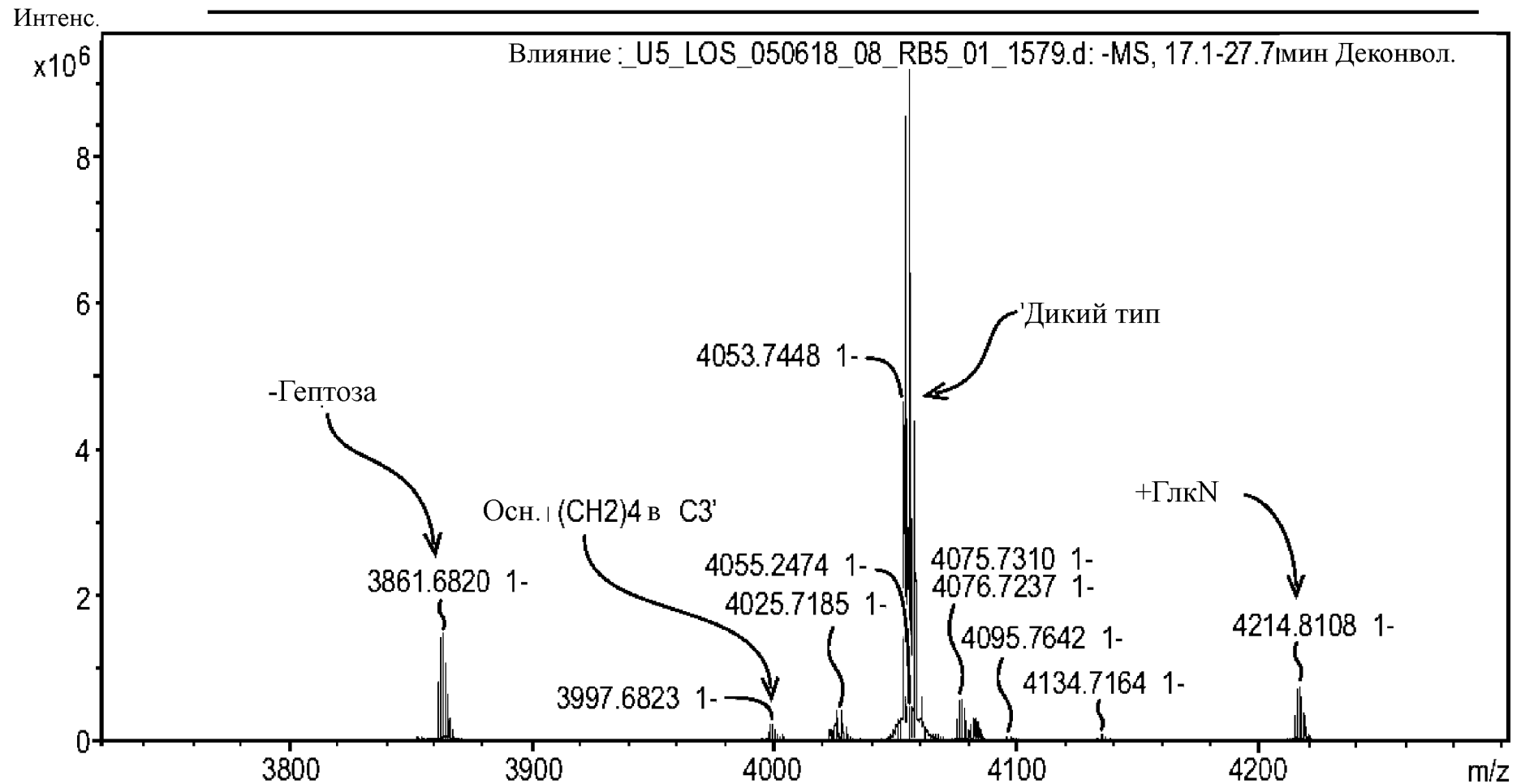
Измер. моно. [M-H]-	Теор. моно. [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
3997.6695	3997.6944	-6.2	-(CH ₂) ₄ (липид А)	100.0
4158.7348	4158.7632	-6.8	+GlcN - (CH ₂) ₄ (липид А)	63.5
3805.6077	3805.631	-6.1	-(CH ₂) ₄ (липид А)-Гептоза	30.8
3966.6718	3966.6998	-7.1	-(CH ₂) ₄ (липид А)+ГлкN-Гепт	22.5

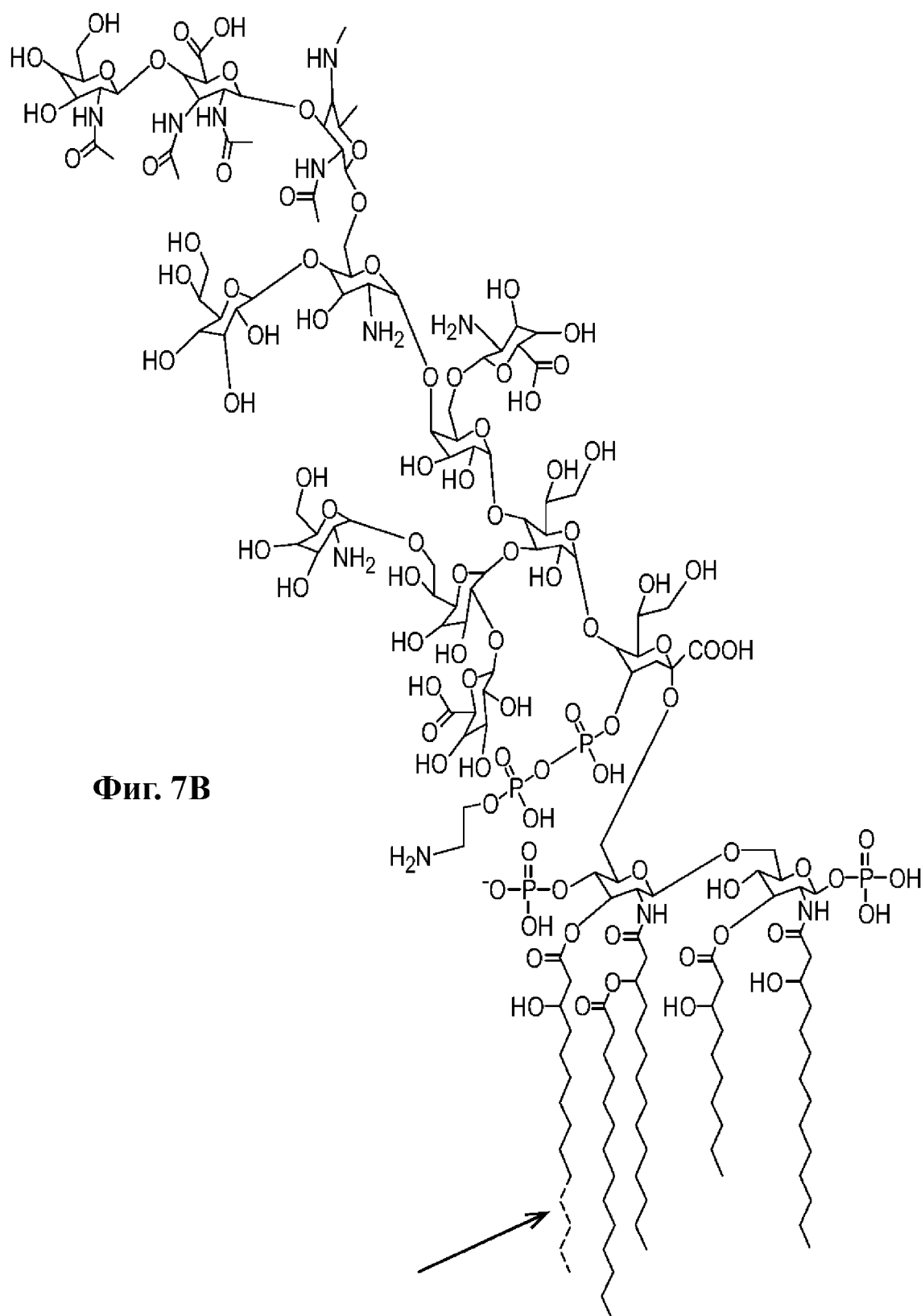


**Фиг. 6В**

Точная масса: 4053.7570

	Измер. моно. [M-H]-	Теор. моно [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
Фиг. 7А	4053.7419	4053.7570	-3.7	N/A(референс)	100.0
	3861.6785	3861.6936	-3.9	-Гептоза	26.3
	4214.8080	4214.8258	-4.2	+ГлкN	10.5

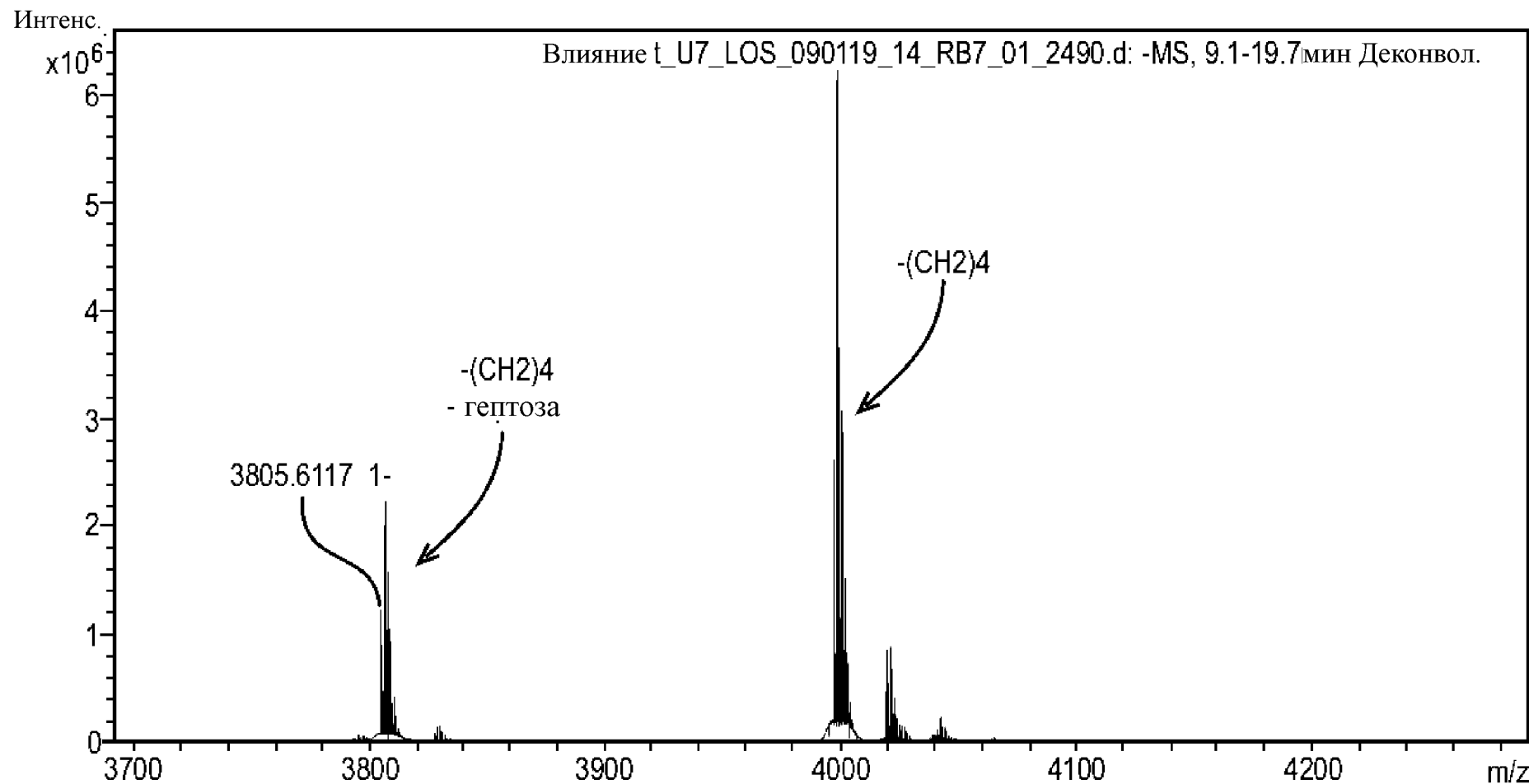


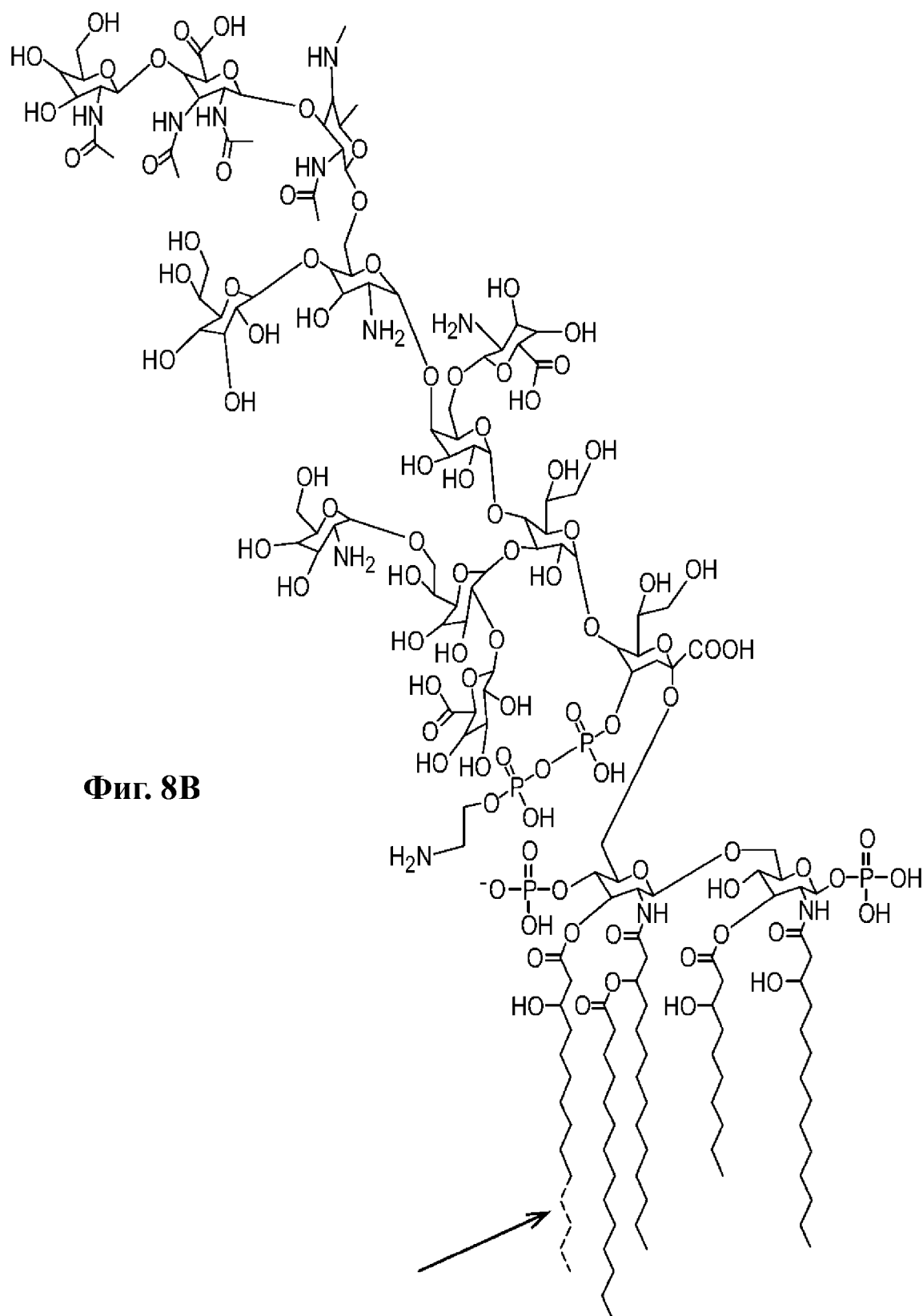


Фиг. 7В

Точная масса: 4053.7570

	Измер. монол. [M-H]-	Теор. моно . [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
Фиг. 8А	3997.672	3997.6944	-5.6	-(CH ₂) ₄ (липид А)	100.0
	3805.6117	3805.631	-5.1	-(CH ₂) ₄ (липид А)-Гептоза	34.6





