

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043165**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.27

(21) Номер заявки
202090225

(22) Дата подачи заявки
2015.02.27

(51) Int. Cl. **A61K 39/095** (2006.01)
C07K 9/00 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МЕНИНГОКОККОВЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ fHbp**

(31) **14157399.8; 14177566.8**

(32) **2014.02.28; 2014.07.17**

(33) **EP**

(43) **2020.12.30**

(62) **201691429; 2015.02.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)**

(72) Изобретатель:
**Боттомлей Мэттью, Малито Энрико,
Мартинелли Мануэле, Скарселли
Мария (IT)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Дмитриев А.В., Билык А.В., Черкас
Д.А. (RU)**

(56) WO-A1-2014030003
DATABASE UniProt (Online), 22.02.2012,
SEQ NO ID: G9I6U8, "SubName: Full=Factor H
binding protein variant A93_001"
DATABASE UniProt (Online), 06.03.2013,
SEQ NO ID: LOGGE0, "SubName: Full=Factor H
binding protein"
WO-A2-2008079372
WO-A2-2009104097
WO-A1-2013033398
SCARSELLI M. et al. Rational Design of a
Meningococcal Antigen Inducing Broad Protective
Immunity. ScienceTranslational Medicine, 2011, v. 3,
n. 91, p. 91ra62
WO-A1-1999057280

(57) В изобретении предложен иммуногенный слитый полипептид, содержащий мутантный вариант 2 полипептида, связывающего фактор Н (v2 fHbp), и мутантный вариант 3 полипептида, связывающего фактор Н (3 fHbp); плазида или другая нуклеиновая кислота, кодирующая такой слитый полипептид; иммуногенная композиция, содержащая такой слитый полипептид; и мембранные везикулы, включающие такой слитый полипептид.

B1**043165****043165 B1**

В данной заявке на изобретение заявлено преимущество заявок на Европейский патент 14157399.8 (поданной 28 февраля 2014 года) и 14177566.8 (поданной 17 июля 2014 года), полные содержания которых для всех задач включены здесь путем ссылки.

Область изобретения

Данное изобретение относится к области белковой инженерии, в частности к менингококковому белку, связывающему фактор H (fHbp), который, как известно, представляет собой полезный вакцинный иммуноген.

Предшествующий уровень техники

Neisseria meningitidis представляет собой грамотрицательную инкапсулированную бактерию, которая колонизирует верхние дыхательные пути у приблизительно 10% населения. Существуют конъюгированные вакцины против серогрупп A, C, W135 и Y, но единственная вакцина, которая доступна для защиты против серогруппы B в схеме с двумя дозами, представляет собой продукт BEXSERO™, одобренный в 2013 году.

Одним из защитных иммуногенов в BEXSERO™ представляет собой fHbp, который также известен как белок "741" (SEQ ID NO: 2536 в источнике 1; здесь последовательность SEQ ID NO: 1), "NMB1870", "GNA1870" [2-4], "P2086", "LP2086" или "ORF2086" [5-7]. Трехмерная структура этого белка известна [8, 9], и белок имеет две β-бочки, связанные коротким линкером. Во множестве публикаций сообщается о защитной эффективности этого белка в менингококковых вакцинах, например, см. источники 10-14. Липопротейн fHbp экспрессируется в различных штаммах во всех серогруппах. Последовательности fHbp сгруппированы в три варианта [2] (названные в настоящем описании как v1, v2 и v3), и в общем обнаружили, что сыворотка, полученная против данного варианта, является бактерицидной против штаммов, которые экспрессируют этот вариант, но не активна против штаммов, которые экспрессируют один из двух других вариантов, т.е. существует перекрестная защита в пределах варианта, но нет перекрестной защиты между вариантами (за исключением некоторой перекрестной реактивности между v2 и v3).

Для увеличения перекрестной реактивности между семействами сконструирована последовательность fHbp, содержащая специфические черты для всех трех вариантов [15].

Белковую инженерию также использовали для удаления взаимодействия fHbp с сидерофорами [15] и с фактором H [17-25]. О нарушении взаимодействия с fH сообщали для всех трех вариантов, и предполагается получение улучшенного вакцинного иммуногена [22, 26]. Тем не менее, для полипептидов v2 в источниках 23 и 24 сообщается о неизбежной нестабильности, которая также обнаружена у мутантов с нарушенным связыванием fH. Нестабильность, по-видимому, возникает от N-концевого домена в виде β-бочки, и в источнике 23 предостерегают о том, что любые замены в этой бочке могут способствовать нестабильности.

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить дополнительные мутанты fHbp v2 и v3, обладающие повышенной стабильностью.

Описание изобретения

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

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

Зрелый липопротейн не содержит первые 19 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 2 (подчеркнутые; образуется последовательность SEQ ID NO: 4), и форма ΔG последовательности SEQ ID NO: 2 не содержит первые 26 аминокислот (SEQ ID NO: 5).

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

MNRTAFCCLSLTALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLT
LEDSIPQNGTLTSAQAQGAETFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVFQKIEVDGQTITLA
SGEFQIYKQNHS AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYH
GKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDT
RYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

Зрелый липопротейн не содержит первые 19 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 3 (подчеркнутые; образуется последовательность SEQ ID NO: 40), и форма ΔG последовательности SEQ ID NO: 3 не содержит первые 31 аминокислоты (SEQ ID NO: 17).

Авторы изобретения идентифицировали остатки в последовательностях SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, которые могут быть модифицированы для увеличения стабильности полипептида. Эти остатки,

как правило, представлены в последовательностях v2 и v3, и, таким образом, их модификация может привести к последовательностям v2 и v3 fHbp, обладающим повышенной стабильностью. Более того, авторы изобретения продемонстрировали, что наряду с увеличением стабильности мутация этих остатков благоприятным образом может уменьшать связывание с человеческим фактором H (fH). Тем не менее, дополнительно раскрытые здесь мутации могут быть комбинированы с другими мутациями, например, для уменьшения связывания с человеческим фактором H (fH), для которого несколько мутаций уже известны в области техники.

Таким образом, в общем, в изобретении предложен мутант v2 или v3 fHbp, который обладает повышенной стабильностью по сравнению с fHbp дикого типа (например, по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 2 или 3) и который возможно обладает более низкой аффинностью в отношении человеческого фактора H по сравнению с fHbp дикого типа (например, по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 2 или 3). Увеличение стабильности и возможное уменьшение аффинности fHbp предпочтительно возникает в результате той(тех) же самой(ых) мутации(й), но в некоторых воплощениях они могут возникать в результате отдельных действий комбинированных мутаций. Предпочтительны мутантные белки fHbp, обладающие как повышенной стабильностью, так и сниженной аффинностью в отношении fH.

В первом воплощении изобретения предложен полипептид, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v2, где: (а) аминокислотная последовательность имеет k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5 и/или содержит фрагмент последовательности SEQ ID NO: 5; но (б) аминокислотная последовательность отличается от последовательности SEQ ID NO: 5 по одному или более чем одному из следующих остатков: S32, V33, L39, L41, F69, V100, I113, F122, L123, V124, S125, G126, L127, G128, S151, H239 и/или E240.

Когда признак (а) относится к фрагменту, тогда этот фрагмент включает по меньшей мере один из остатков, перечисленных в (б), но этот остаток отличается по сравнению с соответствующим остатком последовательности SEQ ID NO: 5. Фрагмент (а), как правило, имеет длину по меньшей мере 7 аминокислот, например 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 24, 26, 28, 40, 45, 50, 55, 60 последовательных аминокислот или больше последовательности SEQ ID NO: 5. Фрагмент, как правило, включает по меньшей мере один эпитоп последовательности SEQ ID NO: 5. Идентификация и картирование эпитопа подтверждены для fHbp [11, 27-31]. Наличие одинаковых по меньшей мере 30 последовательных аминокислот с последовательностью SEQ ID NO: 5 является типичным, и обычно мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 включает несколько (например 2, 3, 4, 5 или более) фрагментов последовательности SEQ ID NO: 5. В общем, мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 может иметь по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5 и включать несколько фрагментов последовательности SEQ ID NO: 5.

Величина k может быть выбрана из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или более. Предпочтительно, она равна 90 (т.е. мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5) и более предпочтительно равна 95.

Полипептид после введения животному-хозяину может вызывать образование антител, которые распознают менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 4. Эти антитела в идеале являются бактерицидными (см. ниже). Эти антитела могут включать некоторые антитела, которые не распознают полипептид v1 или v3 (например, менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 46, и менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 40), хотя они также могут включать некоторые антитела, обладающие перекрестной реактивностью с полипептидами v1 и/или v3.

Заявленный полипептид в одинаковых экспериментальных условиях обладает более высокой стабильностью, чем такой же полипептид, но без отличия(ий) последовательности (б), например, более высокой стабильностью чем менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 4. Повышение стабильности может быть оценено при использовании дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), например, как обсуждается в источниках 32 и 33. DSC ранее использовали для оценки стабильности v2 fHbp [24]. При подходящих условиях для DSC для оценки стабильности могут использовать 20 мкМ полипептид в забуференном растворе (например, 25 мМ Tris) с pH от 6 до 8 (например, 7-7,5) с 100-200 мМ NaCl (например, 150 мМ).

В некоторых воплощениях полипептид по изобретению усечен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 5. По сравнению со зрелой последовательностью дикого типа SEQ ID NO: 5 уже усечена по N-концу и включает полиглициновую последовательность (сравнение последовательностей SEQ ID NO: 4 и 5), но последовательность SEQ ID NO: 5 может быть усечена по C-концу и/или дополнительно усечена по N-концу.

Повышение стабильности в идеале составляет по меньшей мере 5°C, например по меньшей мере 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C или более чем на 35°C. Эти температуры относятся к увеличению срединной точки температурного перехода (T_m), оцениваемой при помощи DSC. fHbp дикого типа де-

монстрирует два пика DSC во время разворачивания (один для N-концевого домена и один для С-концевого домена), и когда полипептид по изобретению включает оба таких домена, тогда увеличение относится к стабильности N-концевого домена, для которого разворачивание может происходить при температуре даже ниже 40°C для последовательностей v2 дикого типа [24] (тогда как С-концевые домены могут иметь Tm 80°C или больше). Таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 по изобретению предпочтительно имеет N-концевой домен с Tm по меньшей мере 45°C, например выше или равно 50°C, выше или равно 55°C, выше или равно 60°C, выше или равно 65°C, выше или равно 70°C, выше или равно 75°C или даже выше или равно 80°C.

Во втором воплощении изобретения предложен полипептид, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v3, где: (а) аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере j% идентичность последовательности SEQ ID NO: 17, и/или содержит фрагмент последовательности SEQ ID NO: 17; но (б) аминокислотная последовательность отличается от последовательности SEQ ID NO: 17 по одному или более чем одному из следующих остатков: S32, L33, L39, L41, F72, V103, T116, F125, L126, V127, S128, G129, L130, G131, S154, H242 и/или E243.

Когда признак (а) относится к фрагменту, тогда фрагмент включает по меньшей мере один из остатков, перечисленных в (б), но этот остаток отличается при сравнении с соответствующим остатком в последовательности SEQ ID NO: 17. Фрагмент (а), как правило, имеет длину по меньшей мере 7 аминокислот, например 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 24, 26, 28, 40, 45, 50, 55, 60 последовательных аминокислот или более из последовательности SEQ ID NO: 17. Фрагмент как правило включает по меньшей мере один эпитоп последовательности SEQ ID NO: 17. Идентификация и картирование эпитопа подтверждены для fHbp [11; 27-31]. Наличие одинаковых по меньшей мере 30 последовательных аминокислот с последовательностью SEQ ID NO: 17 является типичным, и обычно мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 включает несколько (например, 2, 3, 4, 5 или более чем 5) фрагментов последовательности SEQ ID NO: 17. В общем, мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 может иметь по меньшей мере j% идентичность последовательности SEQ ID NO: 17 и включать несколько фрагментов последовательности SEQ ID NO: 17.

Величина j может быть выбрана из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или больше. Предпочтительно она равна 90 (т.е. мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 17) и более предпочтительно равна 95.

Заявленный полипептид после введения животному-хозяину может вызывать образование антител, которые распознают менингококковый полипептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 40. Эти антитела в идеале являются бактерицидными (см. ниже). Эти антитела могут включать некоторые антитела, которые не распознают полипептид v1 или v2 (например, менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 46, и менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 4), хотя они также могут включать некоторые антитела, обладающие перекрестной реактивностью с полипептидами v1 и/или v2.

Заявленный полипептид в одинаковых экспериментальных условиях обладает более высокой стабильностью, чем такой же полипептид, но не имеющий отличия(ий) последовательности (б), например, более высокой стабильностью, чем менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 40. Повышение стабильности может быть оценено с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), например, как обсуждается в источниках 32 и 33. DSC ранее использовали для оценки стабильности v3 fHbp [23]. При подходящих условиях для DSC для оценки стабильности можно использовать 20 мкМ полипептида в забуференном растворе (например, 25 мМ Tris) с pH от 6 до 8 (например, 7-7,5) с 100-200 мМ NaCl (например, 150 мМ).

В некоторых воплощениях полипептид по изобретению усечен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 17. По сравнению со зрелой последовательностью дикого типа последовательность SEQ ID NO: 17 уже усечена по N-концу и включает полиглициновую последовательность (сравнение последовательностей SEQ ID NO: 40 и 17), но последовательность SEQ ID NO: 17 может быть усечена по С-концу и/или дополнительно усечена по N-концу.