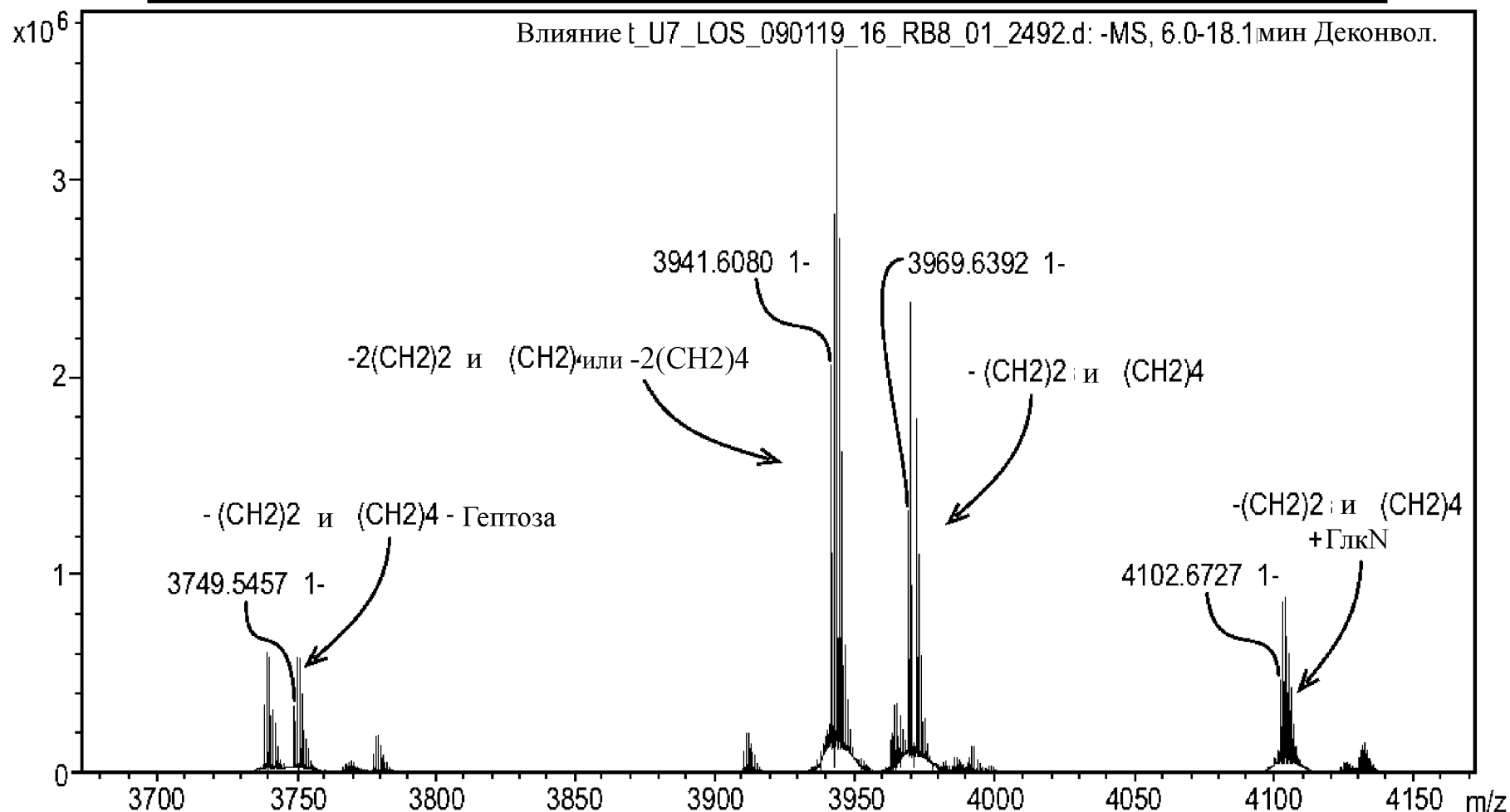
Фиг. 8В

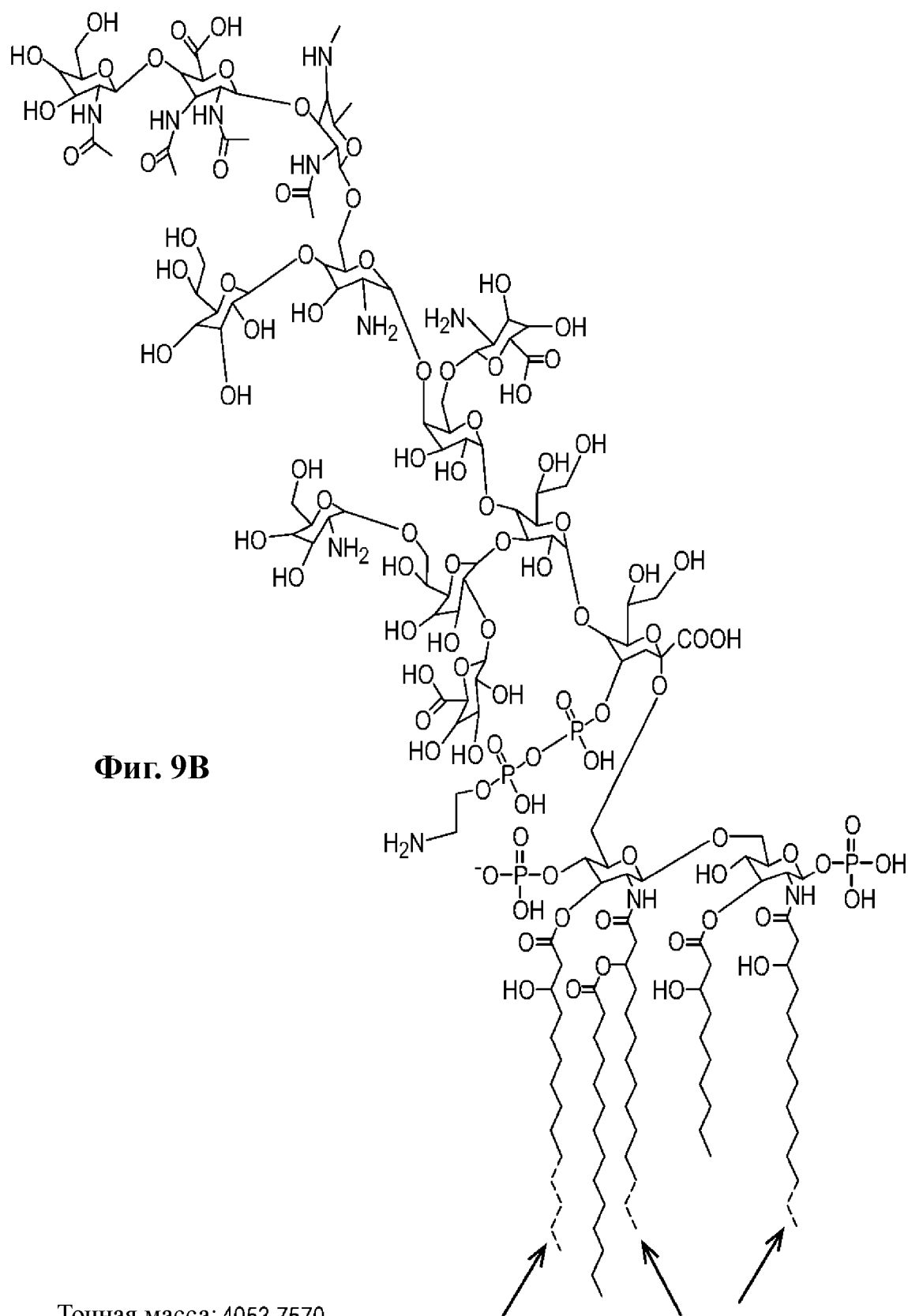
Точная масса: 4053.7570

Фиг. 9А

Измер. моно. [M-H]-	Теор. моно. [M-H]-	Ош. (ц/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
3941.608	3941.6318	-6.0	-2(CH ₂) ₂ и -(CH ₂) ₄ (липид А)	100.0
3969.6392	3969.6631	-6.0	-(CH ₂) ₂ и (CH ₂) ₄ (липид А)	68.1
3749.5457	3749.5684	-6.1	-2(CH ₂) ₂ и -(CH ₂) ₄ - Гептоза	28.2
4102.6727	4102.7006	-6.8	-2(CH ₂) ₂ и -(CH ₂) ₄ + ГлкN	27.3

Интенс.

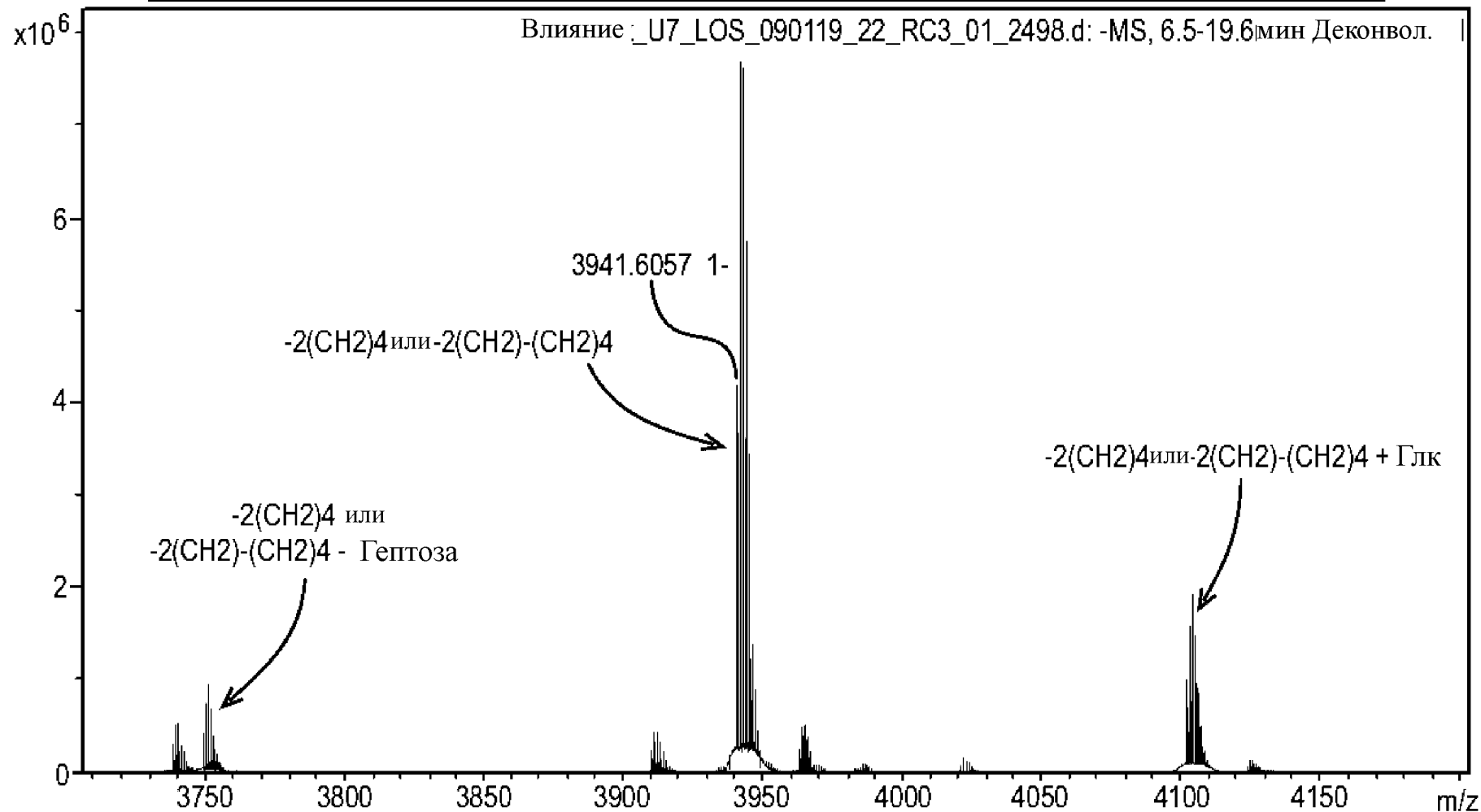


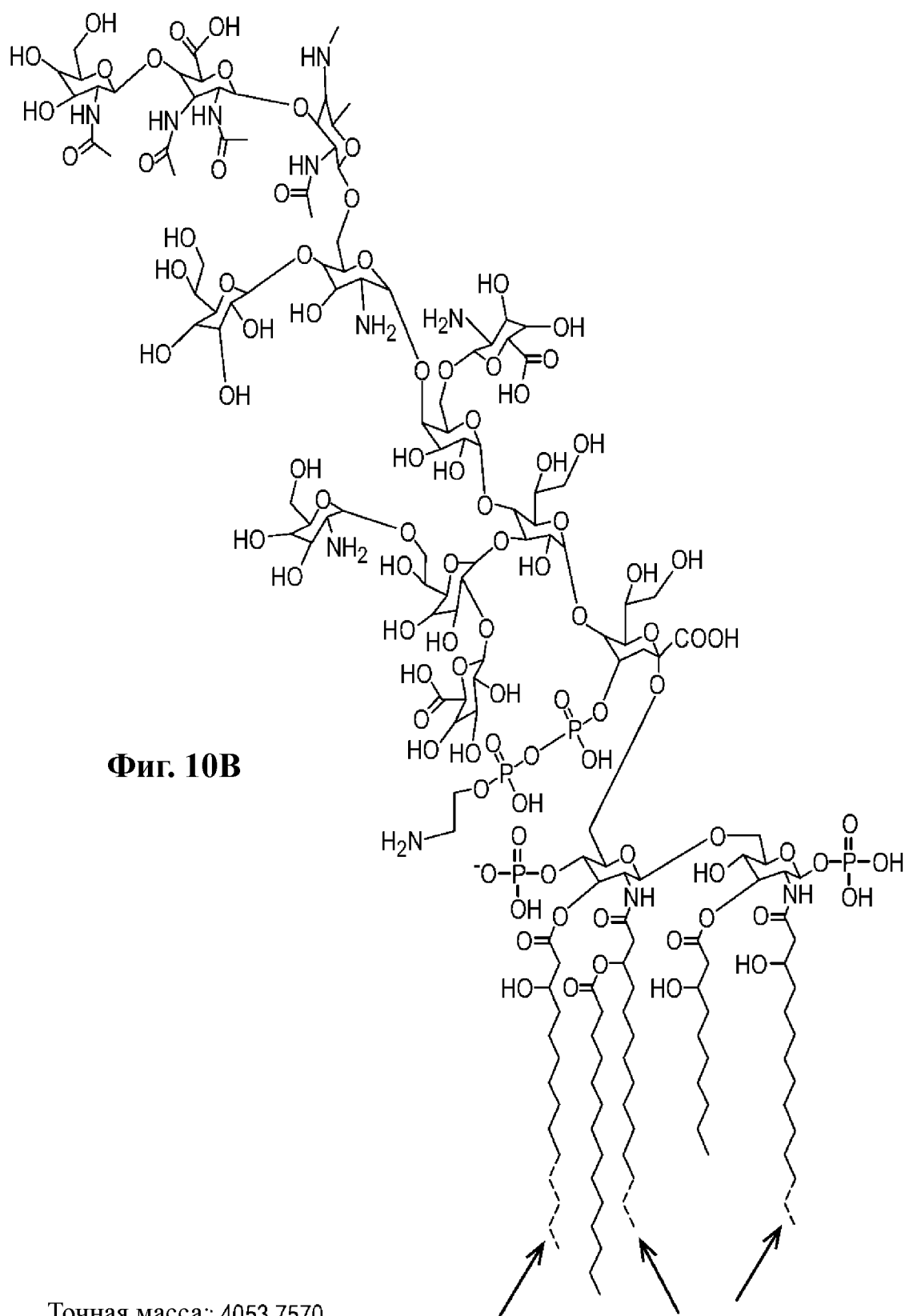


Измер. моно. [M-H]-	Теор. моно. [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
---------------------	--------------------	-------------	-----------	-------------

Фиг. 10А	3941.6057	3941.6318	-6.6	-2(CH ₂) ₂ и 1-(CH ₂) ₄ (липид А)	100.0
	4102.6725	4102.7006	-6.8	-2(CH ₂) ₂ и 1-(CH ₂) ₄ + ГлкN	27.2
	3749.544	3749.5684	-6.5	-2(CH ₂) ₂ и 1-(CH ₂) ₄ - Гептоза	20.6

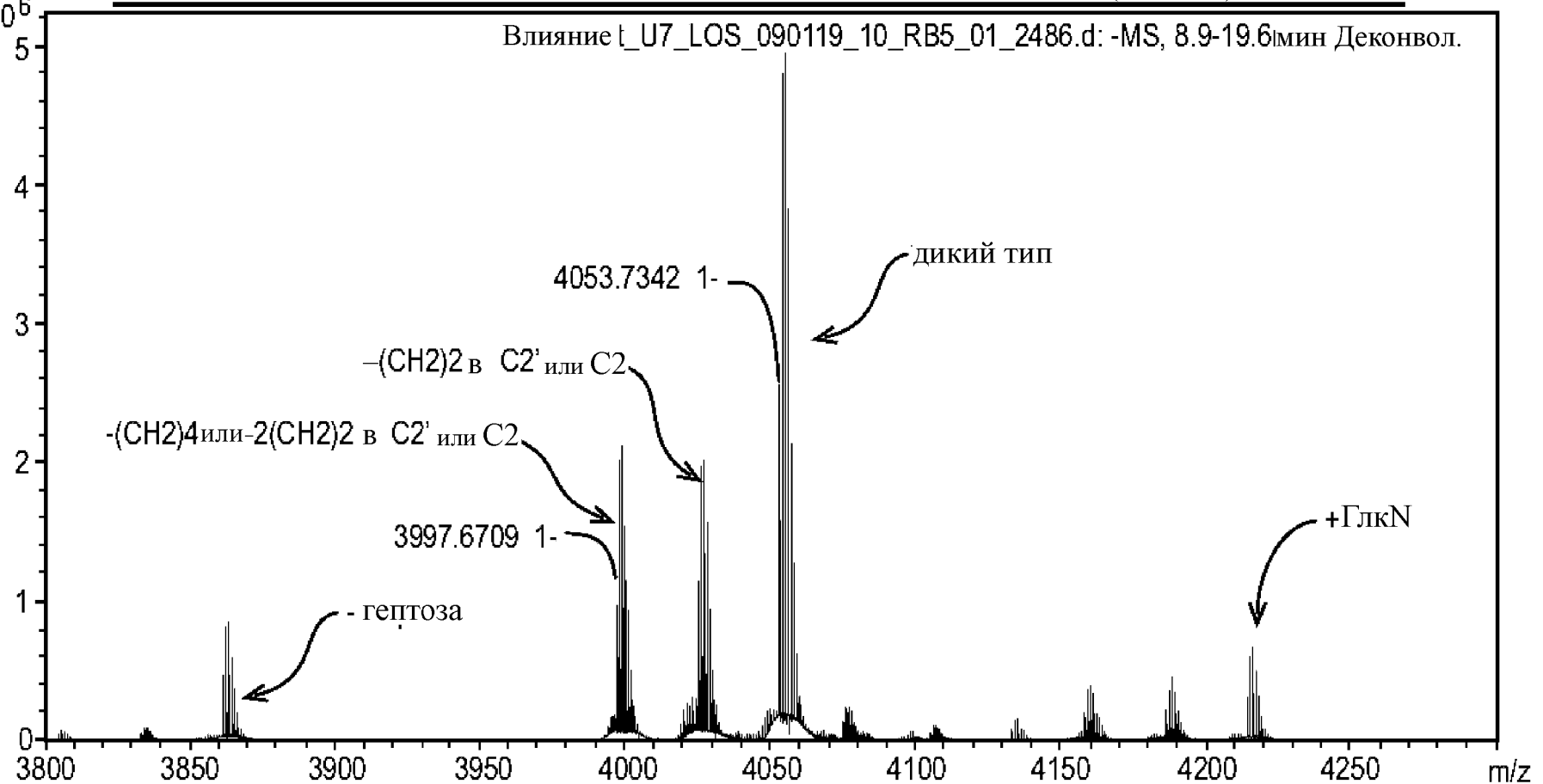
Интенс.

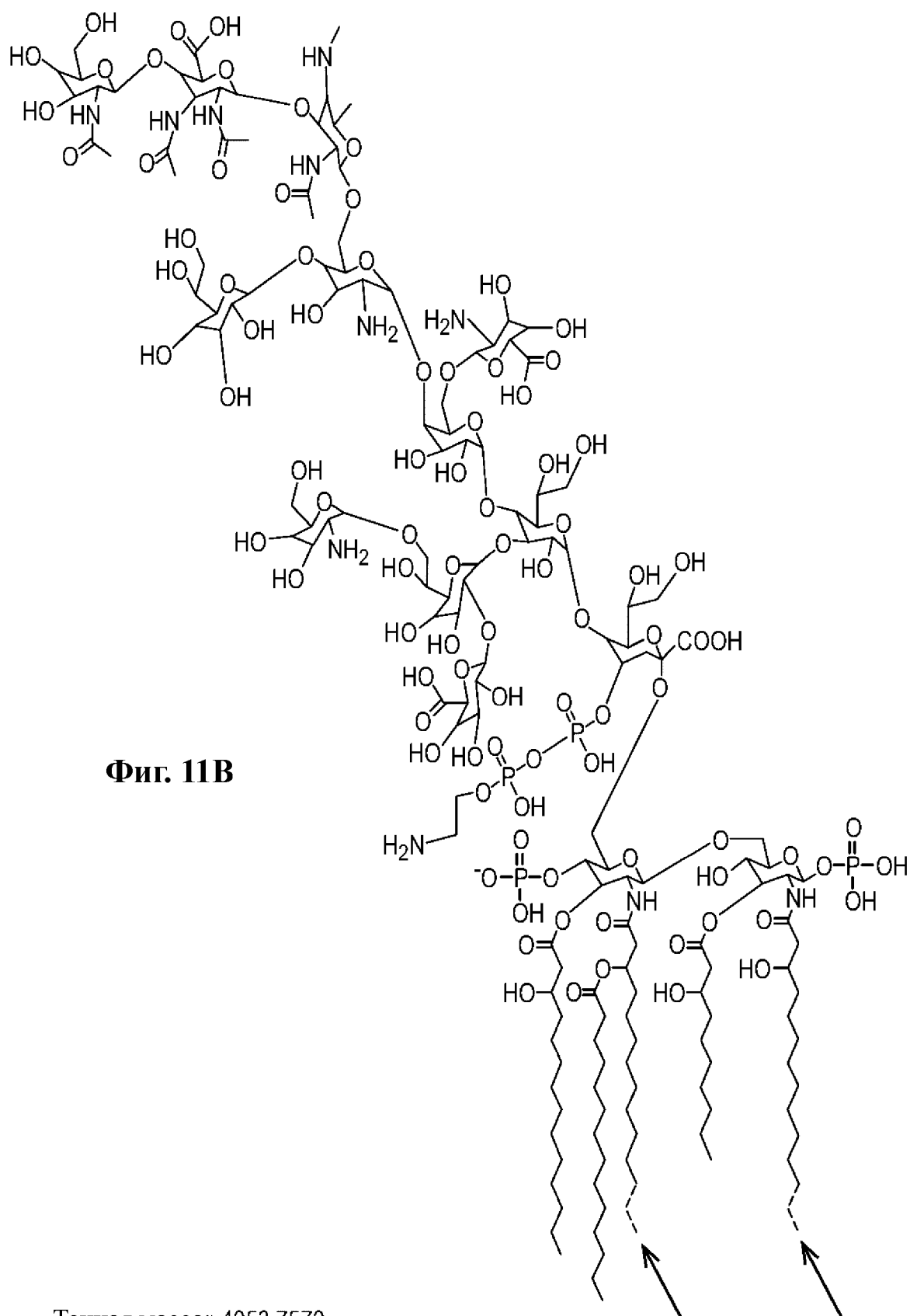




Фиг. 11А	Измер. моно. [M-H]-	Теор. моно. [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
	4053.7342	4053.7570	-5.6	N/A (референс)	100.0
	3997.6709	3997.6944	-5.9	-(CH ₂) ₂ или (CH ₂) ₄ (липид А)	49.0
	3861.6721	3861.6936	-5.6	- Гептоза	42.3
	4025.7004	4025.7257	-6.3	-2(CH ₂) ₂ (липид А)	18.3
	4214.8014	4214.8258	-5.8	+ ГлкN	17.7
	4186.7680	4186.7945	-6.3	+ GlcN - (CH ₂) ₂ (липид А)	12.8
	4158.732	4158.7632	-7.5	+ GlcN - 2(CH ₂) ₂ (липид А)	12.9

Интенс.

x10⁶

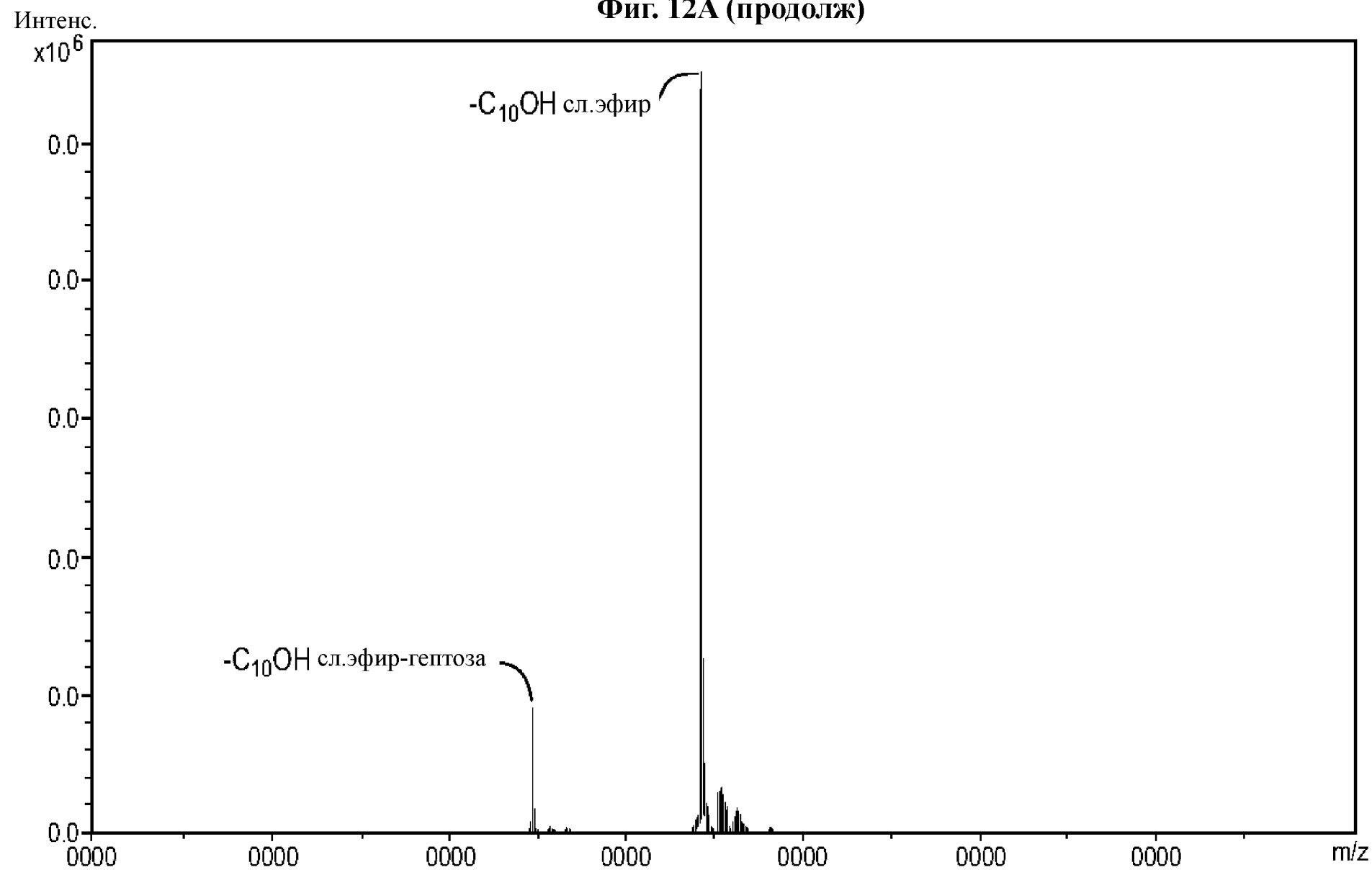


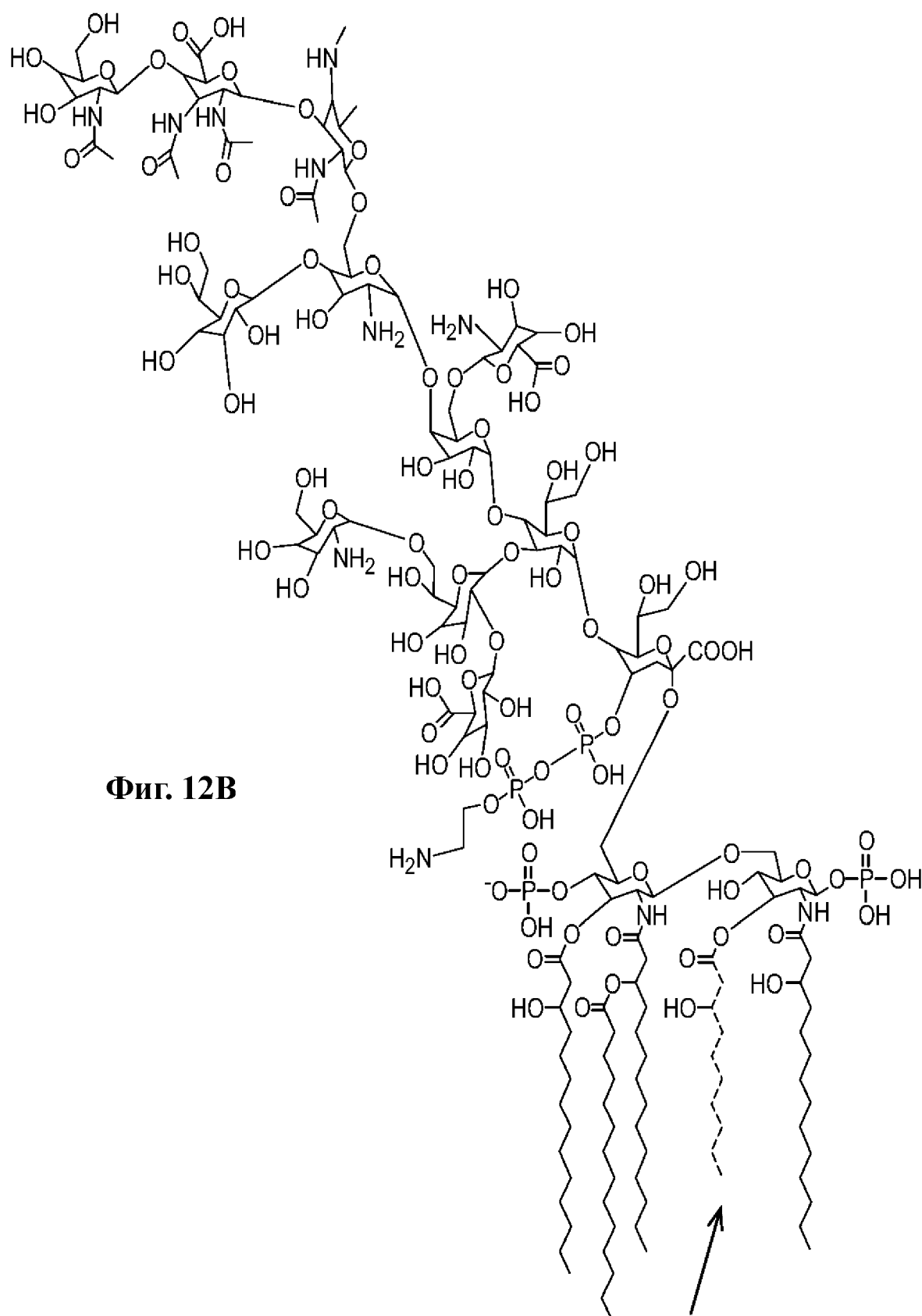
Измер. моно [M-H]-	Модификации	Теор. моно [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
*	Н/П (референс)	4053.7570		A	0.0
*	-PPEA	3850.7822		B	0.0
*	-C ₁₄ ОН эфир	3827.5637		C	0.0
*	-PPEA, -C ₁₄ ОН эфир	3624.5889		D	0.0
*	-Гептоза	3861.6936		E	0.0
3883.5992	-C ₁₀ ОН эфир	3883.6263	-7.0	F	100.0
*	-PEA	3930.7485		G	0.0
*	-(CH ₂) ₂ (липид A)	4025.7257		H	0.0
*	+(CH ₂) ₂ (липид A)	4081.7883		I	0.0
*	+(CH ₂) ₄ (липид A)	4109.8196		J	0.0
*	+ГлкN	4214.8258		K	0.0
*	-(GlcNAcManXFucX)	3392.4764		L	0.0
*	-(GlcNAcManXFucX), -PPEA	3189.5015		M	0.0
3691.5368	-C ₁₀ ОН эфир, Гептоза	3691.5630	-7.1	N	17.0

* Не определялось

Фиг. 12А

Фиг. 12А (продолж)