Увеличение стабильности в идеале составляет по меньшей мере 5°C например по меньшей мере 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C или больше. Эти температуры относятся к увеличению срединной точки температурного перехода (Tm), оцениваемой при помощи DSC. fHbp дикого типа демонстрирует два пика DSC во время разворачивания (один для N-концевого домена и один для С-концевого домена) и, когда полипептид по изобретению включает оба таких домена, тогда увеличение относится к стабильности N-концевого домена, для которого разворачивание может происходить при температуре приблизительно 60°C или меньше для последовательностей v3 дикого типа [24] (тогда как С-концевые домены могут иметь Tm 80°C или больше). Таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 по изобретению предпочтительно имеет N-концевой домен с Tm по меньшей мере 65°C, например выше или равно 70°C, выше или равно 75°C или даже выше или равно 80°C.

Мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 5.

Полипептиды в соответствии с первым воплощением изобретения содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5, и/или содержит фрагмент последовательности SEQ ID NO: 5. Тем не менее, по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 5 эта аминокислотная последовательность имеет модификацию по одному или более аминокислотных остатков S32, V33, L39, L41, F69, V100, I113, F122, L123, V124, S125, G126, L127, G128, S151, H239 и/или E240, например, по 2, 3, 4, 5 или более из этих 17 остатков. Эти остатки пронумерованы в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 5; для того, чтобы соответствовать последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 2) на стадии роста цепи, нумерация должна изменяться на +26 (т.е. Ser-32 последовательности SEQ ID NO: 5 представляет собой Ser-58 последовательности SEQ ID NO: 2), и для того, чтобы соответствовать зрелой последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 4), нумерация должна изменяться на +7 (что также обеспечит легкое сравнение с источником 25, на который ссылаются).

Предпочтительные для мутации остатки представляют собой S32, V100, L123, V124, S125, G126, L127, G128, H239 и/или E240. Мутации по этим остаткам позволяют получать белки, обладающие хорошей стабильностью по сравнению с v2 дикого типа. В пределах данного подмножества предпочтительные остатки представляют собой S32, L123, V124, S125, G126, L127 и/или G128. Наиболее предпочтительные позиции представляют собой S32, L123, V124, S125, G126, L127 и/или G128, где остатки S32 и/или L123 являются особенно предпочтительными, например S32V и/или L123R. Когда один или более чем один из V100, S125 и/или G126 подвергался мутации, тогда предпочтительно, чтобы остаток за пределами этого трио тоже подвергался бы мутации.

Конкретный остаток может подвергаться делеции, но предпочтительно заменен на отличающуюся аминокислоту. Например, Ser-32 может быть заменен на любую из других 19 встречающихся в природе аминокислот. При осуществлении замены заменяющая аминокислота в некоторых воплощениях может представлять собой простую аминокислоту, такую как глицин или аланин. В других воплощениях заменяющая аминокислота представляет собой консервативную замену, например, она осуществляется в пределах следующих четырех групп: (1) кислотные, т.е. аспартат, глутамат; (2) основные, т.е. лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные, т.е. аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные, т.е. глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. В других воплощениях замена является не консервативной. В некоторых воплощениях в замене не используется аланин.

Предпочтительные замены по конкретным остаткам представляют собой следующие: S32V; V33C; L39C; L41C; F69C; V100T; I113S; F122C; L123R; V124I; S125G или S125T; G126D; L127I; G128A; S151C; H239R; E240H.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по E240, тогда эта замена не представляет собой замену на аланин, если только E240 подвергается мутации, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если оба остатка E240 и H239 подвергаются мутации. В идеале не только E240 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 с заменой по E240 также должна включать замену по второму остатку, например по E240 и H239 (см. мутанты #1 и #11).

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по F122, тогда эта замена не представляет собой замену на аланин, если только F122 подвергается мутации, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если оба остатка F122 и S151 подвергаются мутации. В идеале не только F122 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 с заменой по F122 также должна включать замену по второму остатку. Когда F122 подвергается замене, тогда предпочтительно, чтобы S151 также подвергался замене, например, оба подвергаются замене на цистеин, для того, чтобы обеспечить образование дисульфидной мостиковой связи (см. мутант #10).

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по L123, тогда эта замена не представляет собой замену на аланин, если только L123 подвергается мутации, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если оба остатка L123 и S32 подвергаются мутации. Если мутации подвергается исключительно L123, тогда замена на аргинин является предпочтительной (например, см. мутант #4). Тем не менее, в некоторых воплощениях не только L123 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 с заменой по L123 может также включать замену по второму остатку. Когда L123 подвергается замене, тогда может быть предпочтительно, чтобы: (1) S32 также подвергался замене, как видно в мутанте #3, и возможно S125 также подвергался замене, как видно в мутантах #20 и #22; или (2) один или более чем один из остатков 124-128 также подвергался(лись) замене, например, как видно в мутанте #12.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по V124, тогда предпочтительно, чтобы эта замена не представляла собой замену на аланин, если только V124 подвергается мутации, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если один или более чем один из остатков 123-128 также подвергался(лись)

мутации. Если мутации подвергается исключительно V124, тогда замена на изолейцин является предпочтительной. В идеале, однако, не только V124 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 с заменой по V124 может также включать замену по второму остатку. Когда V124 подвергается замене, тогда может быть предпочтительно, чтобы один или более чем один из остатков 124-128 также подвергался(лись) замене, например, как видно в мутанте #12.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по L127, то предпочтительно, чтобы эта замена не представляла бы собой замену на аланин, если мутации подвергается исключительно L127, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если один или более чем один из остатков 123-128 также подвергся(лись) мутации. Если мутации подвергся исключительно L127, тогда предпочтительна замена на изолейцин. Тем не менее, в идеале не только L127 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 с заменой по L127 должна также включать замену по второму остатку. Когда L127 подвергается замене, тогда предпочтительно, чтобы один или более чем один из остатков 124-128 также подвергался(лись) замене, например, как видно в мутанте #12.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по S32, тогда предпочтительно, чтобы эта замена не представляла бы собой замену на аланин, если мутации подвергается исключительно S32, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если мутации подвергаются оба остатка L123 и S32. Если мутации подвергается исключительно S32, то предпочтительна замена на валин. Тем не менее, в идеале не только S32 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 с заменой по S32 также должна включать замену по второму остатку. Когда S32 подвергается замене, тогда предпочтительно, чтобы (1) L123 также подвергался замене, например, как видно в мутанте #3, и возможно S125 также подвергался замене, как видно в мутантах #20 и #22; или (2) S125 также подвергался замене, например, как видно в мутантах #19 и #21.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по I113, тогда эта замена не представляла бы собой замену на аланин, если мутации подвергается исключительно I113, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б). Если мутации подвергается исключительно I113, то предпочтительна замена на серин, например, как видно в мутанте #7.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по V33, то она предпочтительно не представляет собой замену на изолейцин. Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по I113, тогда она предпочтительно не представляет собой замену на треонин или на аланин. Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по S151, тогда она предпочтительно не представляет собой замену на фенилаланин. Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v2 включает замену по H239 и E240, тогда она предпочтительно не представляет собой замену на R239 и Q240.

Когда осуществляют более чем одну замену, тогда они могут быть выбраны из групп 2А-2О в соответствии со следующим:

- 2А: остатки 239 и 240, например мутант #1.
- 2Б: остатки 32 и 123, например мутант #3.
- 2В: остатки 125 и 126, например мутант #5.
- 2Г: остатки 100, 125 и 126, например мутант #6.
- 2Д: остатки 33 и 39, например мутант #8.
- 2Е: остатки 41 и 69, например мутант #9.
- 2Ж: остатки 122 и 151, например мутант #10.
- 2З: остатки 100, 125, 126, 239 и 240, например мутант #11.
- 2И: остатки 32 и 125, например мутанты #19 и #21.
- 2К: остатки 32, 123 и 125, например мутанты #20 и #22.
- 2Л: остатки 33 и 39, оба заменены на Cys, например мутант #8.
- 2М: остатки 41 и 69, оба заменены на Cys, например мутант #9.
- 2Н: остатки 122 и 151, оба заменены на Cys, например мутант #10.
- 2О: остатки 123, 124, 125, 126, 127 и 128, например мутант #12.
- 2П: остатки 32, 123, 124, 125, 126, 127 и 128.

Таким образом, например, если должен быть заменен остаток 239, то предпочтительный второй остаток для замены представляет собой 240 (т.е. группа 2А); кроме того, остатки 100, 125 и 126 также могут быть модифицированы (т.е. группа 2З, которая представляет собой комбинацию групп 2А и 2Г). В группах 2А-2О и 2П предпочтительные замены в указанных позициях представляют собой замены, перечисленные выше. Для групп 2Л, 2М и 2Н в изобретение должна быть введена дисульфидная мостиковая связь. В пределах групп 2А-2О предпочтительные мутанты представляют собой 2А, 2Б, 2В, 2Г, 2И, 2К и 2О. Более предпочтительными являются 2В, 2И и 2О, причем 2О является особенно предпочтительной. В группе 2Б предложены наиболее предпочтительные мутации, и, в частности, S32V и L123R (например, последовательности SEQ ID NO: 20 и 45). Группа 2П представляет собой еще один предпочтительный

набор мутаций, которые комбинируют 2Б, 2В и три другие мутации (например, для получения последовательности SEQ ID NO: 58).

Аминокислотные остатки, указанные для мутации в последовательности v2, нумеруются в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 5, полученной из штамма 2996. Соответствующие аминокислотные остатки в v2 fHbp из любого другого штамма, могут быть легко идентифицированы при помощи выравнивания последовательностей, например, представлять собой аминокислоту, которая при выравнивании с последовательностью SEQ ID NO: 5 с использованием алгоритма попарного выравнивания (например, алгоритма глобального выравнивания Нидлемана-Вунша, подробно описанного ниже), оказывается выровненной с упомянутой здесь аминокислотой. Часто аминокислота является той же самой, как видно в последовательности SEQ ID NO: 5 (например, остаток 32 представляет собой серин), но выравнивание легче осуществлять в ином случае.

Помимо мутации(й), указанных выше, которые служат для повышения стабильности, полипептид по изобретению может включать одну или более чем одну дополнительную мутацию, например, для нарушения взаимодействия полипептида с сидерофорами или, более предпочтительно, для нарушения способности полипептида связываться с fH.

В источниках 19 и 25 сообщается о том, что взаимодействие между fH и v2 fHbp может быть нарушено при помощи мутаций по остаткам R80, D211, E218, E248, T220+H222 (двойная мутация) и G236. Будучи пронумерованными в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 5, эти остатки представляют собой R73, D203, E210, E240, T213+H215 и G228. Из этих позиций предпочтительны полипептиды, подвергшиеся мутации по D203, E210 или T213+H215, поскольку в источнике 25 не сообщается о повреждении важных эпитопов у этих мутантов. Специфические замены, исследованные в источнике 25, представляли собой R73A, D203A, E210A, T213A+H215A, G228I и E240A; эти замены подходят для применения в соответствии с изобретением.

В источнике 24 сообщается о том, что взаимодействие между fH и v2 fHbp может быть нарушено посредством мутаций по остаткам R145, S193, F194, L195, A265, E267, K268, V272, I273, L274, E283, T286, H288, F292, T304 и E313, и E283+T304 (двойная мутация). Будучи пронумерованными в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 5, эти остатки представляют собой R73, S121, F122, L123, A192, E194, K195, V199, I200, L201, E210, T213, H215, F219, T231 и E240, и E210+T231. Четыре из них перекрываются с источником 25 (E210, T213, H215, E240). Специфические замены, исследованные в источнике 24, использовали аланин (за исключением A265P и T304E), и эти замены подходят для применения в соответствии с изобретением.

В источнике 24 сообщается о том, что некоторые замены в v2 могут повышать аффинность к fH, что необходимо избегать в том случае, если предполагается нарушить связывание с fH, например, E85 в последовательности SEQ ID NO: 5 (остаток 157 в источнике 24).

Остатки, которые взаимодействуют с сидерофорами, могут подвергаться мутации с использованием руководства, приведенного в источниках 16 и 34, например, путем выравнивания последовательности SEQ ID NO: 5 с последовательностью SEQ ID NO: 4 из источника 16 для идентификации остатков, которые могут взаимодействовать с сидерофорами, например, с катехолатами, гидроксаматами или карбоксилатами.

Другие остатки, которые могут подвергаться мутации, включают S23, L24, D30, Q31, R34, D95 и/или L102, но не ограничиваются ими, например, с использованием мутаций, предложенных в источнике 27.

Полипептид в соответствии с первым воплощением может содержать любую из последовательностей SEQ ID NO: 18-36. Аналогично, принимая во внимание мутацию "ΔG" (т.е. усечение N-конца на стадии роста цепи и включение нативной последовательности поли-Gly), полипептид в соответствии с первым воплощением может содержать любую из последовательностей SEQ ID NO: 18-36, за исключением аминокислот 1-26 в ней. Например, полипептид в соответствии с первым воплощением может содержать последовательность SEQ ID NO: 45 или может содержать последовательность SEQ ID NO: 58.

Рассматривая возможность дополнительных точечных мутаций (например, для нарушения взаимодействий с сидерофорами и/или fH), полипептид в соответствии с первым воплощением может содержать любую из последовательностей SEQ ID NO: 18-36 (или любую из последовательностей SEQ ID NO: 18-36 за исключением их аминокислот 1-26, такую как последовательность SEQ ID NO: 45), но быть модифицирован путем единичных изменений аминокислот в количестве до 5 (т.е. 1, 2, 3, 4 или 5 единичных аминокислотных замен, делеций и/или вставок), при условии, что модифицированная последовательность может после введения животному-хозяину вызывать образование антител, которые связываются с менингококковым полипептидом fHbp, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46. Такие изменения аминокислот не должны изменять мутации в этих последовательностях на противоположные относительно последовательности дикого типа, например, последовательность SEQ ID NO: 45 не должна подвергаться мутации по остатку V32 или R123.