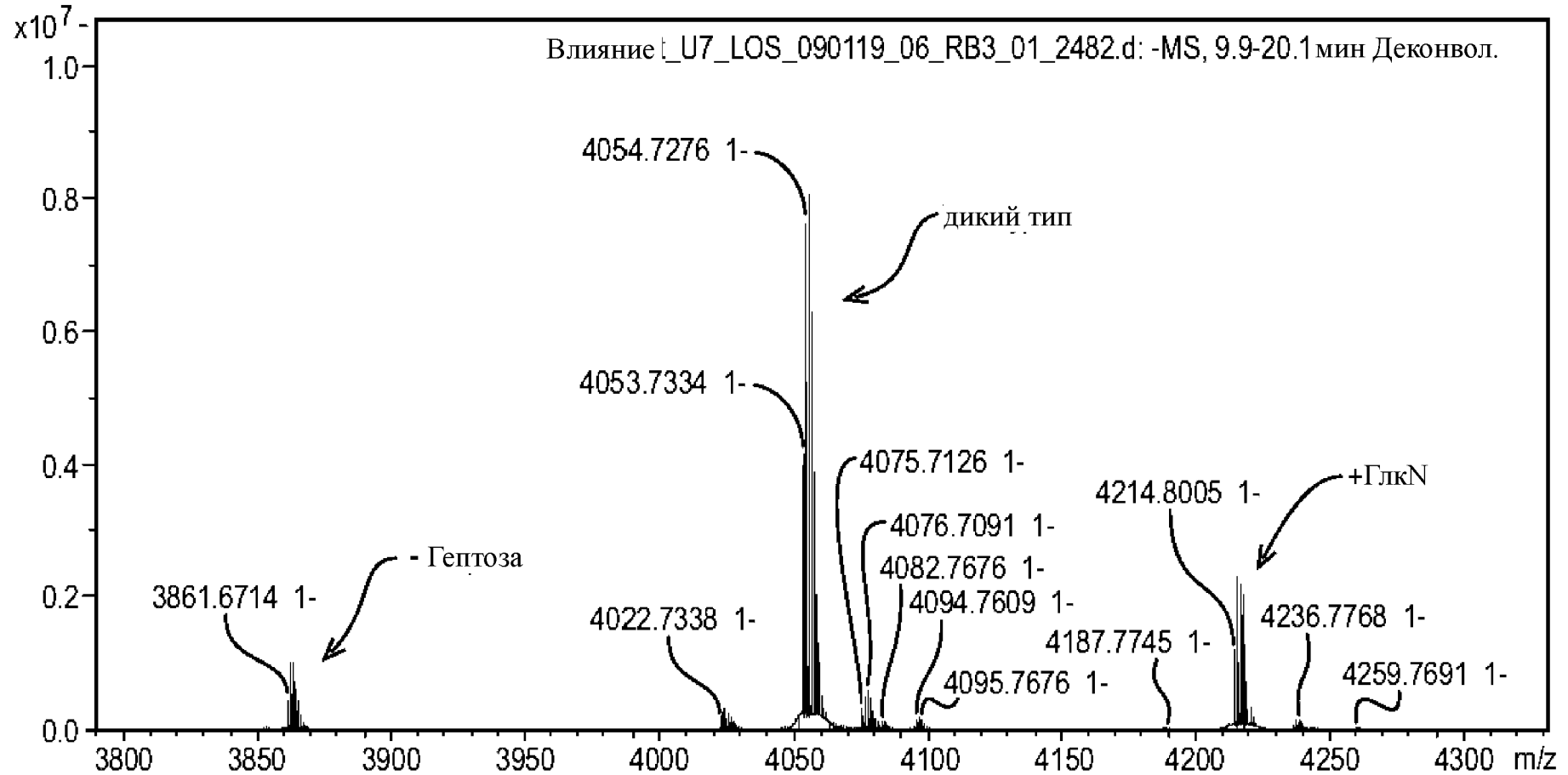
Фиг. 12В

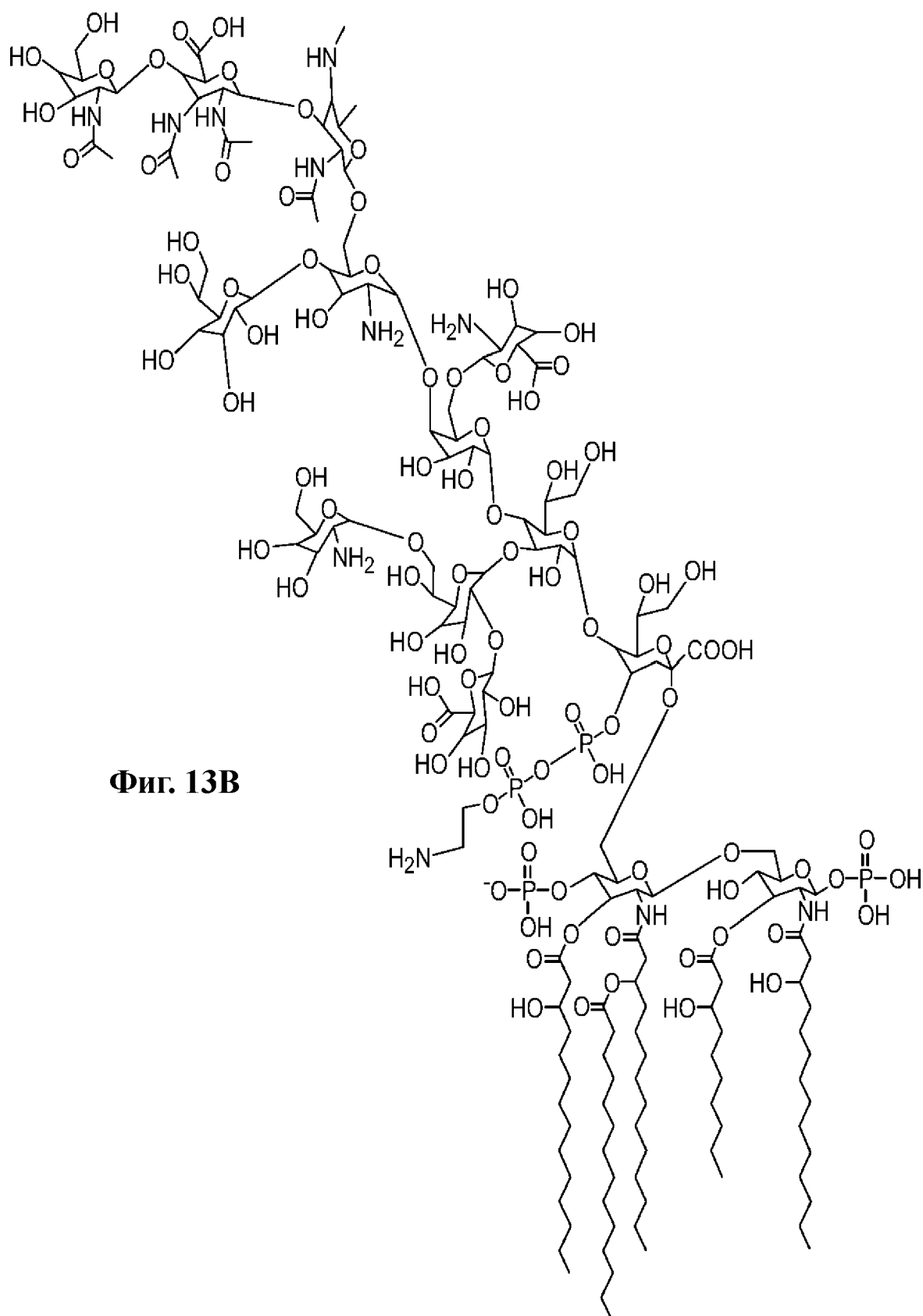
Точная масса: 4053.7570

Фиг. 13А

Измер. моно. [M-H]-	Теор. моно. [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
4053.7334	4053.7570	-5.8	Н/П (референс)	100.0
4214.8005	4214.8258	-6.0	+ГлкN	35.1
3861.6714	3861.6936	-5.7	- Гептоза	20.8

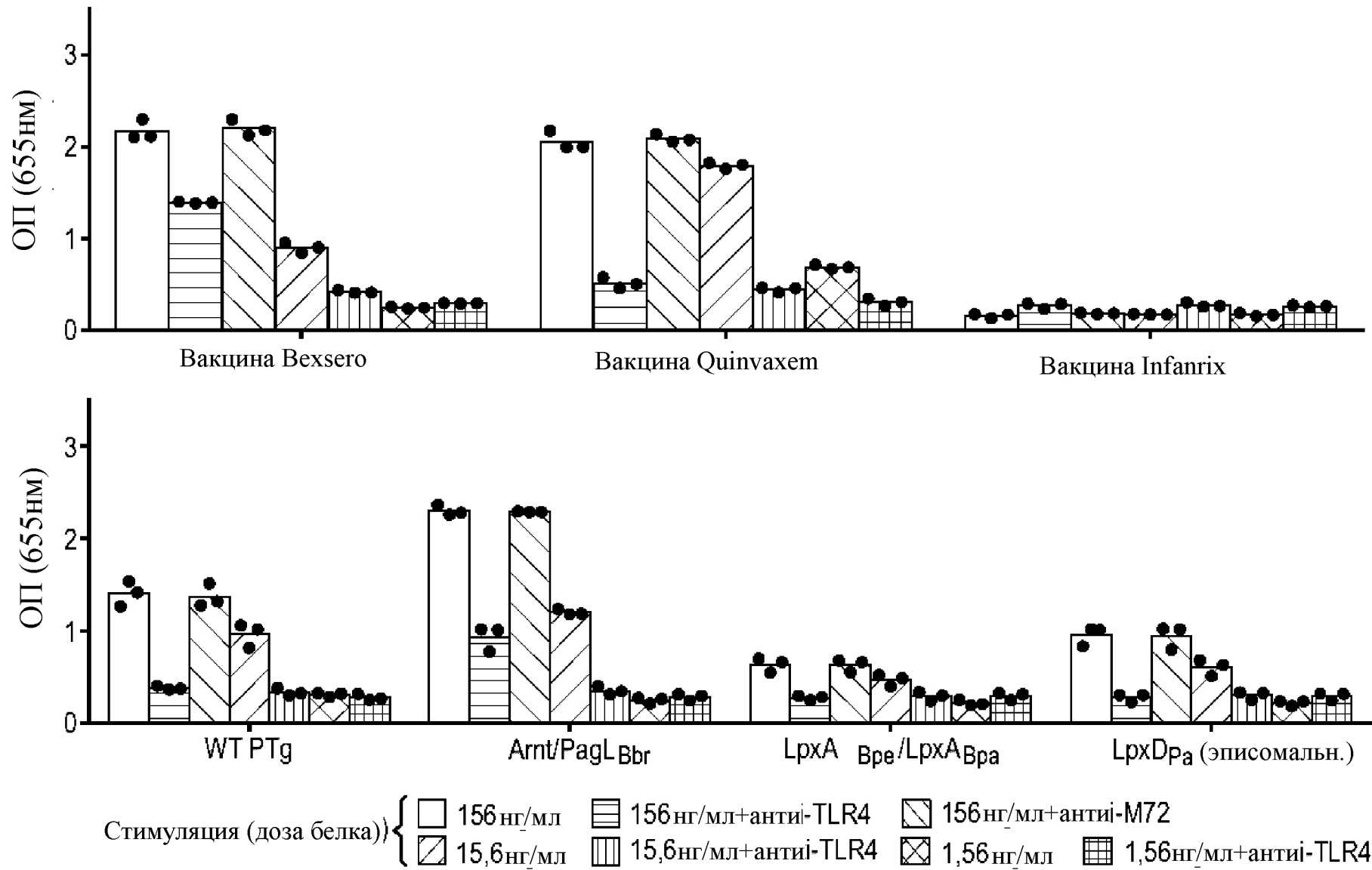
Интенс.



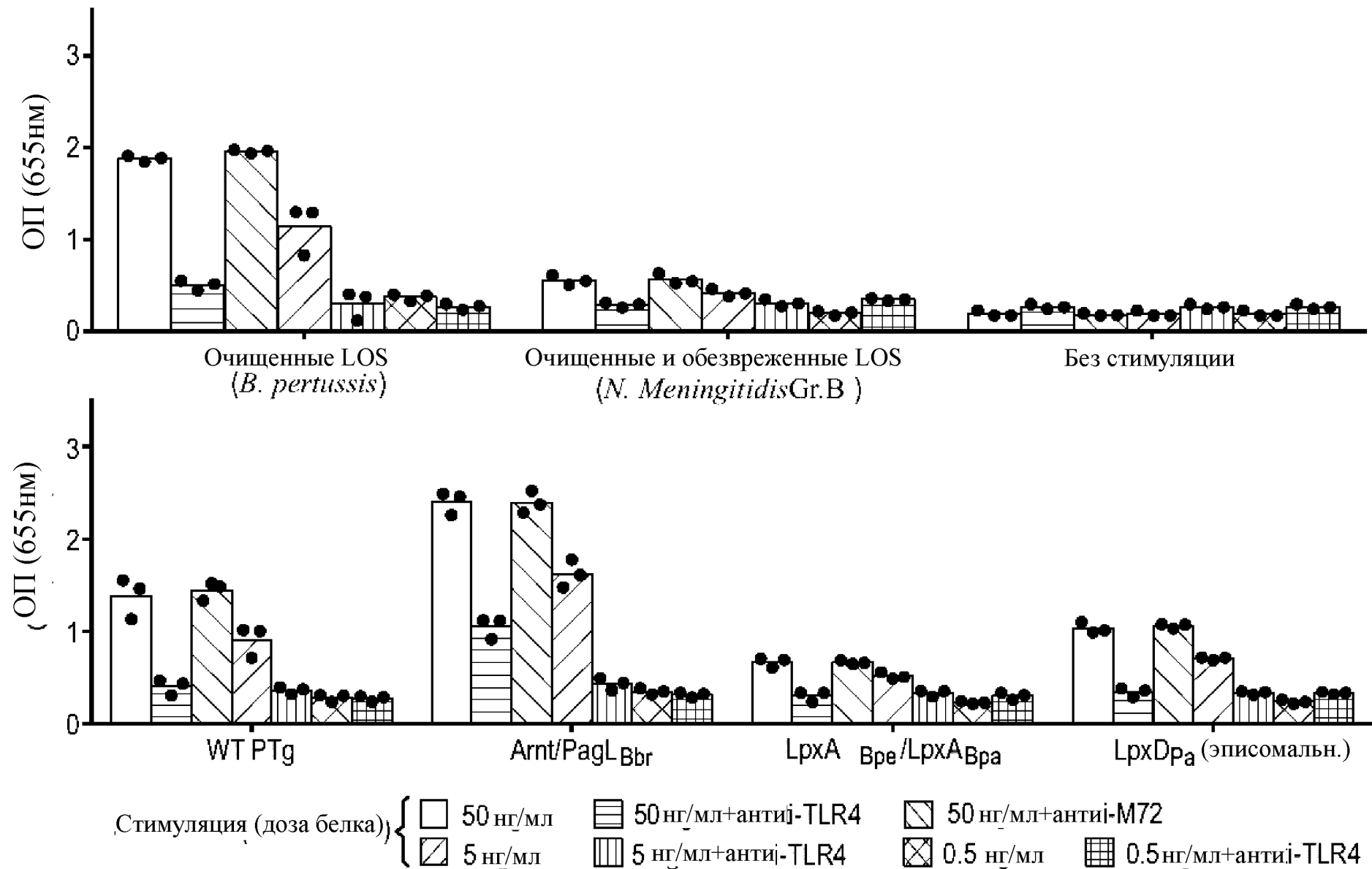
**Фиг. 13В**

Точная масса: 4053.7570

Фиг. 14 Активация сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4 in vitro (белки)

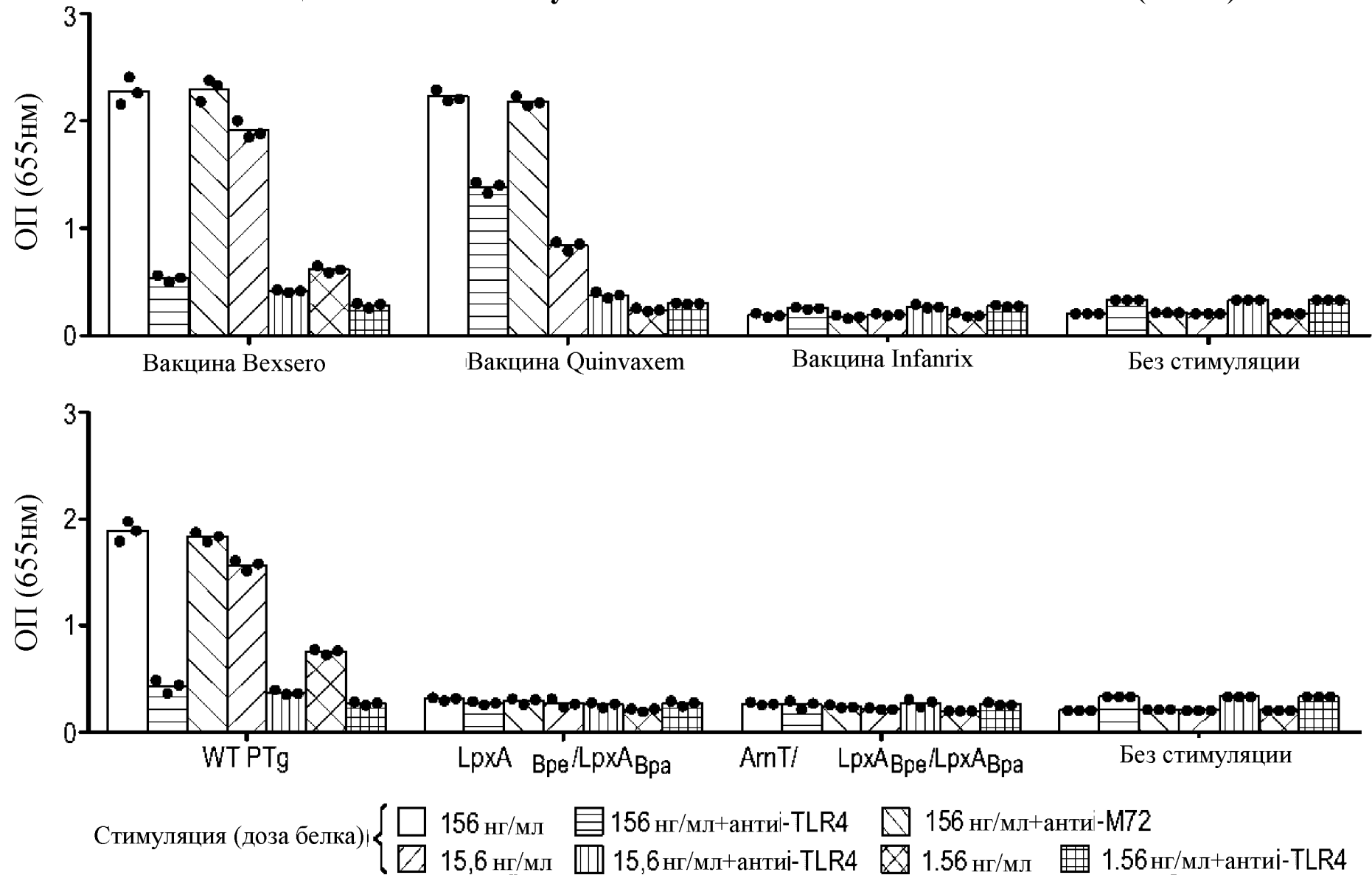


Фиг. 15 Активация сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4 in vitro (LOS)



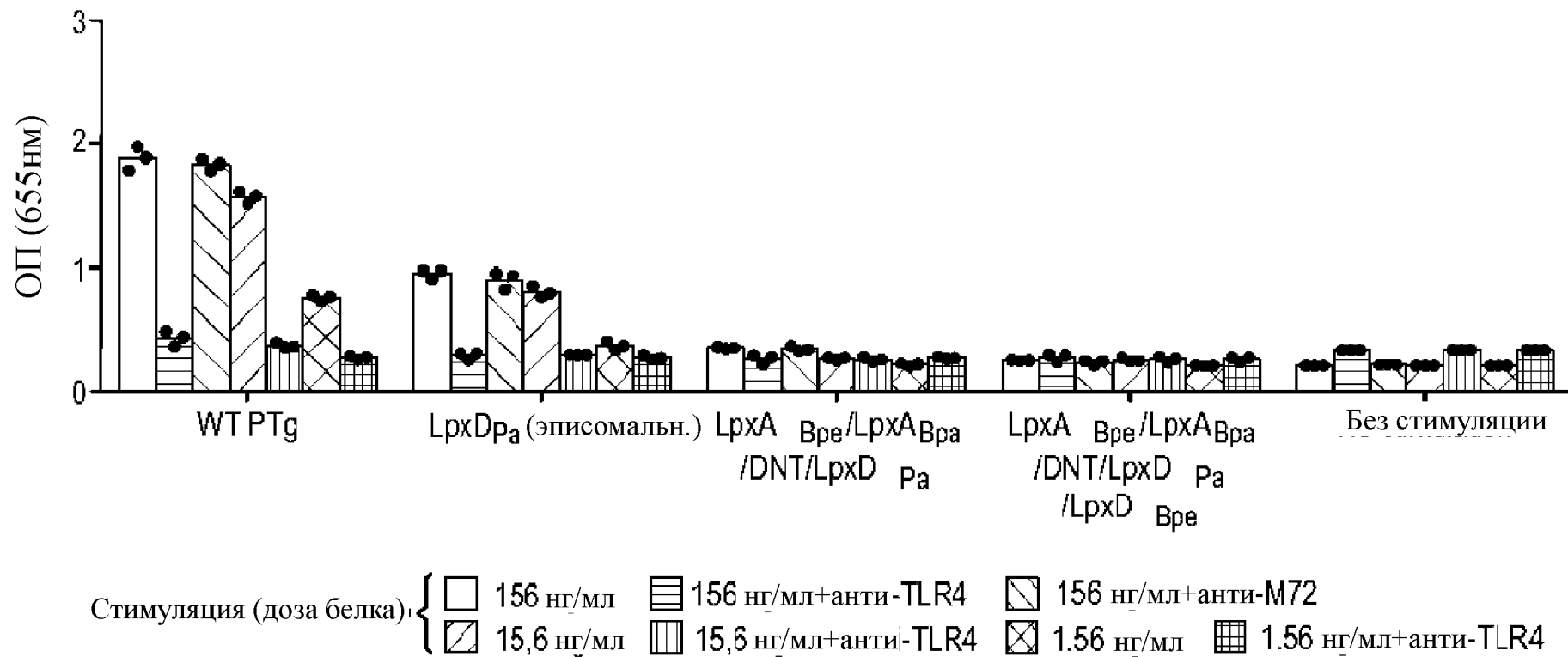
Фиг. 16

Активация сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4 in vitro (белок)



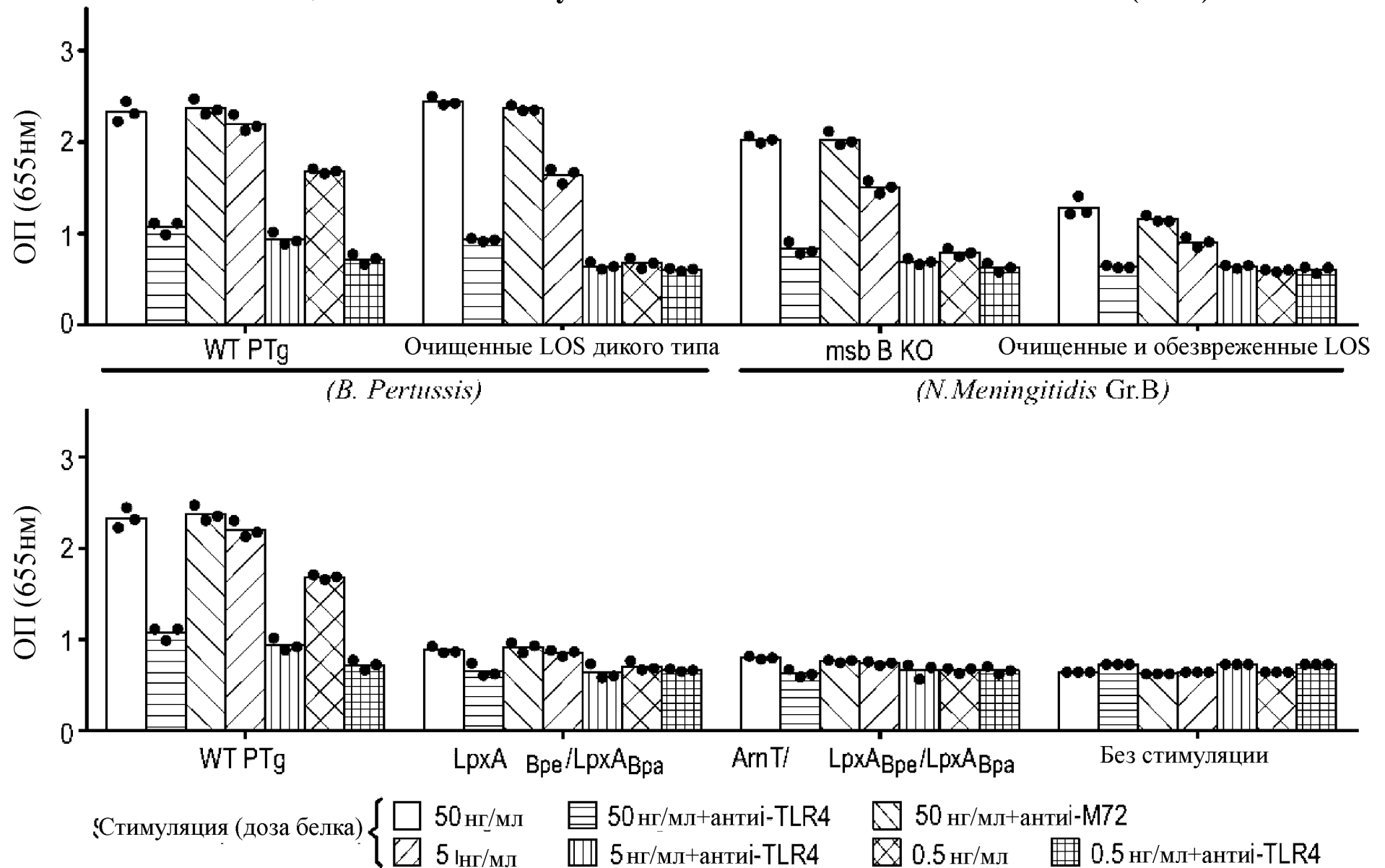
Фиг. 16 (продолж)

Активация сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4 in vitro (белок)



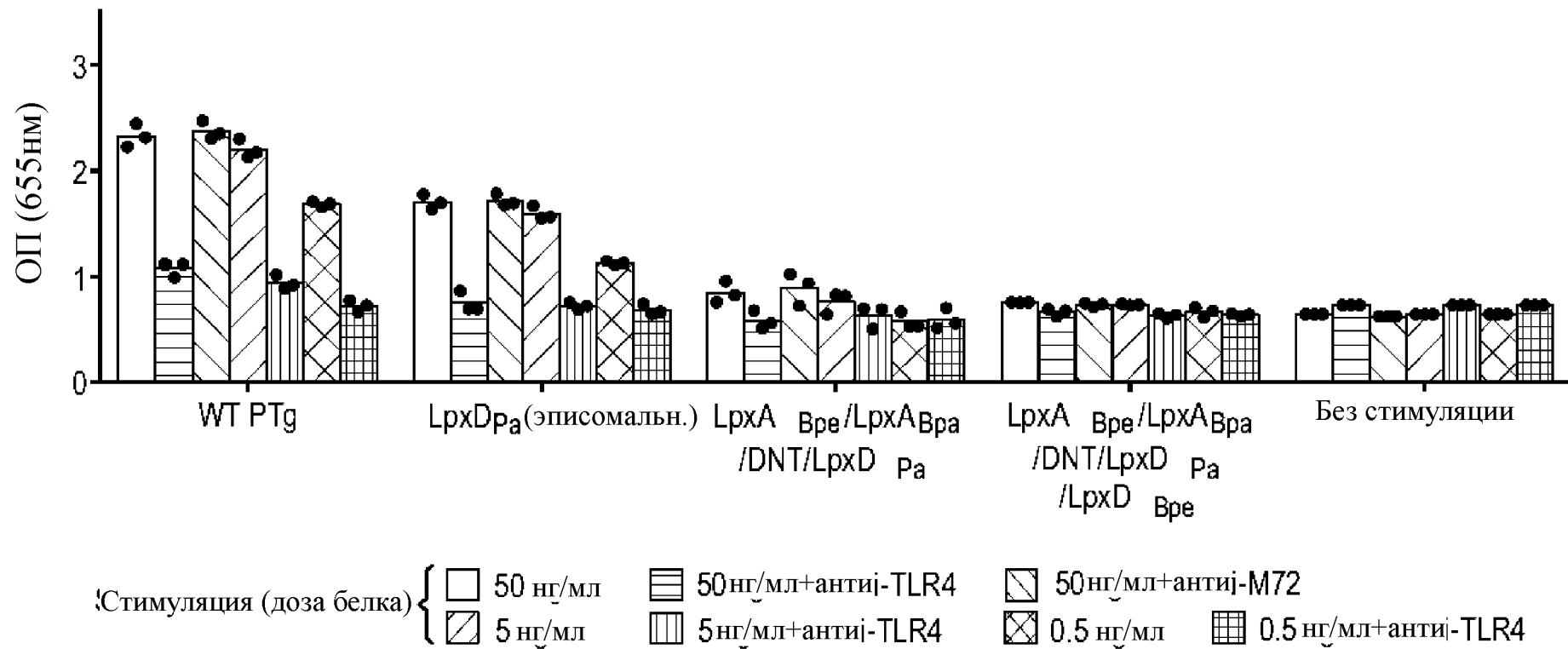
Фиг. 17

Активация сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4 in vitro (LOS)



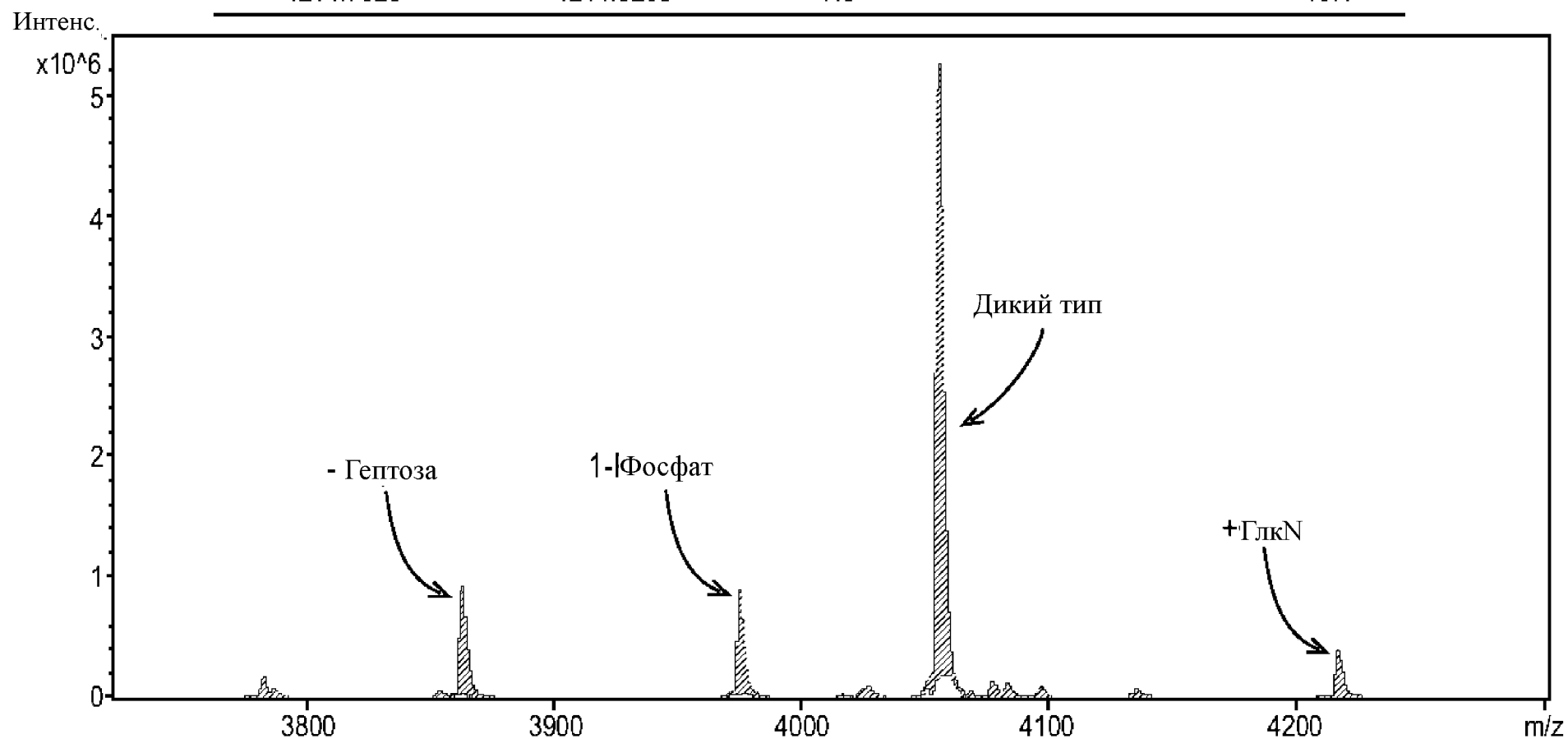
Фиг. 17 (продолж)

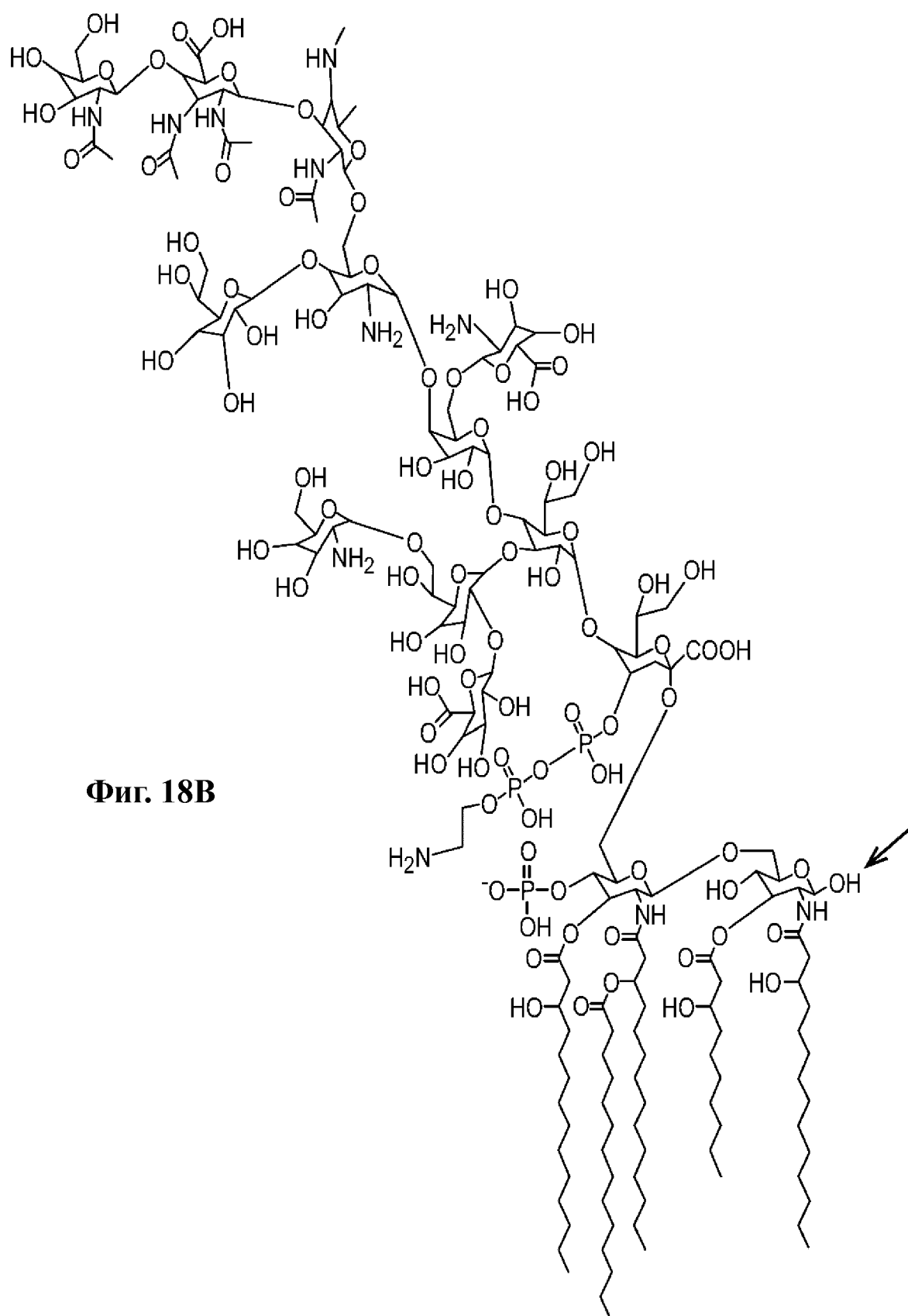
Активация сигнального пути TLR4 в клетках HEK-hTLR4 in vitro (LOS)



Фиг. 18А

Измер. моно [M-H]-	Теор. моно [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
4053.7262	4053.7570	-7.6	И/П (референс)	100.0
3973.8218	3973.7907	7.8	-PO ₄	22.2
3861.6646	3861.6936	-7.5	-Гептоза	25.4
4214.7928	4214.8258	-7.8	+ГлкN	13.1