В изобретении также предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность fHbp v2, где аминокислотная последовательность v2 идентична аминокислотной последовательности v2 дикого типа за исключением мутации по аминокислотной позиции, соответствующей Leu-123 в последо-

вательности SEQ ID NO: 5, при условии, что мутация не представляет собой замену на аланин (например, когда мутация представляет собой замену на аргинин). Например, полипептид может содержать последовательность SEQ ID NO: 5, но с мутацией (отличающейся от L123A) по L123.

Последовательности SEQ ID NO: 59 и 60 представляют собой два дополнительных примера мутантов v2, а именно зрелую форму мутантов #3 и #4 для штамма 8047.

Мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 17.

Полипептиды в соответствии со вторым воплощением изобретения содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере j% идентичность последовательности SEQ ID NO: 17, и/или содержат фрагмент последовательности SEQ ID NO: 17. Тем не менее, по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 17, эта аминокислотная последовательность имеет модификацию по одному или более чем одному из аминокислотных остатков S32, L33, L39, L41, F72, V103, T116, F125, L126, V127, S128, G129, L130, G131, S154, H242 и/или E243, например, по 2, 3, 4, 5 или более из 17 остатков. Эти остатки пронумерованы в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 17; для того, чтобы соответствовать последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 3) на стадии роста цепи, нумерацию следует изменять на +31 (т.е. Ser-32 в последовательности SEQ ID NO: 17 представляет собой Ser-63 в последовательности SEQ ID NO: 3), и для того, чтобы соответствовать зрелой последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 40), нумерация должна изменяться на +12.

Предпочтительные остатки для мутации представляют собой S32, V103, L126, V127, S128, G129, L130, G131, H242 и/или E243. В этой подгруппе предпочтительные остатки представляют собой S32, L126, V127, S128, G129, L130 и/или G131. Наиболее предпочтительные позиции представляют собой S32, L126, V127, S128, G129, L130 и/или G131, где остатки S32 и/или L126 являются особенно предпочтительными, например S32V и/или L126R.

Конкретный остаток может подвергаться делеции, но предпочтительно заменен на отличающуюся аминокислоту. Например, Ser-32 может быть заменен на любую из других 19 встречающихся в природе аминокислот. При осуществлении замены заменяющая аминокислота в некоторых воплощениях может представлять собой простую аминокислоту, такую как глицин или аланин. В других воплощениях заменяющая аминокислота представляет собой консервативную замену, например, она осуществляется в пределах следующих четырех групп: (1) кислотные, т.е. аспартат, глутамат; (2) основные, т.е. лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные, т.е. аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные, т.е. глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. В других воплощениях замена является не консервативной. В некоторых воплощениях в замене не используется аланин.

Предпочтительные замены по конкретным остаткам представляют собой следующие: S32V; I33C; L39C; L41C; F72C; V103T; T116S; F125C; L126R; V127I; S128G или S128T; G129D; L130I; G131A; S154C; H242R; E243N.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по E243, тогда эта замена не представляет собой замену на аланин, если только E243 подвергается мутации, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если оба остатка E243 и H242 подвергаются мутации. В идеале не только E243 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 с заменой по E243 также должна включать замену по второму остатку, например, по обоим E243 и H242.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по F125, тогда эта замена не представляет собой замену на аланин, если только F125 подвергается мутации, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если оба остатка F125 и S154 подвергаются мутации. В идеале не только F125 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 с заменой по F125 также должна включать замену по второму остатку. Когда F125 подвергается замене, тогда предпочтительно, чтобы S154 также подвергся замене, например, оба подвергаются замене на цистеин, для того, чтобы дать возможность для образования дисульфидной мостиковой связи.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по L126, тогда эта замена не представляет собой замену на аланин, если только L126 подвергается мутации, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если оба остатка L126 и S32 подвергаются мутации. Если мутации подвергается исключительно L126, тогда замена на аргинин является предпочтительной. Тем не менее, в некоторых воплощениях не только L126 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 с заменой по L126 может также включать замену по второму остатку. Когда L126 подвергается замене, тогда может быть предпочтительно, чтобы: (1) S32 также подвергся замене, и возможно S128 также подвергся замене; или (2) один или более чем один из остатков 127-131 также подвергся(лись) замене.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по V127, тогда предпочтительно, чтобы эта замена не представляла собой замену на аланин, если только V127 подвергается мутации, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, пе-

речисленная в (б), например, если один или более чем один из остатков 126-131 также подвергается мутации. Если мутации подвергается исключительно V127, тогда замена на изолейцин является предпочтительной. Тем не менее, в идеале не только V127 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 с заменой по V127 также должна включать замену по второму остатку. Когда V127 подвергается замене, тогда предпочтительно, чтобы один или более чем один из остатков 127-131 также подвергался(лись) замене.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по L130, то предпочтительно, чтобы эта замена не представляла собой замену на аланин, если мутации подвергается исключительно L130, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если один или более чем один из остатков 126-131 также подвергся(лись) мутации. Если мутации подвергся исключительно L130, тогда предпочтительна замена на изолейцин. Тем не менее в идеале не только L130 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 с заменой по L130 должна также включать замену по второму остатку. Когда L130 подвергается замене, тогда предпочтительно, чтобы один или более чем один из остатков 127-131 также подвергался(лись) замене.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по S32, тогда предпочтительно, чтобы эта замена не представляла собой замену на аланин, если мутации подвергается исключительно S32, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б), например, если мутации подвергаются оба остатка L126 и S32. Если мутации подвергается исключительно S32, то предпочтительна замена на валин. Тем не менее в идеале не только S32 подвергается мутации, и, таким образом, мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 с заменой по S32 должна также включать замену по второму остатку. Когда S32 подвергается замене, тогда предпочтительно, чтобы (1) L126 также подвергался замене, и возможно S128 также подвергался замене; или (2) S128 также подвергался замене.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по T113, тогда эта замена не представляет собой замену на аланин, если мутации подвергается исключительно T113, хотя замена может быть на аланин, если замене подвергается еще одна аминокислота, перечисленная в (б). Если мутации подвергается исключительно T113, то предпочтительна замена на серин.

Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по I33, то она предпочтительно не представляет собой замену на валин. Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по T116, то она предпочтительно не представляет собой замену на изолейцин. Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по G129, то она предпочтительно не представляет собой замену на серин. Когда мутантная аминокислотная последовательность fHbr v3 включает замену по H242 и E243, тогда она предпочтительно не представляет собой замену на R242 и Q243.

Когда осуществляют более чем одну замену, тогда они могут быть выбраны из групп 3А-3О в соответствии со следующим:

- 3А: остатки 242 и 243.
- 3Б: остатки 32 и 126.
- 3В: остатки 128 и 129.
- 3Г: остатки 103, 128 и 129.
- 3Д: остатки 33 и 39.
- 3Е: остатки 41 и 72.
- 3Ж: остатки 125 и 154.
- 3З: остатки 103, 128, 129, 242 и 243.
- 3И: остатки 32 и 128.
- 3К: остатки 32, 126 и 128.
- 3Л: остатки 33 и 39, оба заменены на Cys.
- 3М: остатки 41 и 72, оба заменены на Cys.
- 3Н: остатки 125 и 154, оба заменены на Cys.
- 3О: остатки 126, 127, 128, 129, 130 и 131.
- 3П: остатки 32, 126, 127, 128, 129, 130 и 131.

Таким образом, например, если должен быть заменен остаток 242, то предпочтительный второй остаток для замены представляет собой 243 (т.е. группа 3А); кроме того, остатки 103, 128 и 129 также могут быть модифицированы (т.е. группа 3З, которая представляет собой комбинацию групп 3А и 3Г). В группах 3А-3О и 3П предпочтительные замены в указанных позициях представляют собой замены, перечисленные выше. Для групп 3Л, 3М и 3Н в изобретение должна быть введена дисульфидная мостиковая связь. В пределах групп 3А-3О предпочтительные мутанты представляют собой 3А, 3Б, 3В, 3Г, 3И, 3К и 3О. Более предпочтительными являются 3В, 3И и 3О, причем 3О является особенно предпочтительной. В группе 3Б предложены наиболее предпочтительные мутации, и, в частности, S32V и L126R (например, содержащая последовательность SEQ ID NO: 44). Группа 3П представляет собой еще один предпочтительный набор мутаций, которые комбинируют 3Б, 3В и три другие мутации (например, для получения

последовательности SEQ ID NO: 61). Мутация L126R также обеспечивает получение последовательности SEQ ID NO: 53.

Аминокислотные остатки, указанные для мутации в последовательности v3, нумеруются в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 17, полученной из штамма M1239. Соответствующие аминокислотные остатки в v3 fHbp из любого другого штамма могут быть легко идентифицированы посредством выравнивания последовательностей, например, представлять собой аминокислоту, которая при выравнивании с последовательностью SEQ ID NO: 17 с использованием алгоритма попарного выравнивания (например, алгоритма глобального выравнивания Нидлемана-Вунша, подробно описанного ниже), оказывается выровненной с упомянутой здесь аминокислотой. Часто аминокислота является той же самой, как видно в последовательности SEQ ID NO: 17 (например, остаток 32 представляет собой серин), но выравнивание легче осуществлять не в этом случае.

Помимо мутации(й), указанных выше, которые служат для повышения стабильности, полипептид по изобретению может включать одну или более чем одну дополнительную мутацию, например, для нарушения взаимодействия полипептида с сидерофорами или, более предпочтительно, для нарушения способности полипептида связываться с fH.

В источнике 24 сообщается о том, что взаимодействие между fH и v3 fHbp может быть нарушено посредством мутаций по остаткам Q107, I147, L156, A157, L195, V196, V272, E283, T286, T304, V311, E313 и E283+T304 (двойная мутация). Будучи пронумерованными в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 17, эти остатки представляют собой Q35, I78, L87, A88, L126, V127, V202, E213, T216, T234, V241, E243 и E213+T234. В специфических заменах, исследованных в источнике 24, использовали аланин (за исключением A157E и T231E), и эти замены подходят для применения в соответствии с изобретением. Об остатках T216 и E243 также сообщали в источнике 23. В источнике 27 сообщается о том, что взаимодействие между fH и v3 fHbp может быть нарушено путем мутаций по остаткам H288 и G318 (нумерация H218 и G248 в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 17), и эти замены подходят для применения в соответствии с изобретением, например, H218R, G248D.

В источнике 24 сообщается о том, что некоторые замены в v3 могут повышать аффинность к fH, и последнего необходимо избегать в том случае, если предполагается нарушить связывание с fH, например, P44 в последовательности SEQ ID NO: 17 (остаток 106 в источнике 24).

Остатки, которые взаимодействуют с сидерофорами, могут подвергаться мутации с использованием руководства, приведенного в источниках 16 и 34, например, путем выравнивания последовательности SEQ ID NO: 17 с последовательностью SEQ ID NO: 4 из источника 16 для идентификации остатков, которые могут взаимодействовать с сидерофорами, например, с катехолатами, гидроксаматами или карбоксилатами.

Полипептид в соответствии со вторым воплощением может содержать любую из последовательностей SEQ ID NO: 41-44. Рассматривая возможность дополнительных точечных мутаций (например, для нарушения взаимодействий с сидерофорами и/или fH), полипептид в соответствии с первым воплощением может содержать любую из последовательностей SEQ ID NO: 41-44, но быть модифицирован путем единичных изменений аминокислот в количестве до 5 (т.е. 1, 2, 3, 4 или 5 единичных аминокислотных замен, делеций и/или вставок), при условии, что модифицированная последовательность может после введения животному-хозяину вызывать образование антител, которые связываются с менингококковым полипептидом fHbp, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40. Такие изменения аминокислот не должны изменять мутации в этих последовательностях на противоположные относительно последовательности дикого типа, например, последовательность SEQ ID NO: 44 не должна подвергаться мутации по остатку V32 или R126.

В изобретении также предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность fHbp v3, где аминокислотная последовательность v3 идентична аминокислотной последовательности v3 дикого типа за исключением мутации по аминокислотной позиции, соответствующей Leu-126 в последовательности SEQ ID NO: 17, при условии, что мутация не представляет собой замену на аланин (например, когда мутация представляет собой замену на аргинин). Например, полипептид может содержать последовательность SEQ ID NO: 17, но с мутацией (отличающейся от L126A) по L126.

Полипептиды.

Полипептиды по изобретению могут быть получены различными способами, например, путем химического синтеза (по меньшей мере частично), путем расщепления более длинных полипептидов с использованием протеаз, путем трансляции с РНК, путем очистки из культуры клеток (например, из культуры рекомбинантных экспрессирующих клеток или из культуры *N. meningitidis*) и т.д. Предпочтительным путем экспрессии является гетерологическая экспрессия в хозяине *E. coli*.

Полипептиды по изобретению теоретически имеют длину, составляющую по меньшей мере 100 аминокислот, например 150ак, 175ак, 200ак, 225ак или длиннее. Они включают мутантную аминокислотную последовательность fHbp v2 и/или v3, и мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 или v3 аналогично должна иметь длину, составляющую по меньшей мере 100 аминокислот, например 150ак, 175ак, 200ак, 225ак или длиннее.

fHbp является природным липопротеином *N. meningitidis*. Также обнаружено, что он липидизирует-

ся при экспрессии в *E. coli* с нативной лидерной последовательностью или с гетерологичными лидерными последовательностями. Полипептиды по изобретению могут иметь N-концевой остаток цистеина, который может быть липидизирован, например, содержать группу пальмитоила, обычно с образованием трипальмитоил-S-глицерилцистеина. В других воплощениях полипептиды не липидизированы.

Полипептиды предпочтительно получают в по существу чистой или по существу выделенной форме (т.е. в форме, по существу не содержащей других полипептидов *Neisseria* или клеток-хозяев). Как правило, полипептиды предложены в неприродном окружении, например, они отделены от природной окружающей среды. В некоторых воплощениях полипептид представлен в композиции, которая обогащена полипептидом по сравнению с исходным материалом. Таким образом, предложен очищенный полипептид, при этом очищенный означает, что полипептид представлен в композиции, которая по существу не содержит других экспрессированных полипептидов, при этом по существу не содержащий означает, что более чем 50% (например 75% и более, 80% и более, 90% и более, 95% и более или 99% и более) от всех полипептидов в композиции представляют собой полипептид по изобретению.

Полипептиды могут принимать различные формы (например, нативную, слитые, гликозилированную, негликозилированную, липидизированную, с дисульфидными мостиковыми связями и т.д.).

Последовательности SEQ ID NO 4, 5, 17 и 40 не включают N-концевой метионин. Если полипептид по изобретению получают путем трансляции в биологическом хозяине, то требуется стартовый кодон, который будет обеспечивать наличие N-концевого метионина у большинства хозяев. Таким образом, полипептид по изобретению будет по меньшей мере на стадии роста цепи включать остаток метионина, расположенный выше относительно указанной последовательности SEQ ID NO.

Отщепление последовательностей на стадии роста цепи означает, что мутантная аминокислотная последовательность v2 или v3 сама может представлять N-конец полипептида. Тем не менее, в других воплощениях полипептид по изобретению может включать N-концевую последовательность, расположенную выше относительно мутантной аминокислотной последовательности fHbr v2 или v3. В некоторых воплощениях полипептид имеет один метионин на N-конце, непосредственно за которым следует мутантная аминокислотная последовательность v2 или v3; в других воплощениях может быть использована более длинная расположенная выше последовательность. Такая расположенная выше последовательность может быть короткой (например, 40 или меньше аминокислот, т.е. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают лидерные последовательности для направления транспортирования белка или короткие пептидные последовательности, которые облегчают клонирование или очистку (например, гистидиновая концевая метка, т.е. His_n, где n=4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10). Другие подходящие N-концевые аминокислотные последовательности будут понятны для специалистов в данной области техники, например, нативные расположенные выше последовательности, представленные в последовательности SEQ ID NO: 2 или последовательности SEQ ID NO: 3.

Полипептид по изобретению также может включать аминокислоты, расположенные ниже концевой аминокислоты мутантной аминокислотной последовательности fHbr v2 или v3. Такие C-концевые удлинения могут быть короткими (например 40 или меньше аминокислот, т.е. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают последовательности для управления транспортированием белков, короткие пептидные последовательности, которые облегчают клонирование или очистку (например, содержащие гистидиновую концевую метку, т.е. His_n, где n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10), или последовательности, которые повышают стабильность полипептида. Другие подходящие C-концевые аминокислотные последовательности будут понятны специалистам в данной области техники.

В некоторых воплощениях в изобретении исключены полипептиды, которые включают гистидиновую концевую метку (см. источники 24 и 25), и, в частности, гексагистидиновую концевую метку по C-концу.

Термин "полипептид" относится к аминокислотным полимерам любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и он может прерываться остатками, отличными от аминокислотных. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или в результате вмешательства; например, путем образования дисульфидной мостиковой связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или путем любой другой обработки или модификации, такой как конъюгирование с агентом мечения. Также в указанное определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более чем один аналог аминокислот (включающий, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в области техники. Полипептиды могут существовать в виде единичных цепей или ассоциированных цепей.

Полипептиды по изобретению могут быть связаны или иммобилизованы на твердом носителе.

Полипептиды по изобретению могут содержать регистрируемую метку, например, радиоактивную метку, флуоресцирующую метку или биотинную метку. Такие полипептиды особенно полезны в способах иммуноанализа.

Как раскрыто в источнике 164, fHbr могут быть разделены на три домена, названные А, В и С. В

отношении последовательности SEQ ID NO: 1 три домена представляют собой (A) 1-119, (B) 120-183 и (C) 184-274:

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSV
 RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVY
KQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSCKMVAKROFRIGDIAGENTSFDKLP EGGRATYRGT
AFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLY
 NQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAACKQ

Зрелую форму домена "А" от Cys-20 на его N-конце до Lys-119 называют "А_{зрелый}".

Известно множество последовательностей fHbp, и их можно легко выравнивать, используя стандартные способы. Путем таких выравниваний специалист в данной области техники может идентифицировать (а) домены "А" (и "А_{зрелый}"), "В" и "С" в любой заданной последовательности fHbp путем сравнения с координатами в последовательности MC58, и (б) единичные остатки в множественных последовательностях fHbp, например, для идентификации замен. Тем не менее для упрощения ссылок домены определены ниже:

Домен "А" в данной последовательности fHbp представляет собой фрагмент такой последовательности, который при выравнивании с последовательностью SEQ ID NO: 1 с использованием алгоритма попарного выравнивания начинается с аминокислоты, выравниваемой с Met-1 последовательности SEQ ID NO: 1, и заканчивается аминокислотой, выравниваемой с Lys-119 последовательности SEQ ID NO: 1

Домен "А_{зрелый}" в данной последовательности fHbp представляет собой фрагмент такой последовательности, который при выравнивании с последовательностью SEQ ID NO: 1 с использованием алгоритма попарного выравнивания начинается с аминокислоты, выравниваемой с Cys-20 последовательности SEQ ID NO: 1, и заканчивается аминокислотой, выравниваемой с Lys-119 последовательности SEQ ID NO: 1.

Домен "В" в данной последовательности fHbp представляет собой фрагмент такой последовательности, который при выравнивании с последовательностью SEQ ID NO: 1 с использованием алгоритма попарного выравнивания начинается с аминокислоты, выравниваемой с Gln-120 последовательности SEQ ID NO: 1, и заканчивается аминокислотой, выравниваемой с Gly-183 последовательности SEQ ID NO: 1.

Домен "С" в данной последовательности fHbp представляет собой фрагмент такой последовательности, который при выравнивании с последовательностью SEQ ID NO: 1 с использованием алгоритма попарного выравнивания начинается с аминокислоты, выравниваемой с Lys-184 последовательности SEQ ID NO: 1, и заканчивается аминокислотой, выравниваемой с Gln-274 последовательности SEQ ID NO: 1.

Предпочтительным алгоритмом попарного выравнивания для определения доменов является алгоритм глобального выравнивания Нидлемана-Вунша [158] с использованием параметров по умолчанию (например, с использованием штрафа на внесение делеции в выравнивание =10,0 и штрафа на продолжение делеции = 0,5, используя матрицу подсчета EBLOSUM62). Такой алгоритм удобно реализован в инструменте needle в пакете EMBOSS [159].

В некоторых воплощениях мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 или v3 по изобретению усечена для удаления ее домена А. Тем не менее, как правило, тогда предпочтительно, чтобы мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 или v3 должна была включать как N-концевую β-бочку, так и С-концевую β-бочку.

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

Полипептиды по изобретению, как правило, состоят из искусственной аминокислотной последовательности, а именно последовательности, которая не представлена у природных менингококков.

Аффинность к фактору Н может быть количественно определена с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например, раскрытого в источниках 18 и 21-24 с иммобилизованным человеческим fH. Предпочтительны мутации, которые приводят к уменьшению аффинности (т.е. увеличению константы диссоциации K_D) по меньшей мере в 10 раз, и в идеале по меньшей мере в 100 раз (при измерении в тех же самых экспериментальных условиях относительно того же самого полипептида, но без мутации).

Нуклеиновые кислоты.

В изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая определенный выше полипептид по изобретению.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть получены различными способами, например, путем химического синтеза (например, путем фосфорамидитного синтеза ДНК) полностью или частично, путем расщепления более длинных нуклеиновых кислот с использованием нуклеаз (например, ферментов рестрикции), путем связывания более коротких нуклеиновых кислот или нуклеотидов (например, с

использованием лигаз или полимераз), из библиотек геномной или кДНК и т.д.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут принимать различные формы, например одноцепочечные, двухцепочечные, векторы, праймеры, зонды, меченые, немеченые и т.д.

Нуклеиновые кислоты по изобретению предпочтительно находятся в выделенной или по существу выделенной форме.

Термин "нуклеиновая кислота" включает ДНК и РНК, а также их аналоги, такие как аналоги, содержащие модифицированные скелеты, а также пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) и т.д.

Нуклеиновая кислота по изобретению может быть меченой, например, при помощи радиоактивной или флуоресцентной метки.

В изобретении также предложены векторы (такие как плазмиды), содержащие нуклеотидные последовательности по изобретению (например, клонирующие или экспрессирующие векторы, такие как векторы, подходящие для иммунизации нуклеиновыми кислотами) и клетки-хозяева, трансформированные такими векторами.

Бактерицидные ответы

Предпочтительные полипептиды по изобретению могут вызывать ответы в виде антител, которые являются бактерицидными по отношению к менингококкам. Образование бактерицидных антител обычно измеряют у мышей, и они являются стандартным показателем эффективности вакцины (например, см. заключительное примечание 14 в источнике 37; также источник 38).

Полипептиды в соответствии с первым воплощением изобретения могут предпочтительно вызывать ответы в виде антител, которые являются бактерицидными по отношению к штамму *N. meningitidis*, который экспрессирует последовательность v2 fHbp, например одному или более чем одному из штаммов 961-5945, 2996, 96217, 312294, 11327, a22, gb013 (=M01-240013), e32, m1090, m4287, 860800, 599, 95N477, 90-18311, c11, m986, m2671, 1000, m1096, m3279, bz232, dk353, m3697, ngh38, и/или L93/4286. Бактерицидные ответы могут быть определены, например, против var2 штамма M2091 (ATCC (Американская коллекция типовых культур) 13091).

Предпочтительные полипептиды в соответствии с первым воплощением изобретения могут вызывать образование у мышей антител, которые являются бактерицидными против штамма M2091 в бактерицидном анализе на сыворотке крови.

Полипептиды в соответствии со вторым воплощением изобретения могут предпочтительно вызывать ответы в виде антител, которые являются бактерицидными по отношению к штамму *N. meningitidis*, который экспрессирует последовательность v3 fHbp, например одному или более чем одному из штаммов M1239, 16889, gb355 (=M01-240355), m3369, m3813, ngp165. Например, бактерицидные ответы могут быть определены в отношении var3 штамма M01-240355, который представляет собой референсный штамм *Neisseria* MLST (идентификационный номер 19265 в источнике 27), который был полностью секвенирован (см. EMBL ID CP002422 [27]).

Предпочтительные полипептиды в соответствии со вторым воплощением изобретения могут вызывать образование у мышей антител, которые являются бактерицидными против штамма M01-240355 в бактерицидном анализе на сыворотке крови.

Например, иммуногенная композиция, содержащая эти полипептиды, может обеспечивать бактерицидный титр в сыворотке крови не меньше 1:4 с использованием анализа Гольпнайндера с человеческим комплементом [27-28, 29] и/или обеспечивать бактерицидный титр в сыворотке крови не меньше 1:128 с использованием комплемента крольчонка.

Иммунизация.

Полипептиды по изобретению могут быть использованы в качестве активного ингредиента иммуногенных композиций, и, таким образом, в изобретении предложена иммуногенная композиция (например, вакцина), содержащая полипептид по изобретению.

В изобретении также предложен способ для индуцирования антительного ответа у млекопитающего, включающий введение млекопитающему иммуногенной композиции по изобретению. Антительный ответ предпочтительно представляет собой ответ в виде защитного и/или бактерицидного антитела. В изобретении также предложены полипептиды по изобретению для применения в таких способах.

В изобретении также предложен способ защиты млекопитающего от инфекции, вызванной *Neisseria* (например, менингококковой инфекции), включающий введение млекопитающему иммуногенной композиции по изобретению.

В изобретении предложены полипептиды по изобретению для применения в качестве лекарственных средств (например, в качестве иммуногенных композиций или в качестве вакцин) или в качестве диагностических реагентов. В изобретении также предложено применение нуклеиновой кислоты или полипептида по изобретению в изготовлении лекарственного средства для предупреждения инфекции, вызванной *Neisseria* (например, менингококковой инфекции), у млекопитающего.

Млекопитающее предпочтительно представляет собой человека. Человек может представлять собой взрослого человека или предпочтительно ребенка. В том случае, когда вакцина предназначена для профилактического применения, тогда человек предпочтительно представляет собой ребенка (например, ребенка раннего возраста или новорожденного); в том случае, когда вакцина предназначена для терапев-

тического применения, тогда человек предпочтительно представляет собой взрослого человека. Вакцина, предназначенная для детей, также может быть введена взрослым людям, например для оценки безопасности, дозы, иммуногенности и т.д.

Применения и способы особенно полезны для предупреждения/лечения заболеваний, включая менингит (в частности, бактериальный, такой как менингококковый менингит) и бактериемию, но не ограничивающихся ими. Например, они подходят для активной иммунизации индивидов против инвазивного менингококкового заболевания, вызванного *N.meningitidis* (например, в серогруппе B).