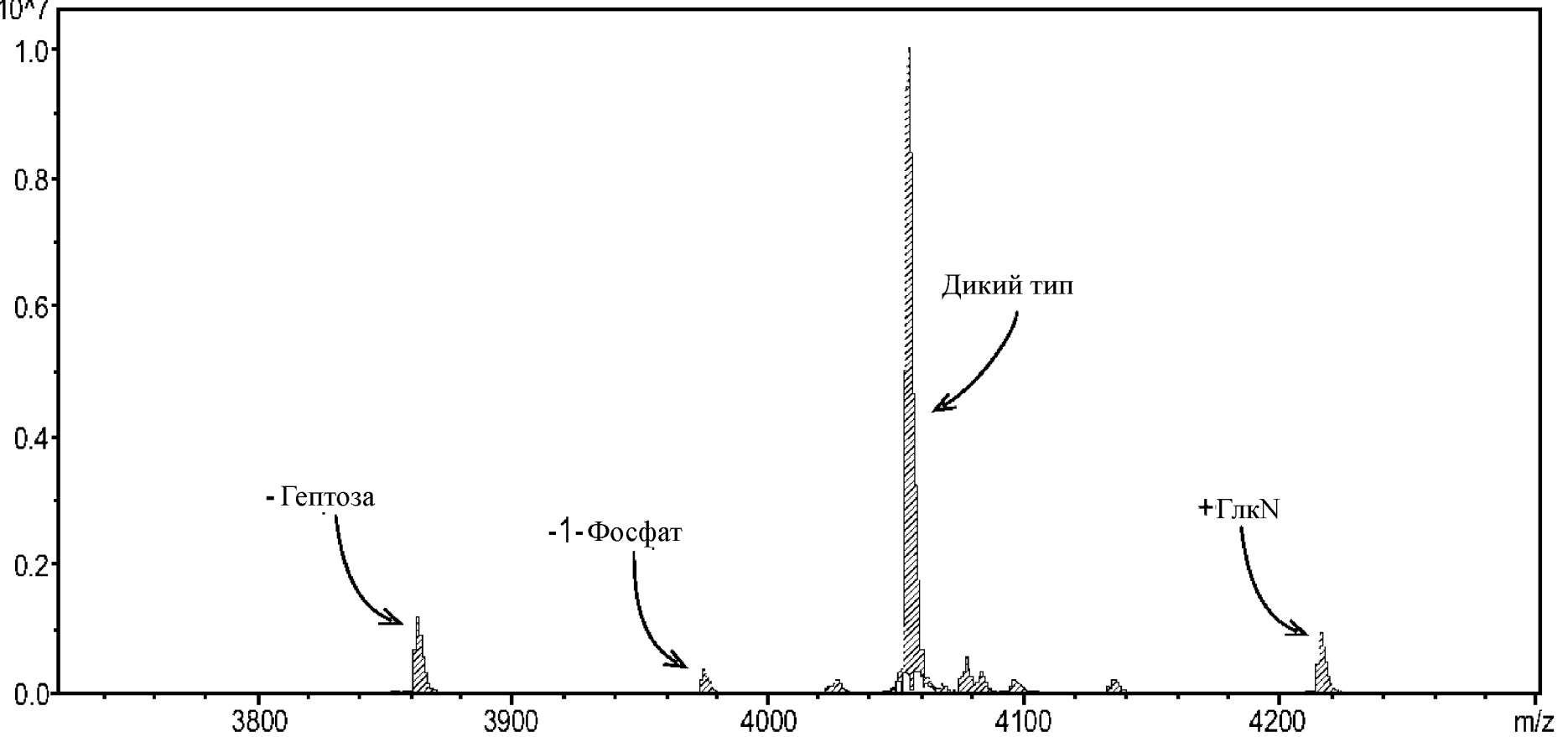


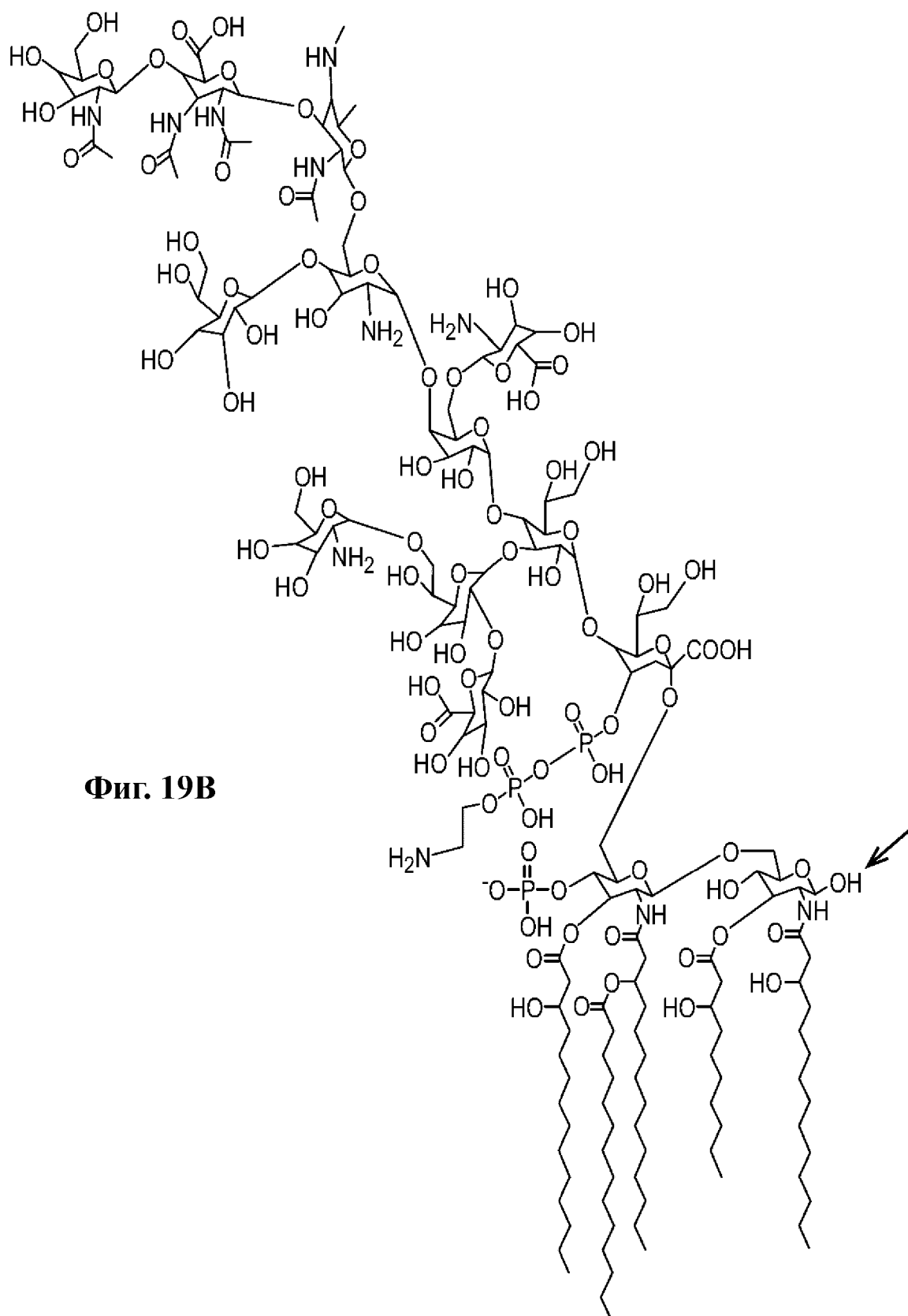
Фиг. 18В

Фиг. 19А

Измер. моно [M-H]-	Теор. моно [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
4053.7264	4053.7570	-7.5	Н/П (референс)	100.0
3973.8199	3973.7907	7.3	-PO ₄	6.5
3861.6646	3861.6936	-7.5	-Гептоза	20.6
4214.7927	4214.8258	-7.9	+ГлкN	13.4
4081.7575	4081.7883	-7.5	+(CH ₂) ₂ (lipid A)	5.8

Интенс.
x10⁷

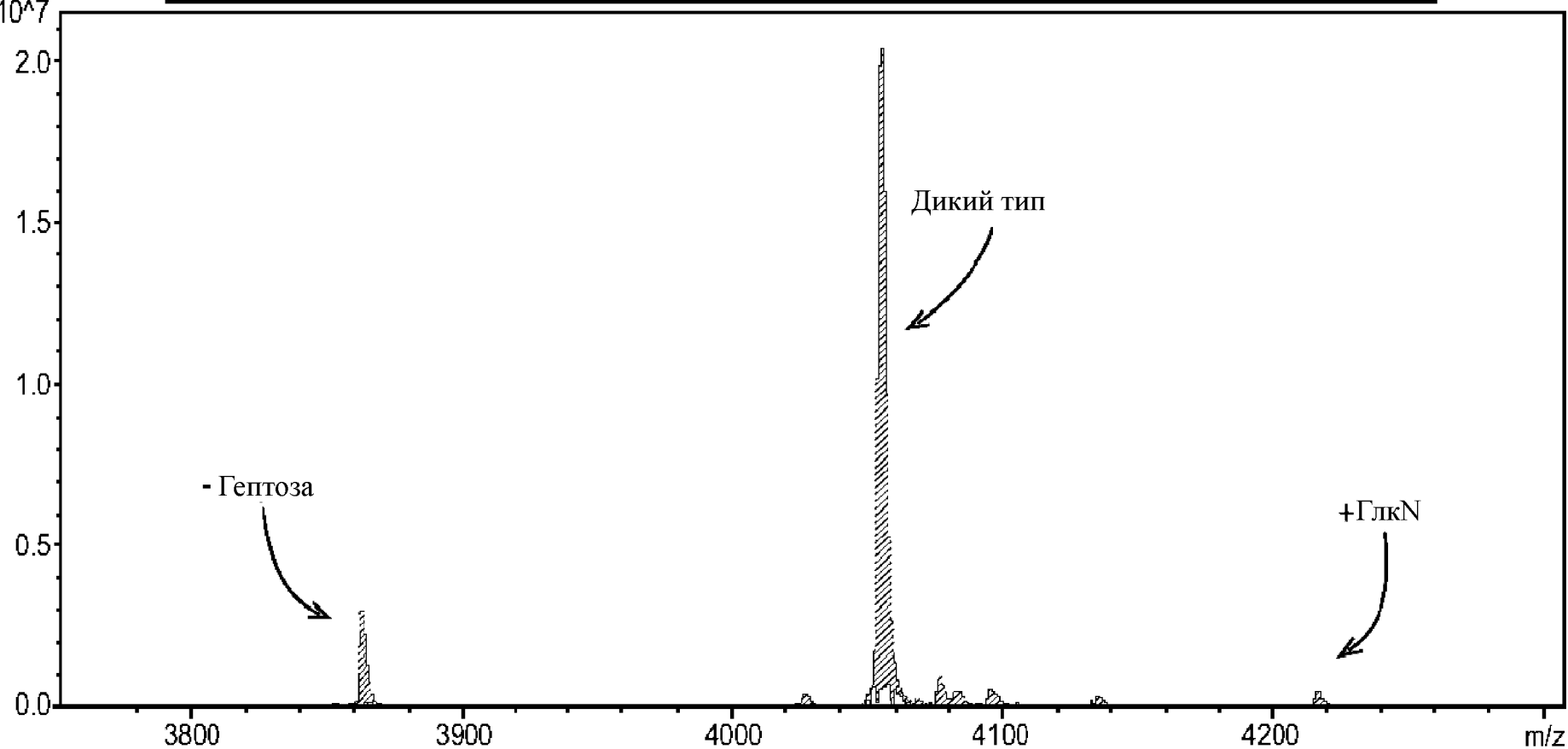


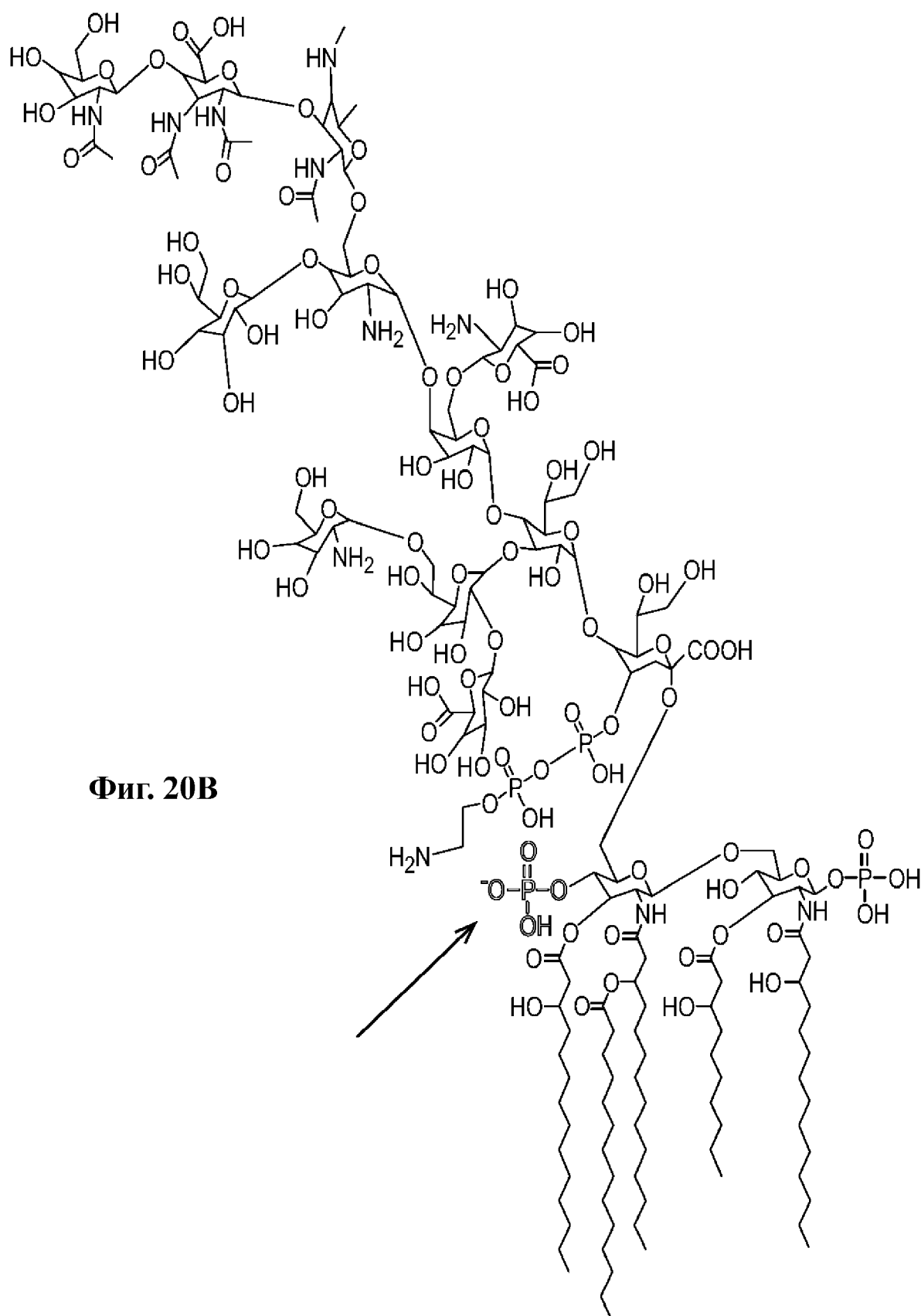


Фиг. 19В

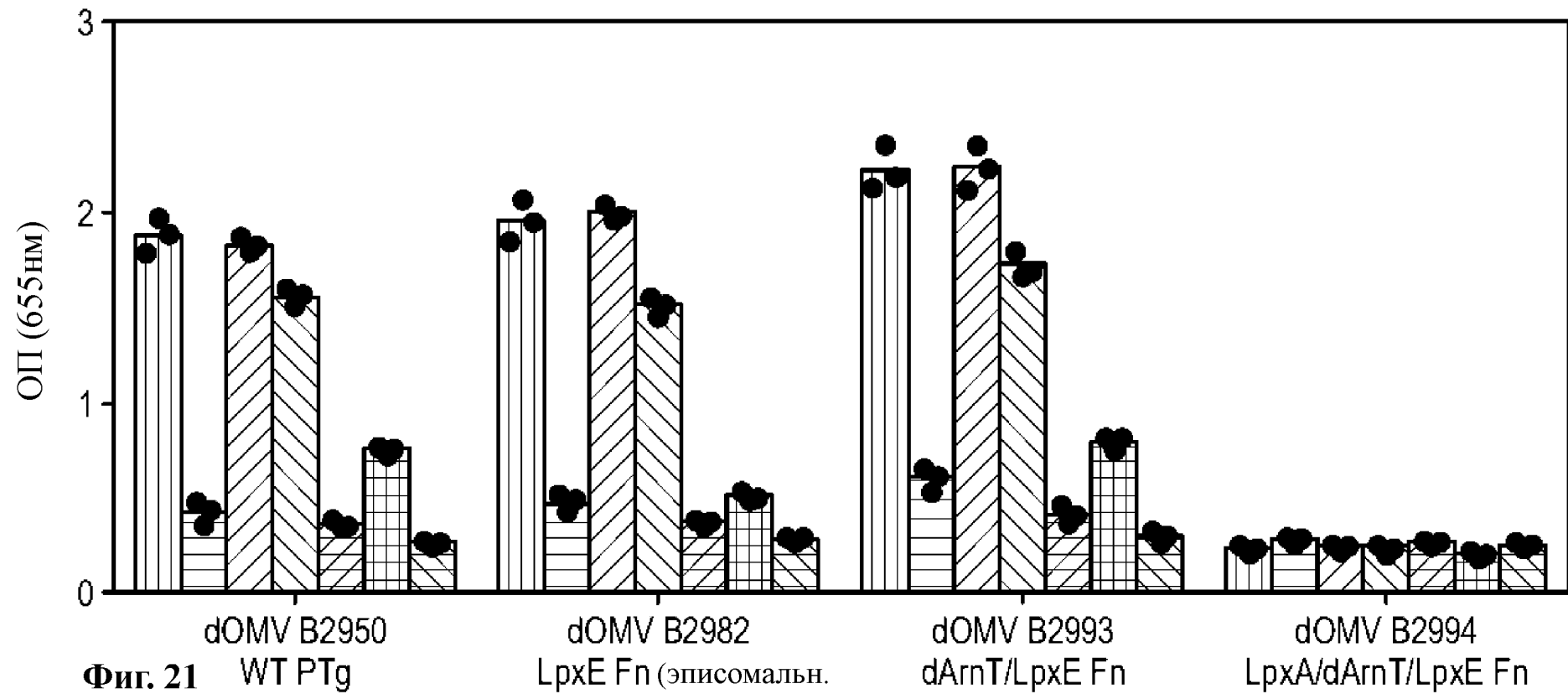
	Измер. моно. [M-H]-	Теор. моно [M-H]-	Ош. (ч/млн)	Структура	Отн.аб. (%)
Фиг. 20А	4053.7257	4053.7570	-7.7	Н/П (референс)	100.0
	3861.6645	3861.6936	-7.5	-Гептоза	22.9
	4214.7927	4214.8258	-7.9	+ГлкN	8.2

Интенс.