Эффективность терапевтического лечения можно проверить при помощи мониторинга вызванной *Neisseria* инфекции после введения композиции по изобретению.

Эффективность профилактического лечения можно тестировать посредством мониторинга иммунных ответов против fHbp после введения композиции. Иммуногенность композиций по изобретению можно определить путем их введения тестируемым субъектам (например, детям в возрасте 12-16 месяцев или в моделях на животных) и последующего определения стандартных параметров, включающих бактерицидные антитела сыворотки крови (SBA) и титры ELISA (иммуноферментный анализ) (GMT). Эти иммунные ответы, как правило, можно определить приблизительно через 4 недели после введения композиции и сравнить со значениями, определенными до введения композиции. Предпочтительным является увеличение SBA по меньшей мере в 4 раза или 8 раз. При введении более одной дозы композиции можно осуществить более одного определения после введения.

Предпочтительные композиции по изобретению могут приводить к титру антител у пациента, который превосходит критерий серологической защиты в отношении каждого антигенного компонента для приемлемой процентной доли людей. Хорошо известны антигены с ассоциированным титром антител, выше которых хозяина рассматривают как сероконвертированного против антигена, и такие титры публикуются такими организациями, как ВОЗ (Всемирная Организация Здравоохранения). Предпочтительно сероконвертированными являются более чем 80% статистически значимых образцов субъектов, более предпочтительно более чем 90%, еще более предпочтительно более чем 93% и наиболее предпочтительно 96-100%.

Композиции по изобретению, как правило, можно будет непосредственно вводить пациенту. Прямую доставку можно осуществлять путем парентеральной инъекции (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно или в интерстициальное пространство ткани) или путем ректального, перорального, вагинального, местного, трансдермального, интраназального, глазного, ушного, легочного или другого введения через слизистую оболочку. Предпочтительным является внутримышечное введение в бедро или плечо. Инъекцию можно осуществлять посредством иглы (например, иглы для подкожных инъекций), но альтернативно можно использовать безыгольную инъекцию. Типичная внутримышечная доза составляет приблизительно 0,5 мл.

Изобретение можно использовать для того, чтобы вызвать системный и/или мукозный иммунитет.

Лечение при помощи доз может быть осуществлено по схеме с разовой дозой или по схеме с использованием дробных доз. Дробные дозы можно использовать в схеме первичной иммунизации и/или в схеме бустер-иммунизации. После схемы введения первичных доз может следовать схема введения бустер-доз. Подходящий период времени между возбуждающими дозами (например, от 4 до 16 недель) и между примирением и реиммунизацией можно определить стандартными способами.

Иммуногенная композиция по изобретению, как правило, будет включать фармацевтически приемлемый носитель, который может представлять собой любое вещество, которое само по себе не вызывает продукцию антител, опасных для пациента, получающего композицию, и которое можно вводить, не опасаясь чрезмерной токсичности. Фармацевтически приемлемые носители могут включать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Вспомогательные вещества, такие как увлажнители или эмульгаторы, вещества pH-буферов и т.п., также могут быть представлены в таких разбавителях. Всестороннее обсуждение подходящих носителей приведено в источнике 27.

Инфекции, вызванные *Neisseria*, поражают различные области организма и, следовательно, композиции по изобретению могут быть приготовлены в различных формах. Например, композиции могут быть приготовлены в виде инъекционных препаратов, либо в виде жидких растворов или суспензий. Также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких разбавителях перед инъекцией. Композиция может быть приготовлена для местного введения, например в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть приготовлена для перорального введения, например в виде таблетки или капсулы, или в виде сиропа (возможно с корригентами). Композиция может быть приготовлена для легочного введения, например в виде ингалятора с использованием тонкодисперсного порошка или спрея. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория или пессария. Композиция может быть приготовлена для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Наиболее предпочтительны композиции, подходящие для парентеральной инъекции.

Композиция предпочтительно является стерильной. Предпочтительно, композиция является апиrogenной. Предпочтительно, она забуферена, например при pH от 6 до 8, как правило приблизительно при pH 7. В том случае, когда композиция содержит соль гидроксида алюминия, предпочтительно используют гистидиновый буфер [27]. Композиции по изобретению могут быть изотоничными для людей.

Иммуногенные композиции содержат иммунологически эффективное количество иммуногена, а также, при необходимости, любые другие определенные компоненты. Под "иммунологически эффективным количеством" подразумевают, что введение такого количества индивиду или в разовой дозе, или в виде части серий доз, является эффективным для лечения или предупреждения. Термин "предупреждение" означает, что прогресс заболевания уменьшается и/или устраняется, или что устраняется возникновение заболевания. Например, иммунная система субъекта может быть примирована (например, путем вакцинации) для запуска иммунного ответа и подавления инфекции, таким образом, что устраняется возникновение заболевания. Таким образом, вакцинируемый субъект может быть инфицирован, но обладает более хорошей способностью бороться с инфекцией по сравнению с контрольным субъектом. Такое количество варьирует в зависимости от состояния здоровья и физического состояния пациента, которого лечат, возраста, таксономической группы пациента, которого лечат (например, примата, отличающегося от человека, примата и т.д.), способности иммунной системы индивида синтезировать антитела, степени желаемой защиты, композиции вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других релевантных факторов. Ожидают, что количество будет оказываться в относительно широком диапазоне, который может быть определен в стандартных испытаниях. Лечение при помощи доз может быть осуществлено по схеме с использованием разовой дозы или по схеме с использованием дробных доз (например, включающей бустер-дозы). Композицию можно вводить в сочетании с другими иммунорегулирующими агентами.

Адьюванты, которые могут быть использованы в композициях по изобретению, включают нерастворимые соли металлов, эмульсии масло-в-воде (например, MF59 или AS03, обе содержат сквален), сапонины, нетоксичные производные LPS (липополисахаридов) (такие как монофосфориллипид А или 3-О-деацилированный MPL), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, обезвреженные бактериальные АДФ-рибозилирующие токсины, микрочастицы, липосомы, имидазохинолоны или их смеси, но не ограничиваются ими. Другие вещества, которые действуют в качестве иммуностимулирующих агентов, раскрыты в главе 7 источника 46.

Особенно предпочтительно применение адьюванта на основе гидроксида алюминия и/или фосфата алюминия, и полипептиды, как правило, адсорбированы на этих солях. Эти соли включают оксигидроксиды и гидроксифосфаты (например, см. главы 8 и 9 в источнике 46). Соли могут принимать любую подходящую форму (например, гель, кристаллическую форму, аморфную форму и т.п.).

Дополнительные антигенные компоненты.

Композиции по изобретению включают мутантную последовательность v2 и/или v3 fHbp. Полезно, если композиция не включает сложные или неопределенные смеси антигенов, например, предпочтительно не включать везикулы наружной мембраны в композицию. Полипептиды по изобретению предпочтительно экспрессируют рекомбинантно в гетерологичном хозяине и затем очищают.

Наряду с включением полипептида fHbp, композиция по изобретению также может включать один или более чем один дополнительный иммуноген *Neisseria*, так как вакцина, которая направлена против более чем одного иммуногена бактерии, уменьшает вероятность селекции "ускользнувших" мутантов. Таким образом, композиция может включать второй полипептид, который при введении млекопитающему вызывает ответ в виде антител, которые являются бактерицидными против менингококка. Второй полипептид может представлять собой менингококковый fHbp, но часто не представляет собой fHbp, например, он может представлять собой последовательность NHBA, последовательность NadA и т.п.

Любой такой дополнительный иммуноген *Neisseria* может быть представлен в виде полипептида, отдельного от мутанта v2 или v3 fHbp по изобретению, или может быть представлен в виде слитого полипептида с модифицированным fHbp. Например, известно слияние менингококкового полипептида 936 и полипептидов fHbp [55, 56]. Особенно предпочтительны слитые белки, содержащие последовательность SEQ ID NO: 44 и/или последовательность SEQ ID NO: 45, возможно когда последовательности SEQ ID NO: 44 и/или 45 модифицирована(ы) единичными аминокислотными заменами в количестве до 5 (т.е. 1, 2, 3, 4 или 5 единичных аминокислотных замен, делеций и/или вставок), как здесь описано.

Композиция по изобретению может включать антиген NHBA. Антиген NHBA включен в опубликованную последовательность генома для менингококковой серогруппы В штамма MC58 [27] как ген NMB2132 (идентификационный номер GenBank GL7227388; здесь последовательность SEQ ID NO: 6). С того момента были опубликованы последовательности антигена NHBA из многих штаммов. Например, аллельные формы NHBA можно увидеть на фиг. 5 и 15 источника 27, и в примере 13 и фиг. 21 источника 1 (в нем SEQ ID с 3179 по 3184). Также сообщалось о различных иммуногенных фрагментах антигена NHBA. Предпочтительные 287 антигенов для применения в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) имеющую 50% или более чем 50% идентичность (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более чем 99,5%) с последовательностью SEQ ID NO: 6; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере У последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 6, где "n" равен 7 или больше (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или больше). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитопы последовательности SEQ ID NO: 6. Наиболее полезные антигены NHBA по изобретению могут вызывать образование антител, которые после введения субъекту могут связываться с менингококковым полипептидом, со-

стоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. Благоприятные антигены NHBA для применения в изобретении могут после введения субъекту вызывать образование бактерицидных антител против менингококка.

Композиция по изобретению может включать антиген NadA. Антиген NadA включен в опубликованную последовательность генома для менингококковой серогруппы В штамм MC58 [47] как ген NMB1994 (идентификационный номер GenBank GI:7227256; здесь последовательность SEQ ID NO: 7). С тех пор были опубликованы последовательности антигена NadA из многих штаммов, и хорошо документирована белковая активность в качестве адгезина *Neisseria*. Также сообщалось о различных иммуногенных фрагментах NadA. Предпочтительные антигены NadA для применения в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) имеющую 50% или более чем 50% идентичность (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более чем 99,5%) с последовательностью SEQ ID NO: 7; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере 'n' последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 7, где "n" равен 7 или больше (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или больше). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп последовательности SEQ ID NO: 7. Наиболее полезные антигены NadA по изобретению могут вызывать образование антител, которые после введения субъекту могут связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. Благоприятные антигены NadA для применения в изобретении могут после введения субъекту вызывать образование бактерицидных антител против менингококка. Последовательность SEQ ID NO: 15 представляет собой один такой фрагмент.

Композиция по изобретению может включать антиген NspA. Антиген NspA включен в опубликованную последовательность генома для менингококковой серогруппы В штамм MC58 [47] как ген NMB0663 (идентификационный номер GenBank GL7225888; здесь последовательность SEQ ID NO: 8). Этот антиген ранее был известен из источников 49 и 50. С того момента были опубликованы последовательности антигена NspA из многих штаммов. Также сообщалось о различных иммуногенных фрагментах NspA. Предпочтительные антигены NspA для применения в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) имеющую 50% или более чем 50% идентичность (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более чем 99,5%) с последовательностью SEQ ID NO: 8; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере "n" последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 8, где "n" равен 7 или более чем 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или больше). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп последовательности SEQ ID NO: 8. Наиболее полезные антигены NspA по изобретению могут вызывать образование антител, которые после введения субъекту могут связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. Благоприятные антигены NspA для применения в изобретении могут после введения субъекту вызывать образование бактерицидных антител против менингококка.

Композиции по изобретению могут включать менингококковый антиген HmbR. Полноразмерная последовательность HmbR включена в опубликованную последовательность генома для менингококковой серогруппы В штамм MC58 [47] как ген NMB1668 (здесь последовательность SEQ ID NO: 9). В изобретении может использоваться полипептид, который содержит полноразмерную последовательность HmbR, но часто используется полипептид, который содержит частичную последовательность HmbR. Таким образом, в некоторых воплощениях последовательность HmbR, используемая по изобретению, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере идентичность последовательности i% с последовательностью SEQ ID NO: 9, где величина i / равна 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 или больше. В других воплощениях последовательность HmbR, используемая по изобретению, может содержать фрагмент по меньшей мере j последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 9, где величина j равна 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или больше. В других воплощениях последовательность HmbR, используемая по изобретению, может содержать аминокислотную последовательность, (1) имеющую по меньшей мере идентичность последовательности i% с последовательностью SEQ ID NO: 9, и/или (2) содержащую фрагмент по меньшей мере j последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 9. Предпочтительные фрагменты j аминокислот содержат эпитоп последовательности SEQ ID NO: 9. Такие эпитопы обычно содержат аминокислоты, которые располагаются на поверхности HmbR. Полезные эпитопы включают эпитопы с аминокислотами, вовлеченными в связывание HmbR с гемоглобином, так как антитела, которые связываются с этими эпитопами, могут блокировать способность бактерии связываться с гемоглобином хозяина. Топологию HmbR и его критические функциональные остатки исследовали в источнике 51. Наиболее полезные антигены HmbR по изобретению могут вызывать образование антител, которые после введения субъекту могут связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. Благоприятные антигены HmbR для применения в изобретении могут после введения субъекту вызывать образование бактерицидных антител против менингококка.

Композиция по изобретению может включать антиген Nhha. Антиген Nhha включен в опубликованную последовательность генома для менингококковой серогруппы В штамм MC58 [47] как ген

NMB0992 (идентификационный номер GenBank GL7226232; здесь последовательность SEQ ID NO: 10). С того момента были опубликованы последовательности антигена NhhA из многих штаммов, например источники 48 и 52, и сообщалось о различных иммуногенных фрагментах NhhA. Он также известен как Hsf. Предпочтительные антигены NhhA для применения в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) имеющую идентичность последовательности 50% или больше (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или больше) с SEQ ID NO: 10; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере "n" последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 10, где 'n' равен 7 или больше (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или больше). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп последовательности SEQ ID NO: 10. Наиболее полезные антигены NhhA по изобретению могут вызывать образование антител, которые после введения субъекту могут связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10. Благоприятные антигены NhhA для применения в изобретении могут после введения субъекту вызывать образование бактерицидных антител против менингококка.

Композиция по изобретению может включать антиген App. Антиген App включен в опубликованную последовательность генома для менингококковой серогруппы В штамм MC58 [47] как ген NMB1985 (идентификационный номер GenBank GI:7227246; здесь последовательность SEQ ID NO: 11). С того момента были опубликованы последовательности антигена App из многих штаммов. Также сообщалось о различных иммуногенных фрагментах App. Предпочтительные антигены App для применения в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) имеющую идентичность последовательности 50% или больше (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или больше) с SEQ ID NO: 11; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере V последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 11, где "n" равен 7 или больше (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или больше). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп последовательности SEQ ID NO: 11. Наиболее полезные антигены App по изобретению могут вызывать образование антител, которые после введения субъекту могут связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. Благоприятные антигены App для применения в изобретении могут после введения субъекту вызывать образование бактерицидных антител против менингококка.

Композиция по изобретению может включать антиген Omp85. Антиген Omp85 включен в опубликованную последовательность генома для менингококковой серогруппы В штамм MC58 [47] как ген NMB0182 (идентификационный номер GenBank GL7225401; здесь последовательность SEQ ID NO: 12). С того момента были опубликованы последовательности антигена Omp85 из многих штаммов. Дополнительную информацию о Omp85 можно найти в источниках 53 и 54. Также сообщалось о различных иммуногенных фрагментах Omp85. Предпочтительные антигены Omp85 для применения в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) имеющую идентичность последовательности 50% или больше (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или больше) с SEQ ID NO: 12; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере "n" последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 12, где "n" равен 7 или больше (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или больше). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп последовательности SEQ ID NO: 12. Наиболее полезные антигены Omp85 по изобретению могут вызывать образование антител, которые после введения субъекту могут связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12. Благоприятные антигены Omp85 для применения в изобретении могут после введения субъекту вызывать образование бактерицидных антител против менингококка.

Композиция по изобретению может включать антиген 936. Антиген 936 включен в опубликованную последовательность генома для менингококковой серогруппы В штамм MC58 [47] как ген NMB2091 (здесь последовательность SEQ ID NO: 13). Предпочтительные антигены 936 для применения в изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) имеющую идентичность последовательности 50% или больше (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или больше) с SEQ ID NO: 13; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере "n" последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 13, где "n" равен 7 или больше (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или больше). Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп последовательности SEQ ID NO: 13. Наиболее полезные антигены 936 по изобретению могут вызывать образование антител, которые после введения субъекту могут связываться с менингококковым полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13. Антиген 936 представляет собой хороший партнер для слияния с fHbp (например, см. источники 55 и 56).

Композиция может содержать: полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 14; полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 15; и полипептид по изобретению, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v2 и SEQ ID NO: 13 (см. источники 55 и 56).

Композиция может содержать: полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 14; полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 15; и полипептид по изобретению, содержащий

мутантную аминокислотную последовательность fHbp v3 и SEQ ID NO: 13 (см. источники 55 и 56).

В некоторых воплощениях полипептид по изобретению комбинирован с другой менингококковой последовательностью fHbp. В частности, полипептид v2 может быть комбинирован с полипептидом v1 и/или v3 для увеличения спектра покрытия штаммов [162]. Таким образом, композиция может содержать: (1) полипептид по изобретению, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v2; и (2) полипептид v1 fHbp и/или полипептид v3 fHbp. В других воплощениях полипептид по изобретению может содержать (1) мутантную аминокислотную последовательность fHbp v2 и (2) аминокислотную последовательность v1 fHbp и/или аминокислотную последовательность v3 fHbp. Таким образом, последовательности v1 и/или v3 могут быть комбинированы с мутантной последовательностью v2 в виде отдельных единиц в композиции или в слитом полипептиде.

Аналогично, полипептид v3 может быть комбинирован с полипептидом v1 и/или v2 для увеличения спектра покрытия штаммов [162]. Таким образом, композиция может содержать: (1) полипептид по изобретению, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v3; и (2) полипептид v1 fHbp и/или полипептид v2 fHbp. В других воплощениях полипептид по изобретению может содержать (1) мутантную аминокислотную последовательность fHbp v3 и (2) аминокислотную последовательность v1 fHbp и/или аминокислотную последовательность v2 fHbp. Таким образом, последовательности v1 и/или v2 могут быть комбинированы с мутантной последовательностью v3 в виде отдельных сущностей в композиции или в слитом полипептиде.

Кроме того, мутантные полипептиды v2 и v3 могут быть комбинированы друг с другом для увеличения покрытия штаммов. Таким образом, композиция может содержать: (1) полипептид по изобретению, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v2; (2) полипептид по изобретению, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v3; и (3) полипептид fHbp v1. В других воплощениях полипептид по изобретению может содержать (1) мутантную аминокислотную последовательность fHbp v2 (2) мутантную аминокислотную последовательность v3 fHbp и (3) аминокислотную последовательность fHbp v1. Таким образом, мутантные последовательности v2 и v3 могут быть комбинированы с последовательностью v1 в виде отдельных единиц в композиции или в слитом полипептиде. Последовательность v1 может представлять собой последовательность дикого типа или мутантную последовательность.

v1 fHbp может содержать (а) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере идентичность k% с последовательностью SEQ ID NO: 16, и/или (б) фрагмент последовательности SEQ ID NO: 16. Информация о "k" и фрагментах приведена выше. Фрагмент, как правило, включает по меньшей мере один эпитоп последовательности SEQ ID NO: 16, и полипептид v1 fHbp включает по меньшей мере один эпитоп, который не представлен в аминокислотной последовательности v2 или v3 по изобретению, таким образом, что антитела, образование которых вызывается v1 fHbp, могут распознавать штаммы v1. В идеале, v1 fHbp могут вызывать образование антител, которые являются бактерицидными против штаммов v1, например против штамма MC58 (доступен в ATCC как 'BAA-335'). v1 fHbp может включать аминокислотную мутацию, которая нарушает его способность связываться с fH.

v2 fHbp может содержать (а) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере идентичность k% с последовательностью SEQ ID NO: 5, и/или (б) фрагмент последовательности SEQ ID NO: 5. Информация о "k" и фрагментах приведена выше. Фрагмент, как правило, включает по меньшей мере один эпитоп последовательности SEQ ID NO: 5, и полипептид v2 fHbp включает по меньшей мере один эпитоп, который не представлен в аминокислотной последовательности v3 по изобретению, таким образом, что антитела, образование которых вызывается v2 fHbp, могут распознавать штаммы v2. В идеале, v2 fHbp могут вызывать образование антител, которые являются бактерицидными против штаммов v2, например против штамма M2091 (ATCC 13091). v2 fHbp может представлять собой полипептид в соответствии с первым воплощением.

v3 fHbp может содержать (а) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере идентичность k% с последовательностью SEQ ID NO: 17, и/или (б) фрагмент последовательности SEQ ID NO: 17. Информация о "k" и фрагментах приведена выше. Фрагмент, как правило, включает по меньшей мере один эпитоп последовательности SEQ ID NO: 17, и полипептид v3 fHbp включает по меньшей мере один эпитоп, который не представлен в аминокислотной последовательности v2 по изобретению, таким образом, что антитела, образование которых вызывается v3 fHbp, могут распознавать штаммы v3. В идеале v3 fHbp может вызывать образование антител, которые являются бактерицидными против штаммов v3, например против штамма M01-240355. v3 fHbp может представлять собой полипептид в соответствии со вторым воплощением.

Таким образом, например, в изобретении предложен полипептид, содержащий в единой полипептидной цепи каждый из: (1) аминокислотной последовательности fHbp v1; (2) мутантной аминокислотной последовательности fHbp v2; и (3) мутантной аминокислотной последовательности fHbp v3. Этот полипептид может после введения животному-хозяину вызывать образование антител, которые связываются с каждым из: менингококкового полипептида fHbp, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46; менингококкового полипептида fHbp, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и менингококкового полипептида fHbp, состоящего из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 40. Последовательность (1) может содержать аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 16. Последовательность (2) может содержать аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5, но отличается от последовательности SEQ ID NO: 5 по одному или более чем одному из следующих остатков: S32, V33, L39, L41, F69, V100, I113, F122, L123, V124, S125, G126, L127, G128, S151, H239 и/или E240. Последовательность (3) может содержать аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 17, но отличается от последовательности SEQ ID NO: 17 по одному или более чем одному из следующих остатков: S32, L33, L39, L41, F72, V103, T116, F125, L126, V127, S128, G129, L130, G131, S154, H242 и/или E243. В предпочтительном воплощении: последовательность (1) содержит последовательность SEQ ID NO: 16, возможно модифицированную единичными аминокислотными изменениями в количестве до 5 (т.е. 1, 2, 3, 4 или 5 единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками); последовательность (2) содержит последовательность SEQ ID NO: 45, возможно модифицированную единичными аминокислотными изменениями в количестве до 5 (т.е. 1, 2, 3, 4 или 5 единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками), при условии, что такие аминокислотные изменения не изменяют мутации в этих последовательностях на противоположные относительно последовательности дикого типа; и последовательность (3) содержит последовательность SEQ ID NO: 44, возможно модифицированную до 5 единичными аминокислотными изменениями (т.е. 1, 2, 3, 4 или 5 единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками, например с получением последовательности SEQ ID NO: 53), при условии, что такие аминокислотные изменения не изменяют мутации в этих последовательностях на противоположные относительно последовательности дикого типа. Аминокислотные последовательности (1), (2) и (3) могут быть расположены в любом порядке от N- к C-концу в полипептиде, но предпочтительно в порядке (2), затем (3), затем (1). Например, в изобретении предложен полипептид формулы -A-B-C-, где: А содержит последовательность SEQ ID NO: 45, возможно модифицированную единичными аминокислотными заменами в количестве до 3; В содержит последовательность SEQ ID NO: 44, возможно модифицированную единичными аминокислотными заменами в количестве до 3; и С содержит последовательность SEQ ID NO: 16, возможно модифицированную единичными аминокислотными заменами в количестве до 3 (например, замена(ы) для нарушения связывания с fH). Предпочтительный С содержит последовательность SEQ ID NO: 49, где остаток Arg-34 подвергнут мутации до Ser, как сообщается для мутации 'R41S' в источнике 21.

Особенно предпочтительный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47. Эта последовательность включает от N-концу к C-концу: мутант v2 (SEQ ID NO: 45); мутант v3 (SEQ ID NO: 44); и мутант v1 (SEQ ID NO: 49). Между этими тремя мутантными последовательностями fHbp в каждом случае находится связывающая последовательность SEQ ID NO: 50. В одном из воплощений полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, которая имеет N-концевой метионин, затем последовательность SEQ ID NO: 37 и затем последовательность SEQ ID NO: 47.

Последовательность SEQ ID NO: 47 (сама по себе или в последовательности SEQ ID NO: 48) возможно может быть модифицирована единичными аминокислотными изменениями в количестве до 5 (т.е. 1, 2, 3, 4 или 5 единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками), при условии, что такие аминокислотные изменения не изменяют мутации в последовательностях v1, v2, и v3 на противоположные относительно последовательности дикого типа, т.е. аминокислотные остатки V32, R123, V285, R379 и S543 последовательности SEQ ID NO: 47 не должны подвергаться мутации до S32, L123, S285, L379, и R543. Тем не менее, в одном из исключительных воплощений V285 может изменяться назад до S285, и/или V32 может изменяться назад до S32.

Слияние мутантных последовательностей может в идеале вызывать образование антител, которые связываются с каждым из следующих: менингококковым полипептидом дикого типа v1 fHbp, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46; менингококковым полипептидом дикого типа v2 fHbp, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и менингококковым полипептидом дикого типа v3 fHbp, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40.

Помимо полипептидных антигенов *Neisseria* композиция может включать антигены для иммунизации против других заболеваний или инфекций. Например, композиция может включать один или более чем один из следующих дополнительных антигенов:

- сахаридный антиген *N.meningitidis* серогрупп А, С, W135 и/или Y, такой как сахарид, раскрытый в источнике 57 из серогруппы С (см. также источник 58) или в источнике 59;
- сахаридный антиген *Streptococcus pneumoniae* [например, 60, 61, 62];
- антиген вируса гепатита А, такой как инактивированный вирус [например, 63, 64];
- антиген вируса гепатита В, такой как поверхностные и/или ядерные антигены [например 64, 65];
- дифтерийный антиген, такой как дифтерийный анатоксин [например, глава 3 из источника 66], например мутант CRM₁₉₇ [например, 67];
- столбнячный антиген, такой как столбнячный анатоксин [например, глава 4 из источника 66];
- антиген *Bordetellapertussis*, такой как коклюшный холотоксин (PT) и филаментный гемагглютинин

(FHA) из *B. pertussis*, возможно также в комбинации с пертактином и/или агглютиногенами 2 и 3 (например, источники 68 и 69);

сахаридный антиген *Haemophilus influenzae* B [например, 58];

полиовирусный(е) антиген(ы) (например 70, 71], такой как IPV;

антигены кори, свинки и/или краснухи (например, главы 9, 10 и 11 из источника 66);

антиген(ы) гриппа (например, глава 19 из источника 66), такие как поверхностные белки гемагглютинин и/или нейраминидаза;

антиген *Moraxella catarrhalis* [например, 72];

белковый антиген *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы B) [например, 73, 74];

сахаридный антиген *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы B);

антиген *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы A) [например, 74, 75, 76];

антиген *Staphylococcus aureus* [например, 77].