 $\times 10^7$ 

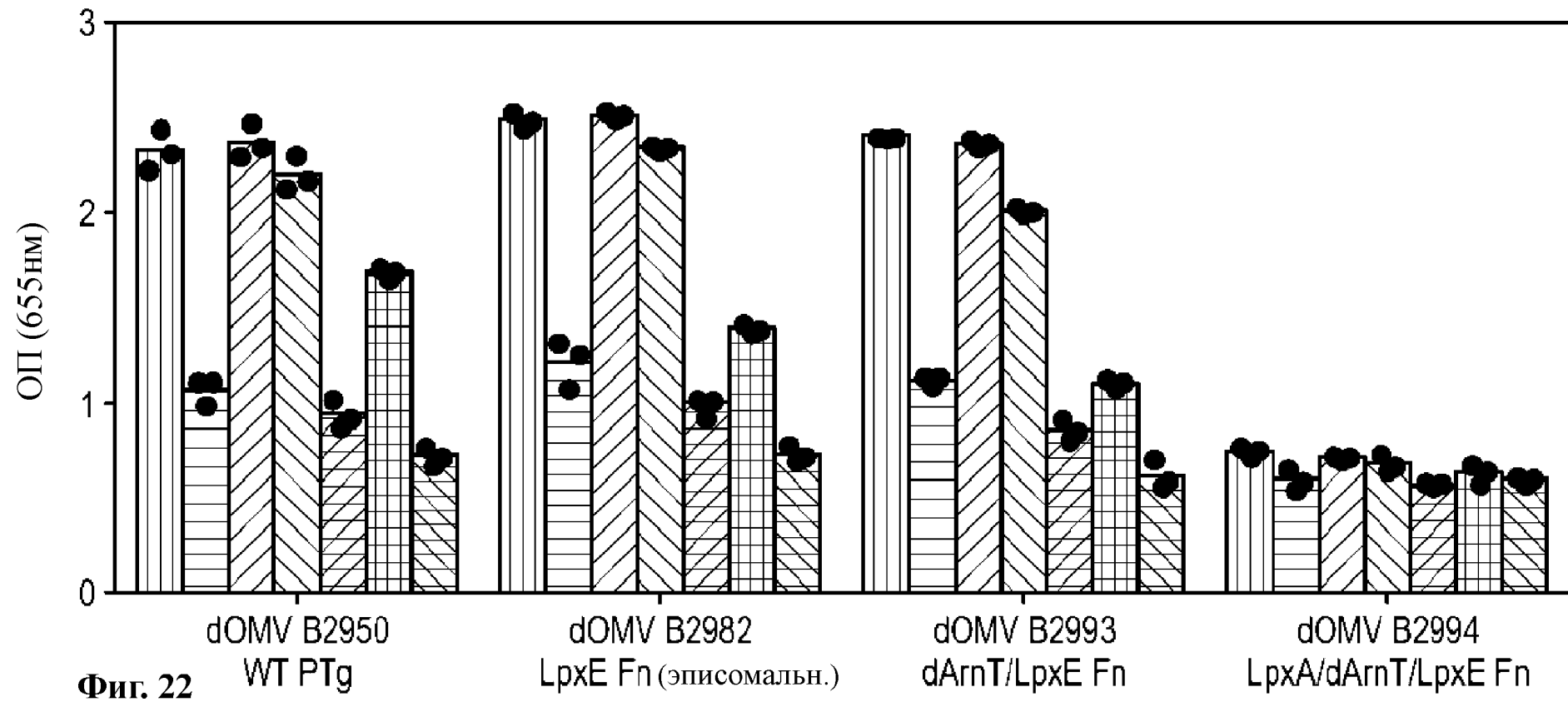


Фиг. 20В



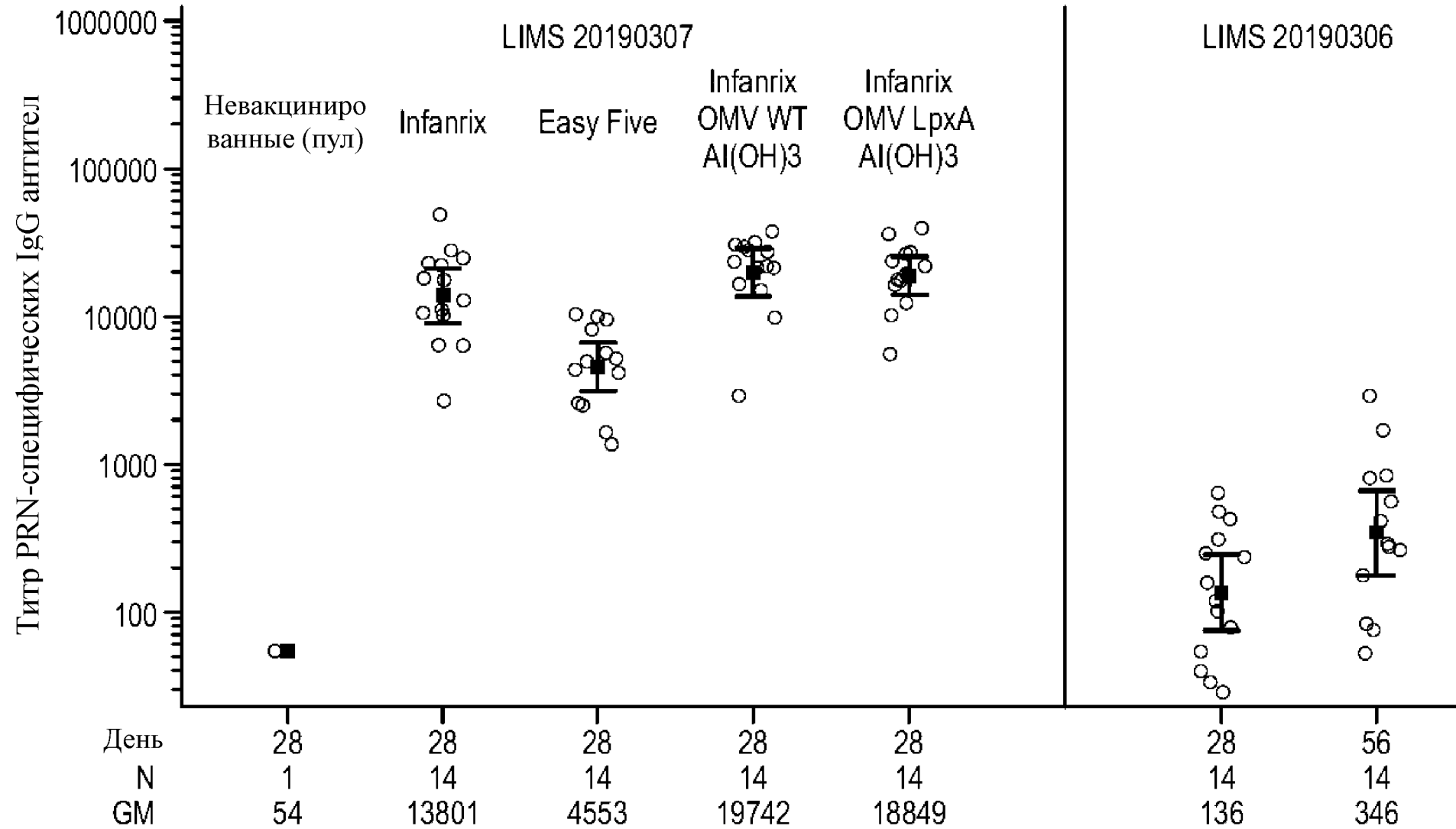
Стимуляция (доза белка)

	156 нг/мл		156 нг/мл+анти -TLR4		156 нг/мл+анти -M72		15,6 нг/мл
	15,6 нг/мл+анти TLR4		1,56 нг/мл		1,56 нг/мл+анти -TLR4		



Фиг. 23

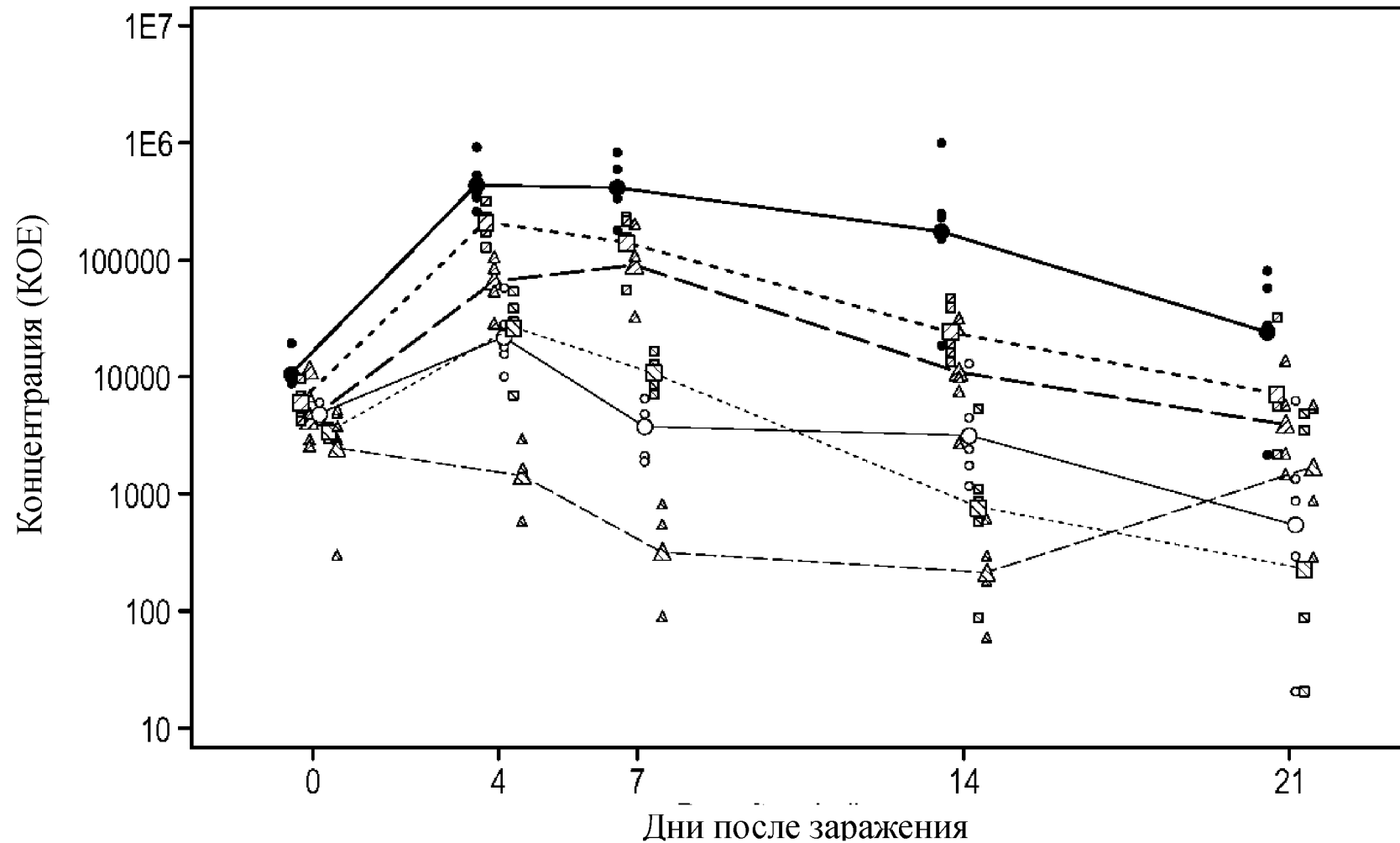
Индивидуальные результаты и среднее геометрическое с 95% ДИ



Фиг. 24

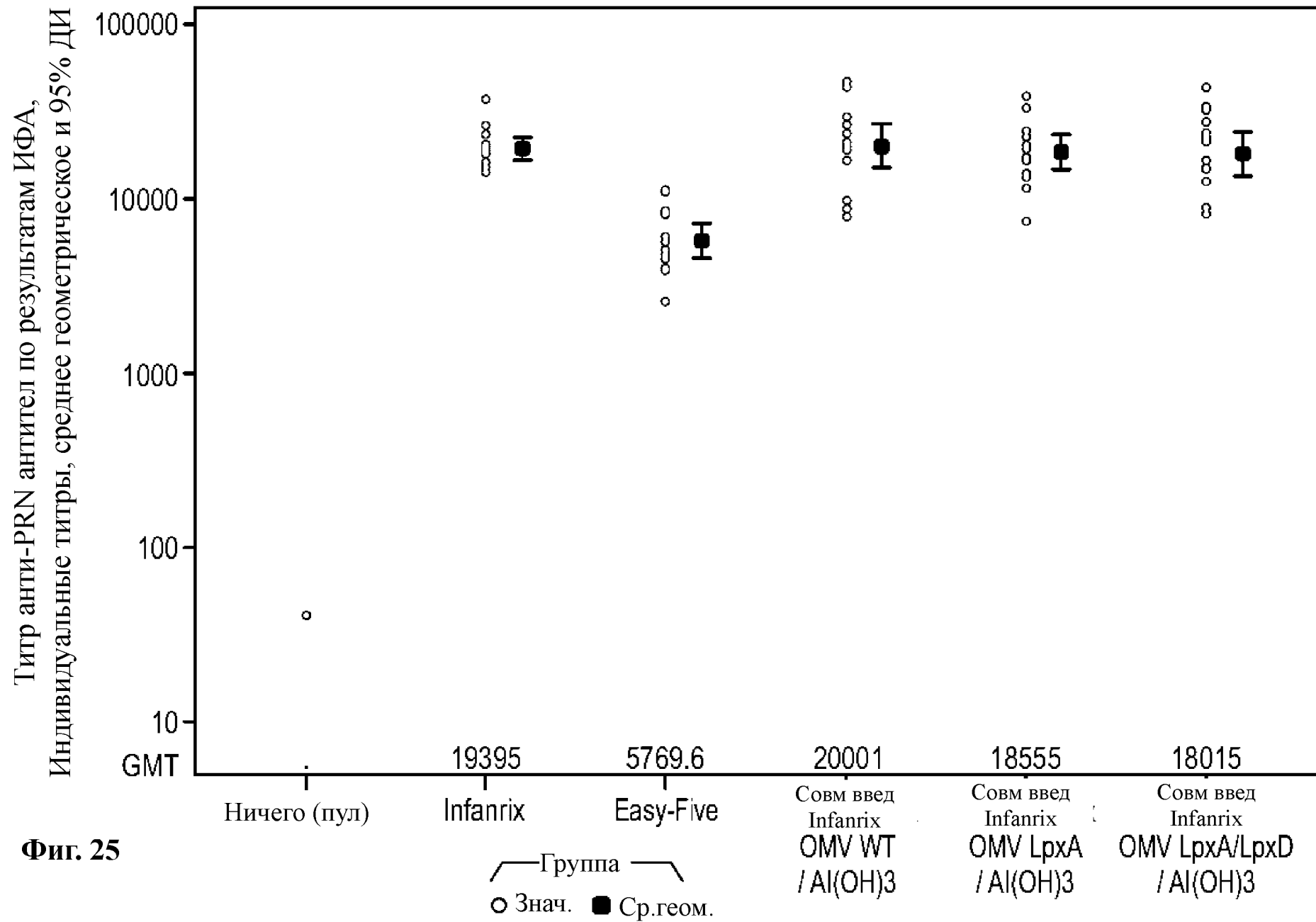
Защитная эффективность – кинетика

Наблюдавшиеся значения и среднее геометрическое по группам и по дням



42 / 50

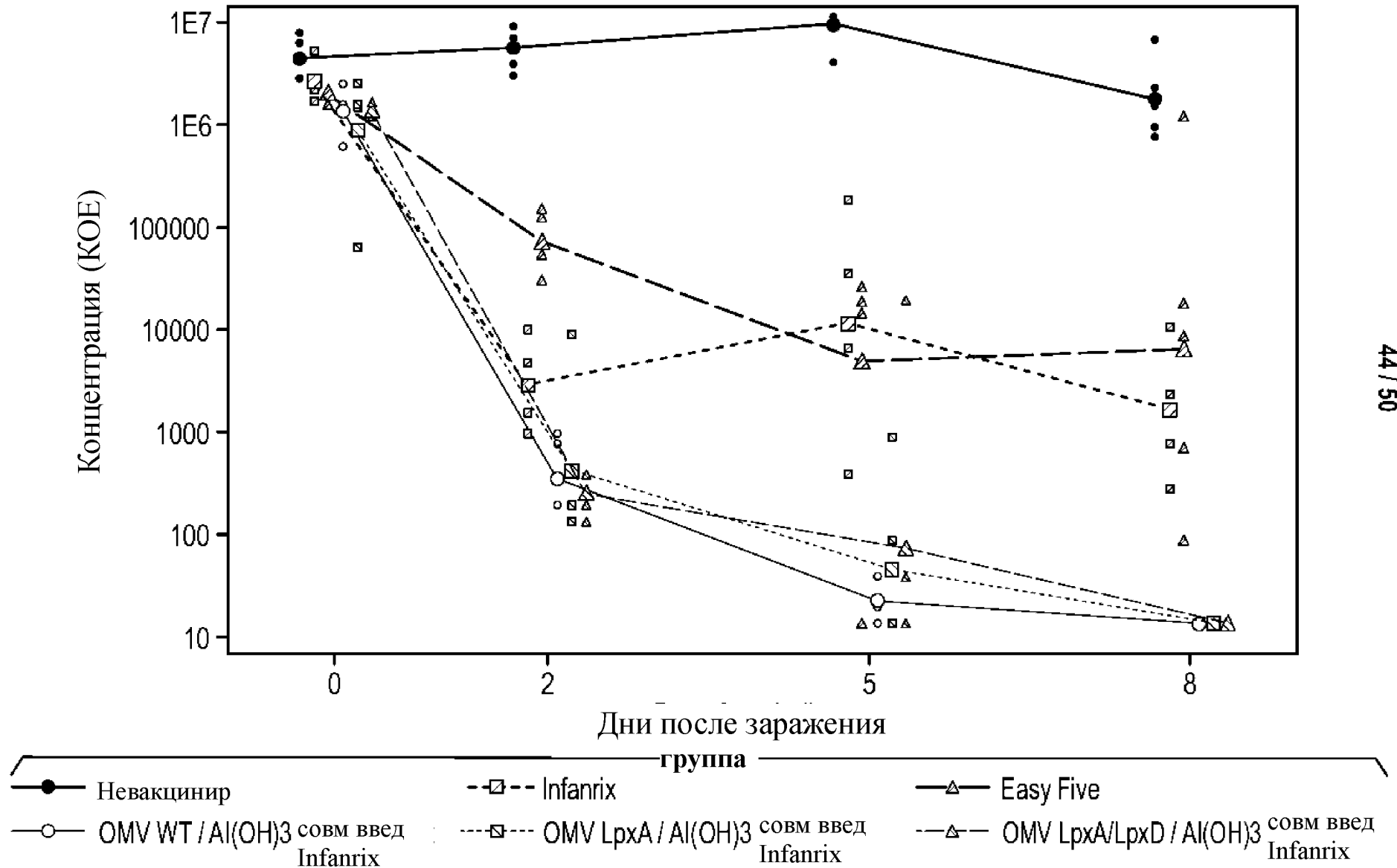
- Невакцинированные
- OMV WT / Al(OH)₃ - Infanrix
- Infanrix
- ◇— OMV LpxA / Al(OH)₃ - Infanrix
- △— Easy Five
- ▲— Невакцинированные (реконвалесцентные мыши)