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

Токсичные белковые антигены при необходимости могут быть обезврежены (например, обезвреживание коклюшного токсина при помощи химических и/или генетических способов [69]).

В том случае, когда в композицию включен дифтерийный антиген, тогда предпочтительно также включать столбнячный антиген и коклюшные антигены. Аналогично, когда включен столбнячный антиген, тогда предпочтительно также включать дифтерийный и коклюшный антигены. Аналогично, когда включен коклюшный антиген, тогда предпочтительно также включать дифтерийный и столбнячный антигены. Таким образом, предпочтительны комбинации DTP.

Сахаридные антигены предпочтительно находятся в форме конъюгатов. Белки-носители для конъюгатов более подробно обсуждаются ниже.

Антигены в композиции как правило будут представлены в концентрации, составляющей по меньшей мере 1 мкг/мл для каждого. В общем, концентрация любого данного антигена будет достаточной для того, чтобы вызвать иммунный ответ против такого антигена.

Иммуногенные композиции по изобретению можно применять терапевтически (т.е. для лечения существующей инфекции) или профилактически (т.е. для предотвращения будущей инфекции).

В качестве альтернативы применению белковых антигенов в иммуногенных композициях по изобретению можно использовать нуклеиновую кислоту (которая может представлять собой РНК, такую как самореплицирующаяся РНК, или ДНК, такая как плазида), кодирующую антиген.

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

Менингококковые серогруппы Y, W135, C и A.

Современные вакцины серогруппы C (Menjugate™ [57,78], Meningitec™ и NeisVac-C™) включают конъюгированные сахараиды. Menjugate™ и Meningitec™ имеют олигосахаридные антигены, конъюгированные с носителем CRM₁₉₇, тогда как для NeisVac-C™ используют полный полисахарид (де-О-ацетилированный), конъюгированный с носителем в виде столбнячного анатоксина. Вакцина Menactra™ содержит конъюгированные капсульные сахаридные антигены из каждой из серогрупп Y, W135, C и A.

Композиции по настоящему изобретению могут включать капсульные сахаридные антигены из одной или более чем одной серогруппы менингококков Y, W135, C и A, где антигены конъюгированы с белком-носителем (белками-носителями) и/или представляют собой олигосахарида. Например, композиция может включать капсульный сахаридный антиген из: серогруппы C; серогрупп A и C; серогрупп A, C и W135; серогрупп A, C и Y; серогрупп C, W135 и Y; или из всех четырех серогрупп A, C, W135 и Y.

Типичное количество каждого менингококкового сахаридного антигена на дозу составляет от 1 мкг до 20 мкг, например, приблизительно 1 мкг, приблизительно 2,5 мкг, приблизительно 4 мкг, приблизительно 5 мкг или приблизительно 10 мкг (выраженное в расчете на сахарид).

Когда смесь содержит капсульные сахараиды из обеих серогрупп A и C, тогда соотношение (мас./мас.) сахарид MenY:сахарид MenC может быть больше 1 (например, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 или выше). Когда смесь содержит капсульные сахараиды из серогруппы Y и одной или обеих серогрупп C и W135, тогда соотношение (мас./мас.) сахарид MenY:сахарид MenW135 может быть больше 1 (например, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 или выше) и/или такое соотношение (мас./мас.) сахарид MenY:сахарид MenC может быть меньше 1 (например, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или ниже). Предпочтительные соотношения (мас./мас.) для сахаридов серогрупп A:C:W135:Y составляют: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2 и 2:2:2:1. Предпочтительные соотношения (мас./мас.) сахаридов из серогрупп C:W135:Y составляют: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1 и 2:1:1. Предпочтительно использование по существу равных масс каждого сахараида.

Капсульные сахараиды можно использовать в форме олигосахаридов. Они обычно образуются при фрагментации очищенного капсульного полисахарида (например, путем гидролиза), после которой

обычно следует очистка фрагментов желаемого размера.

Фрагментацию полисахаридов предпочтительно осуществляют, получая конечную среднюю степень полимеризации (DP) в олигосахариде менее чем 30 (например, от 10 до 20, предпочтительно приблизительно 10 для серогруппы А; от 15 до 25 для серогрупп W135 и Y, предпочтительно приблизительно 15-20; от 12 до 22 для серогруппы С; и т.д.).

DP обычно можно измерить с использованием ионообменной хроматографии или с помощью колориметрических анализов [79].

Если осуществляют гидролиз, то гидролизат, как правило, будет подвергнут сортировке по размеру, чтобы удалить короткие олигосахариды [58]. Это можно осуществить различными путями, такими как ультрафильтрация с последующей ионообменной хроматографией. Олигосахариды со степенью полимеризации меньше или равной приблизительно 6 предпочтительно удаляют в случае серогруппы А, и со степенью полимеризации меньше чем приблизительно 4 предпочтительно удаляют в случае серогрупп W135 и Y.

Предпочтительные сахаридные антигены MenC раскрыты в источнике 78, такие как используемые в Menjugate™.

Сахаридный антиген может быть химически модифицирован. Последнее особенно полезно для восстановления гидролиза в случае серогруппы А [80]. Может быть осуществлено де-О-ацетилирование менингококковых сахаридов. В случае олигосахаридов модификация может происходить до или после деполимеризации.

Когда композиция согласно изобретению включает сахаридный антиген MenA, тогда антиген предпочтительно представляет собой модифицированный сахарид, в котором одна или более чем одна гидроксильная группа нативного сахара замещена блокирующей группой [80]. Такая модификация повышает устойчивость к гидролизу.

Ковалентная конъюгация.

Капсульные сахараиды в композициях по изобретению обычно могут быть конъюгированы с белком-носителем (белками-носителями). Как правило, конъюгирование усиливает иммуногенность сахаридов, так как превращает их из Т-независимых антигенов в Т-зависимые антигены, таким образом, обеспечивая примирование иммунологической памяти. Конъюгирование особенно полезно для педиатрических вакцин и представляет собой хорошо известный способ.

Типичные белки-носители представляют собой бактериальные токсины, такие как дифтерийный или столбнячный токсины, или анатоксины или их мутанты. Полезен мутант дифтерийного токсина CRM₁₉₇ [81], и он является носителем в продукте PREVNAR™. Другие подходящие белки-носители представляют собой комплекс белков наружной мембраны *N. meningitidis* [82], синтетические пептиды [83,84], белки теплового шока [85,86], коклюшные белки [87,88], цитокины [89], лимфокины [89], гормоны [89], факторы роста [89], искусственные белки, содержащие множественные эпитопы Т-клеток CD4 человека из различных полученных из патогенов антигенов [90], такие как N19 [91], белок D из *H. influenzae* [92-94], пневмолизин [95] или его нетоксичные производные [96], пневмококковый поверхностный белок PspA [97], белки, связывающие железо [98], токсин А или В из *C. difficile* [99], рекомбинантный экзобелок *A. aeruginosa* (rEPA) [100] и т.д.

Можно использовать любую подходящую реакцию конъюгирования, при необходимости с любым подходящим линкером.

Сахарид обычно может быть активирован или функционализирован перед конъюгированием. Для активации можно использовать, например, цианилирующие реагенты, такие как CDAP (например, 1-циано-4-диметиламинопиридиний тетрафторборат [101, 102 и т.п.]). В других подходящих способах используют карбодиимиды, гидразиды, активные сложные эфиры, норборан, пара-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S-NHS, EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид), TSTU (O-(N-сукцинимидил)-1,1,3,3-тетраметилуроний тетрафторборат) и т.д.

Связывание через линкерную группу может быть осуществлено с использованием любого известного способа, например способов, описанных в источниках 103 и 104. Один из типов связывания заключается в восстановительном аминировании полисахарида, связывании полученной аминогруппы с одним концом линкерной группы на основе адипиновой кислоты и затем связывании белка с другим концом линкерной группы на основе адипиновой кислоты [105, 106]. Другие линкеры включают В-пропионамидогруппу [107], нитрофенилэтиламин [108], галоацилгалогениды [109], гликозидные связи [110], 6-аминокапроновую кислоту [111], ADH [112], группировки C₄-C₁₂ [113] и т.п. В качестве альтернативы использованию линкера можно использовать прямое связывание. Прямое связывание с белком может включать окисление полисахарида с последующим восстановительным аминированием с использованием белка, как описано, например, в источниках 114 и 115.

Предпочтительным является способ, включающий введение аминогрупп в сахарид (например, путем замены концевых =О-групп на группу -NH₂) с последующей дериватизацией сложными диэфирами адипиновой кислоты (например, сложным N-гидроксисукцинимидодиэфиром адипиновой кислоты) и путем взаимодействия с белком-носителем. В другой предпочтительной реакции используют активацию

CDAP белком-носителем D, например, в случае MenA или MenC.

Везикулы наружной мембраны.

Некоторые композиции по изобретению не включают сложные или неопределенные смеси антигенов, которые представляют собой типичные характеристики OMV (везикул наружной мембраны). Тем не менее, изобретение может быть использовано в сочетании с OMV, так как обнаружили, что fHbp усиливает их эффективность [4], в частности, в результате сверхэкспрессии полипептидов по изобретению в штаммах, используемых для получения OMV. Также см. ниже.

Данный подход в общем можно применять для улучшения препаратов микровезикул *N. meningitidis* серогруппы B [116], "нативных OMV" [117], пузырьков или везикул наружной мембраны [например источники 118-123 и т.д.]. Они могут быть получены из бактерий, с которыми были проведены генетические манипуляции [124-127], например для увеличения иммуногенности (например, сверхэкспрессия иммуногенов), для уменьшения токсичности, для ингибирования синтеза капсульных полисахаридов, для понижающей регуляции экспрессии PorA и т.д. Везикулы могут быть получены из штаммов со сверхпузырением (hyperblebbing strains) [128-131]. Могут быть включены везикулы из непатогенных *Neisseria* [132]. OMV могут быть получены без применения детергентов [133, 134]. Они могут экспрессировать белки, отличающиеся от белков *Neisseria* на своей поверхности [135]. Они могут быть истощены по LPS (липополисахаридам). Они могут быть смешаны с рекомбинантными антигенами [118, 136]. Можно использовать везикулы из бактерий с разными подтипами белков наружной мембраны класса I, например шестью разными подтипами [137, 138], используя две разных популяции генетически сконструированных везикул, каждая из которых презентует три подтипа, или девятью разными подтипами, используя три разных популяции генетически сконструированных везикул, каждая из которых презентует три подтипа, и т.д. Полезные подтипы включают P1.7,16, P1.5-1,2-2, P1.19,15-1, P1.5-2,10, P1.12-1,13, P1.7-2,4, P1.22,14, P1.7-1,1, P1.18-1,3,6.

Клетки-хозяева.

В изобретении предложена бактерия, которая экспрессирует полипептид по изобретению. Бактерия может представлять собой менингококк или *E.coli*. Бактерия может конститутивно экспрессировать полипептид, но в некоторых воплощениях экспрессия может быть под контролем индуцируемого промотора. Бактерия может сверхэкспрессировать полипептид (см. источник 139). Экспрессия полипептида в идеале может не варьировать в зависимости от фазы.

В изобретении также предложены везикулы наружной мембраны, полученные из бактерии по изобретению (в частности, из менингококка). В изобретении также предложен способ получения везикул из бактерии по изобретению. Везикулы, полученные из этих штаммов, предпочтительно включают полипептид по изобретению, который должен находиться в везикулах в иммунодоступной форме, т.е. антитело, которое может связываться с очищенным полипептидом по изобретению, также должно быть способно связываться с полипептидом, который присутствует в везикулах.

Эти везикулы наружной мембраны включают любую протеолипосомную везикулу, полученную при разрушении или пузырении наружной мембраны менингококка с образованием из нее везикул, которые включают белковые компоненты наружной мембраны. Таким образом, термин включает OMV (иногда называемые "пузырьками"), микровезикулы (MV [116]) и "нативные OMV" ("NOMV" [117]).

MV и NOMV представляют собой природные мембранные везикулы, которые образуются спонтанно во время роста бактерий и высвобождаются в культуральную среду. MV могут быть получены в результате выращивания *Neisseria* в бульонной культуральной среде, отделения целых клеток от меньших по размеру MV в бульонной культуральной среде (например, путем фильтрования или низкоскоростного центрифугирования для того, чтобы осадить только клетки, а не меньшие по размеру везикулы), и затем сбора MV из обедненной клетками среды (например, путем фильтрования, путем дифференциального осаждения или путем агрегации MV, путем высокоскоростного центрифугирования для осаждения MV). Штаммы для применения при получении MV, как правило, могут быть выбраны на основе количества MV, продуцируемых в культуре, например в источниках 130 и 131 описаны *Neisseria* с высокой продукцией MV.