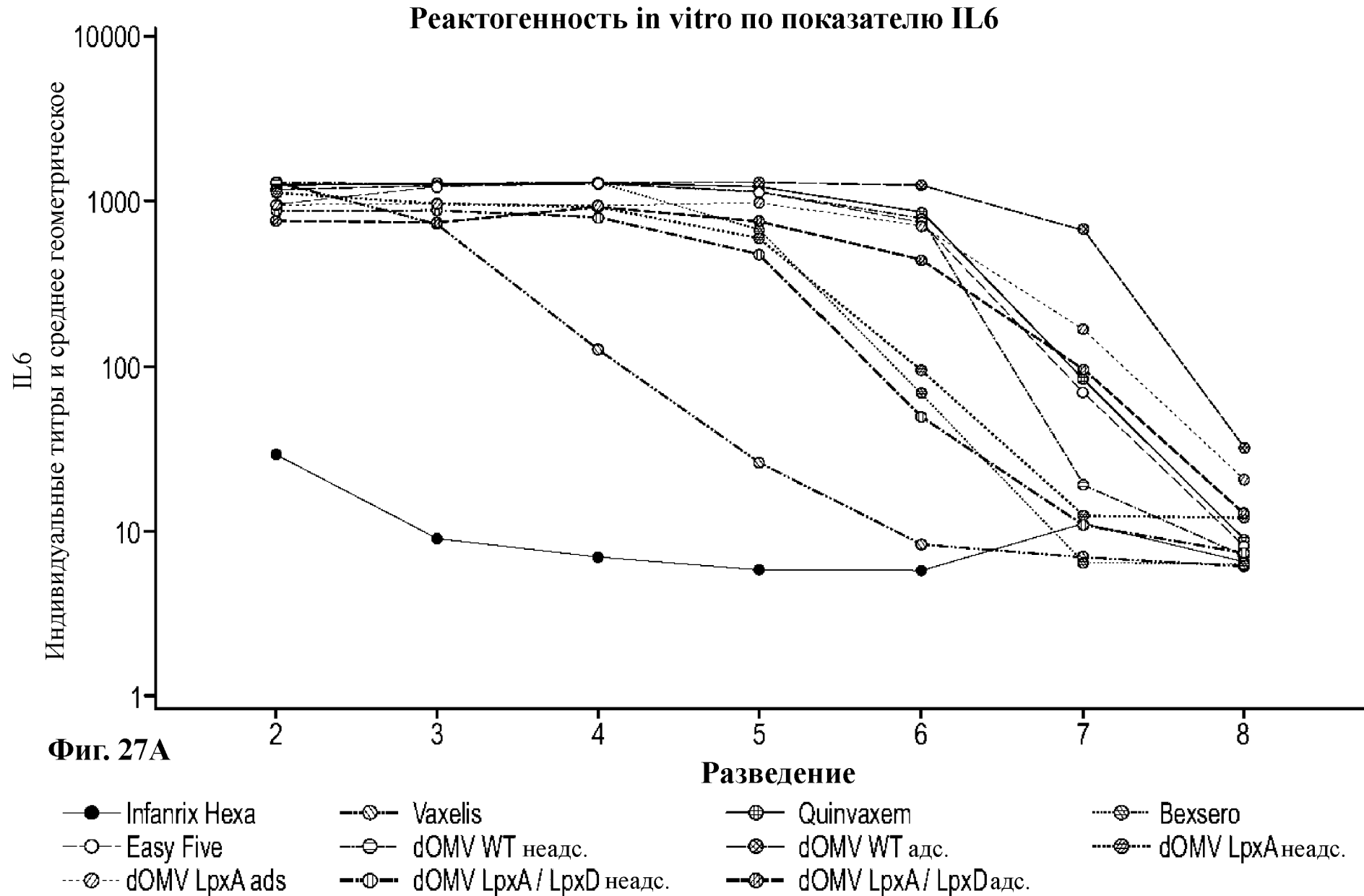


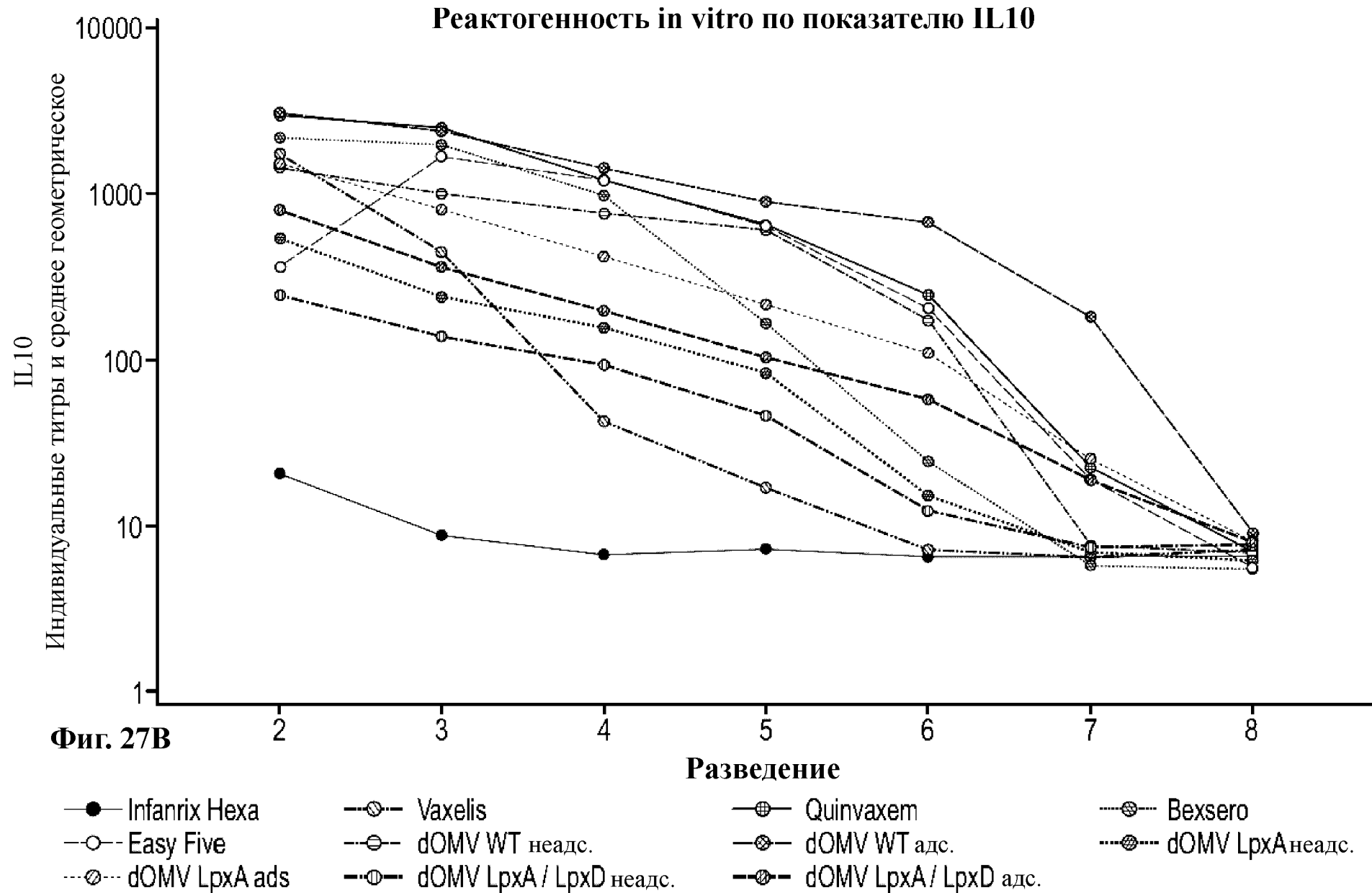
Фиг. 26

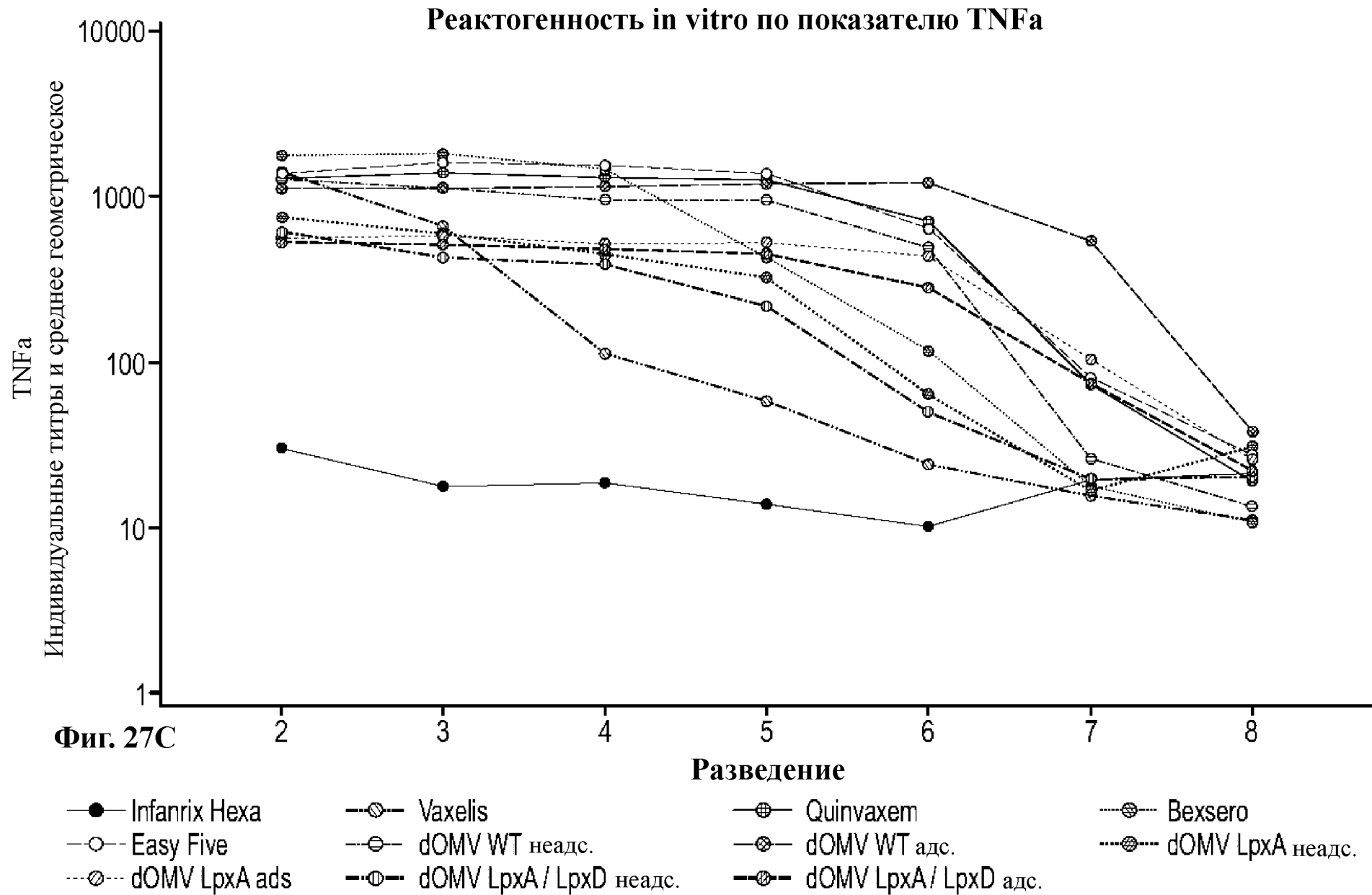
Защитная эффективность – кинетика

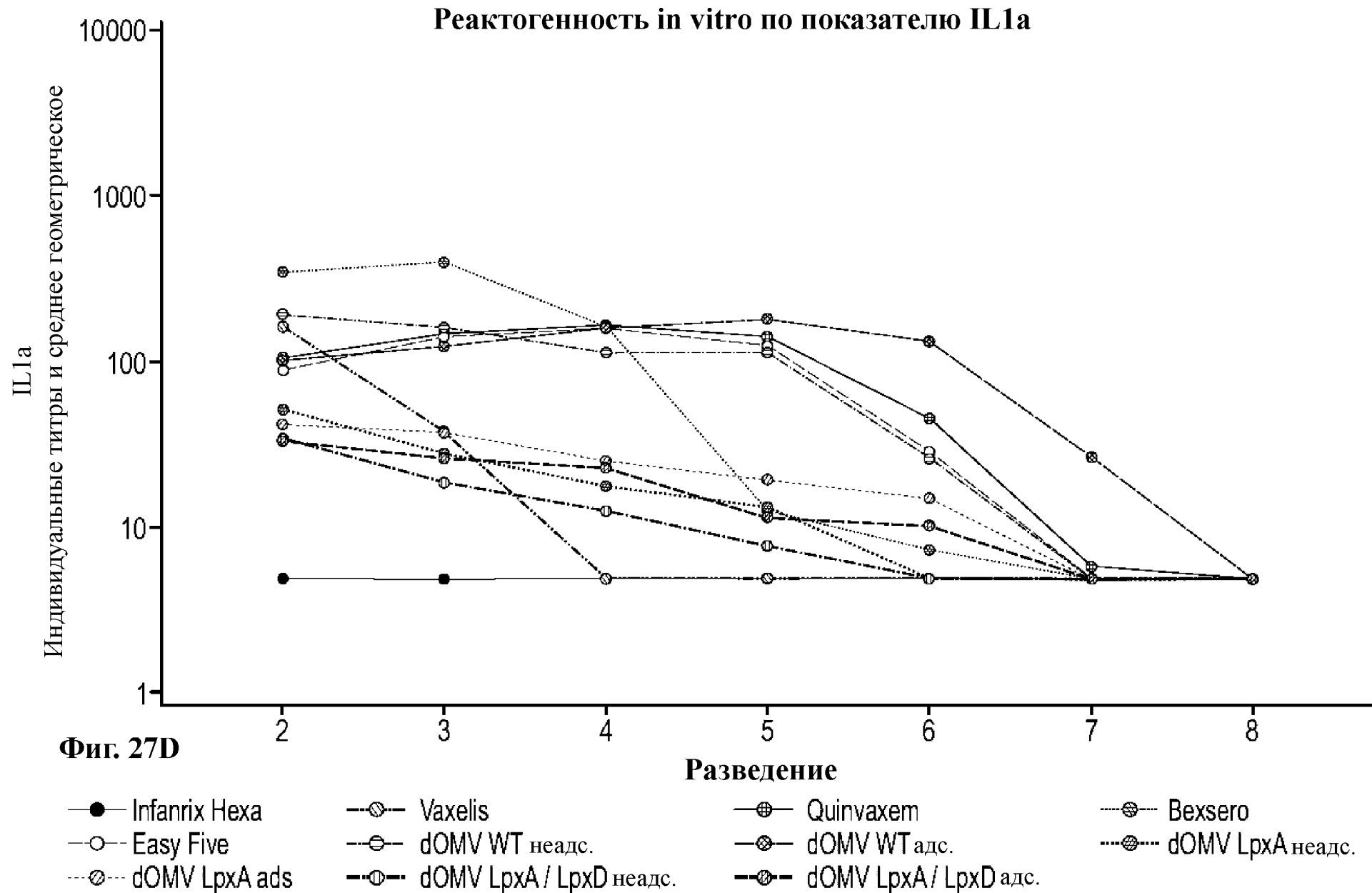
Наблюдавшиеся значения и среднее геометрическое по группам и по дням



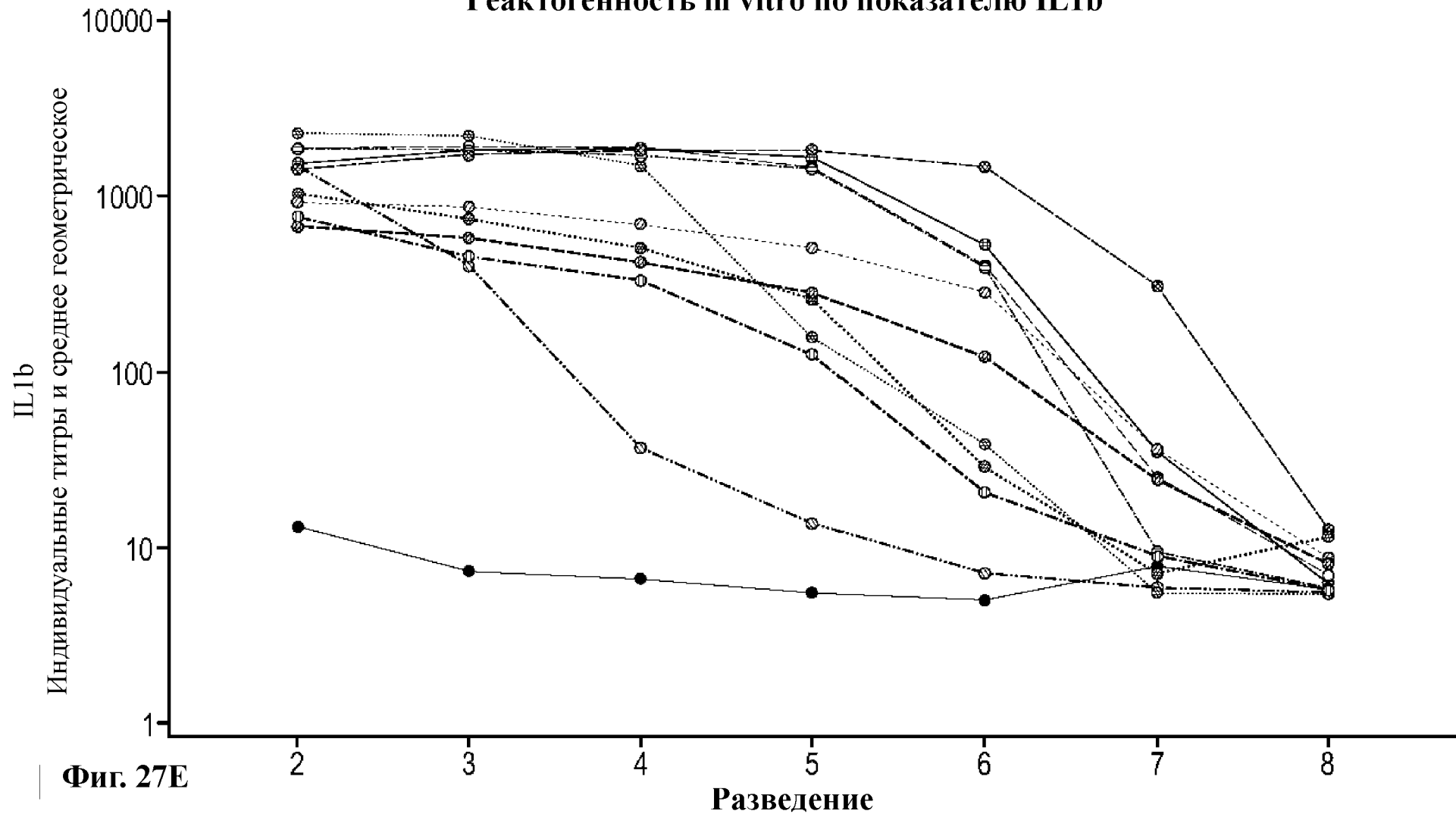








Реактогенность in vitro по показателю IL1b



- | | | | |
|-----------------|---------------------------|-------------------------|--------------------|
| ● Infanrix Hexa | ⊗ Vaxelis | ⊕ Quinvaxem | ⊗ Bexsero |
| ○ Easy Five | ⊖ dOMV WT неадс. | ⊗ dOMV WT адс. | ⊗ dOMV LpxA неадс. |
| ⊖ dOMV LpxA ads | ⊖ dOMV LpxA / LpxD неадс. | ⊗ dOMV LpxA / LpxD адс. | |

Реактогенность in vitro по показателю MIP1a