OMV получают искусственно из бактерий, и они могут быть получены с использованием обработки детергентом (например дезоксихолатом), или при помощи недетергентных средств (например, см. источник 134). Способы образования OMV заключаются в обработке бактерий детергентом на основе солей желчных кислот (например солей литохолевой кислоты, хенодезоксихолевой кислоты, урсодезоксихолевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, холевой кислоты, урсохолевой кислоты и т.д., при этом дезоксихолат натрия [140 и 141] является предпочтительным для обработки *Neisseria*) при pH, достаточно высоком для того, чтобы не осаждал детергент [142]. Другие способы могут быть осуществлены по существу в отсутствие детергента [134] с использованием таких способов, как обработка ультразвуком, гомогенизация, микрофлюидизация, кавитация, осмотический шок, измельчение, френч-пресс, смешивание и т.д. Способы без использования детергента или с использованием низкой концентрации детергента могут сохранять полезные антигены, такие как NspA и fHbp [134]. Таким образом, в способе можно использовать буфер для экстракции OMV, содержащий приблизительно 0,5% дезоксихолата или меньше, например приблизительно 0,2%, приблизительно 0,1%, меньше 0,05% или не содержать дезоксихолат.

Полезный способ получения OMV описан в источнике 143 и включает ультрафильтрацию неочищенных OMV вместо высокоскоростного центрифугирования. Способ может включать стадию ультрацентрифугирования после ультрафильтрации. OMV также могут быть очищены с использованием двухстадийного способа гель-фильтрации, описанного в источнике 154.

Везикулы для применения в изобретении могут быть получены из любого менингококкового штамма. Обычно везикулы получают из штамма серогруппы B, но их можно получать из других серогрупп, отличающихся от серогруппы B (например, в источнике 142 описан способ для серогруппы A), таких как A, C, W135 или Y. Штамм может иметь любой серотип (например, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16 и т.д.), любой сероподтип и любой иммунотип (например, L1; L2; L3; L3,3,7; L10 и т.д.). Менингококки могут быть из любой подходящей линии, включая гиперинвазивные и гипервирулентные линии, например из любой из следующих семи гипервирулентных линий: подгруппа I; подгруппа III; подгруппа IV-1; комплекс ET-5; комплекс ET-37; кластер A4; линия 3.

Бактерии по изобретению, кроме кодирования полипептида по изобретению, могут иметь одну или несколько дополнительных модификаций. Например, они могут иметь модифицированный ген *fur* [144]. Экспрессия *nsrA* может подвергаться повышающей регуляции при сопутствующем нокауте *porA* и *cps*. Дополнительные нокаутированные мутанты *N. meningitidis* для получения OMV раскрыты, например, в источнике 150. В источнике 145 раскрыто конструирование везикул из штаммов, модифицированных для экспрессии шести разных подтипов *PorA*. Также можно использовать мутант *Neisseria* с низкими уровнями эндотоксина, достигаемыми в результате нокаута ферментов, вовлеченных в биосинтез LPS [146, 147]. В изобретении может быть использован мутант *Neisseria*, сконструированный для уменьшения или отключения экспрессии по меньшей мере одного гена, вовлеченного в придание токсичности фрагменту липида A в LPS, в частности гена *lpx11* [148]. Аналогично, в изобретении может быть использован мутант *Neisseria*, сконструированный для уменьшения или отключения экспрессии по меньшей мере одного гена, вовлеченного в синтез или экспорт капсульного полисахарида, в частности генов *synX* и/или *ctrA*. Все эти или другие мутанты можно использовать в изобретении.

Таким образом, штамм, используемый в изобретении, в некоторых воплощениях может экспрессировать более одного подтипа *PorA*. Ранее были сконструированы 6-валентные и 9-валентные по *PorA* штаммы. Штамм может экспрессировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 подтипов *PorA*: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1 и/или P1.18-1,3,6. В других воплощениях штамм может быть подвергнут понижающей регуляции в отношении экспрессии *PorA*, например при которой количество *PorA* уменьшается по меньшей мере на 20% (например, не менее 30%, не менее 40%, не менее 50%, не менее 60%, не менее 70%, не менее 80%, не менее 90%, не менее 95% и т.п.), или он даже нокаутирован по сравнению с уровнями дикого типа (например, по сравнению со штаммом H44/76).

В некоторых воплощениях штамм может сверхэкспрессировать (по сравнению с соответствующим штаммом дикого типа) некоторые белки. Например, штаммы могут сверхэкспрессировать *NspA*, белок 287 [118], *fHBP* [139], *TbpA* и/или *TbpB* [136], *Cu,Zn*-супероксиддисмутазу, *HmbR* и т.д.

Ген, кодирующий полипептид по изобретению, может быть интегрирован в бактериальную хромосому или может присутствовать в эпизомной форме, например в плазмиде.

Благоприятным образом для получения везикул, менингококк может быть генетически сконструирован так, чтобы гарантировать то, что экспрессия полипептида не подвергнется фазовым вариациям. Способы уменьшения или устранения фазовой вариабельности генной экспрессии у менингококков раскрыты в источнике 149. Например, ген может быть помещен под контроль конститутивного или индуцируемого промотора, или может быть удален или заменен на мотив ДНК, который ответственен за его фазовую вариабельность.

В некоторых воплощениях штамм может включать одну или более чем одну мутацию в результате нокаута и/или связанных со сверхэкспрессией мутаций, раскрытых в источниках 122, 124, 128 и 150. Например, в соответствии с руководством и номенклатурой в этих четырех источниках полезные гены для понижающей регуляции и/или нокаута включают: (a) *Cps*, *CtrA*, *CtrB*, *CtrC*, *CtrD*, *FrpB*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA*, и/или *TbpB*; (6) *CtrA*, *CtrB*, *CtrC*, *CtrD*, *FrpB*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PhoP*, *PilC*, *PmrE*, *PmrF*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA*, и/или *TbpB*; (в) *ExbB*, *ExbD*, *rmpM*, *CtrA*, *CtrB*, *CtrD*, *GalE*, *LbpA*, *LbpB*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA*, и/или *TbpB*; или (г) *CtrA*, *CtrB*, *CtrD*, *FrpB*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaD*, *SynA*, *SynB*, *SynX* и/или *SynC*.

В случае использования мутантного штамма в некоторых воплощениях он может иметь одну или более чем одну, или все следующие характеристики: (1) пониженная регуляция или нокаут *LgtB* и/или *GalE* для усечения LOS (липоолигосахарид) менингококка; (2) повышенная регуляция *TbpA*; (3) повышенная регуляция *NhhA*; (4) повышенная регуляция *Omp85*; (5) повышенная регуляция *LbpA*; (6) повышенная регуляция *NspA*; (7) нокаут *PorA*; (8) пониженная регуляция или нокаут *FrpB*; (9) пониженная регуляция или нокаут *Opa*; (10) пониженная регуляция или нокаут *Opc*; (11) подвергнутый делеции комплекс генов *cps*. Усеченный LOS может представлять собой LOS, который не включает эпитоп сиалил-лакто-N-неотетраозы, например, он может представлять собой дефицитный по галактозе LOS. LOS мо-

жет не иметь α -цепь.

В зависимости от менингококкового штамма, используемого для получения везикул, они могут содержать или не включать антиген нативного fHBP данного штамма [151].

В одном из предпочтительных воплощений менингококк не экспрессирует функциональный белок MltA. Как обсуждается в источниках 152 и 153, нокаут MltA (связанной с мембраной литической трансгликозилазы, также известной как GNA33) у менингококка приводит к бактериям, которые спонтанно высвобождают большие количества мембранных везикул в культуральную среду, из которой они легко могут быть очищены. Например, везикулы могут быть очищены с использованием двухстадийного способа фильтрования по размеру в соответствии с источником 154, включающего: (1) первую стадию фильтрования, на которой везикулы отделяют от бактерий на основе различия их размеров, причем везикулы проходят в фильтрат; и (2) вторую стадию фильтрования, на которой везикулы остаются в концентрате. Мутацию MltA (понижающая регуляция или нокаут) используют в вакцинах "GMMA" [155], и она для удобства может быть комбинирована с дополнительной понижающей регуляцией или нокаутом в частности по меньшей мере одного гена, вовлеченного в придании токсичности фрагменту липида A в LPS, в частности lpx11, и/или по меньшей мере одного гена, вовлеченного в синтез или экспорт капсульного полисахарида, в частности генов synX и/или ctfA. GMMA (генерализованные модули для мембранных антигенов) генетически обезвреживают OMV, которые получают из менингококковых штаммов, сконструированных для высвобождения GMMA, обладающих уменьшенной реакционностью и увеличенной иммуногенностью. GMMA индуцируют меньше провоспалительных цитокинов, чем OMV при тестировании в тесте активации моноцитов (MAT).

Предпочтительный менингококковый штамм для вакцины "GMMA" с использованием этого подхода экспрессирует мутант v2 fHbp и/или мутант v3 fHbp по изобретению, и экспрессия может управляться сильными промоторами. Везикулы, высвобождаемые этим штаммом, включают мутантные белки v2 и/или v3 fHbp в иммуногенной форме, и введение везикул может обеспечивать бактерицидный антибактериальный ответ, как обсуждается в источнике 155. Штамм также может экспрессировать v1 fHbp, или вместо этого v1 fHbp может быть предложен в виде отдельного рекомбинантного белка в растворимой форме (и v1 fHbp может быть дикого типа или представлять собой мутантную последовательность, например подвергнутую мутации для нарушения ее способности связываться с fH, как обсуждается выше). В изобретении предложены такие штаммы, и также предложены везикулы, которые высвобождают эти штаммы, например очищенные из культуральных сред после роста штаммов. Предпочтительный для экспрессии в этих штаммах мутант v2 имеет мутацию по S32 и/или L123 в соответствии с обсуждаемым здесь, и предпочтительный для экспрессии в этих штаммах мутант v3 имеет мутацию по S32 и/или L126 в соответствии с обсуждаемым здесь. Таким образом, везикулы, полученные из менингококков, экспрессирующих эти мутантные последовательности v2 и v3 fHbp, представляют собой особенно предпочтительные иммуногены для применения в вакцинах по изобретению. Таким образом, полезная для мутагенеза последовательность дикого типа v2 содержит SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 54 (содержащая форму AG SEQ ID NO: 55), и, таким образом, полезная для мутагенеза последовательность дикого типа v3 содержит SEQ ID NO: 52.

Полезные для использования в таких штаммах промоторы включают промоторы, обсуждаемые в источниках 156 и 157. Например, промотор может представлять собой: (а) промотор гена порина, предпочтительно porA или porB, в частности из *N.meningitidis*; или (б) промотор гена рРНК (такого как ген 16S рРНК), в частности из *N.meningitidis*. Когда используют менингококковый промотор порина, тогда он предпочтительно получен из porA, и более конкретно область -10 менингококкового промотора гена porA и/или область -35 менингококкового промотора гена porA (предпочтительно, где область -10 и область -35 разделены промежуточной последовательностью из 12-20 нуклеотидов, и где промежуточная последовательность или не содержит последовательность поли-G, или включает последовательность поли-G, имеющую не более чем восемь последовательных нуклеотидов G). Когда используют промотор гена рРНК, тогда он может содержать в частности (1) область -10 менингококкового промотора гена рРНК и/или (2) область -35 менингококкового промотора гена рРНК. Также возможно использовать гибриды (а) и (б), например имеющий область -10 промотора porA и область -35 промотора рРНК (которая может представлять собой консенсусную область -35). Таким образом, полезный промотор может представлять собой промотор, который включает или (1) область -10 (в частности менингококкового) гена рРНК и область -35 (в частности менингококкового) гена PorA, или (2) область -10 (в частности, менингококкового) гена PorA и область -35 (в частности менингококкового) гена рРНК.

Если в везикуле присутствуют LOS, то можно обрабатывать везикулу таким образом, чтобы связывать его LOS и белковые компоненты (конъюгация "внутри везикулы" [150]).

Общая информация.

Термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий", например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может что-то включать дополнительно, например, X+Y. Ссылки на "содержащий" (или "содержит" и т.п.) могут возможно быть заменены на "состоящий из" (или "состоит из" и т.п.). Термин "по существу состоящий из" ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или стадиями "и теми, которые не влияют существенно на ос-

новную(ые) и новую(ые) характеристику(и)" заявленного изобретения.

Термин "приблизительно" в отношении численного значения x является дополнительным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Слово "по существу" не исключает "полностью", например композиция, которая "по существу не содержит" Y , может совсем не содержать Y . При необходимости слово "по существу" может быть исключено из определения по изобретению.

"Идентичность последовательностей" может быть определена при помощи алгоритма поиска гомологии Смита-Ватермана, реализованного в программе MPSRCH (Oxford Molecular), с использованием поиска аффинного пропуска с параметрами штрафа на внесение делеции в выравнивание=12 и штрафа на продолжение делеции=1, но предпочтительно определена при помощи алгоритма глобального выравнивания Нидлемана-Вунша [158] с использованием параметров по умолчанию (например, штрафа на внесение делеции в выравнивание=10,0 и штрафа на продолжение делеции=0,5, используя матрицу подсчета EBLOSUM62). Этот алгоритм удобно реализован в инструменте needle в пакете EMBOSS [159]. Когда применение относится к идентичности последовательности к конкретной SEQ ID, тогда идентичность должна рассчитываться по всей длине этой SEQ ID.

Термин "фрагмент" в отношении полипептидных последовательностей означает, что полипептид представляет собой фракцию полноразмерного белка. Такие фрагменты могут оказывать качественную биологическую активность, такую же как полноразмерный белок, например фрагмент может содержать или кодировать один или более чем один эпитоп, такой как иммунодоминантные эпитопы, которые дают возможность для возникновения похожего иммунного ответа на фрагмент, а также на полноразмерную последовательность. Полипептидные фрагменты как правило имеют делецию по N-концевому фрагменту и/или C-концевому фрагменту по сравнению с нативным белком, но где оставшаяся аминокислотная последовательность фрагмента идентична аминокислотной последовательности нативного белка. Полипептидные фрагменты могут содержать, например: пример 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 24, 26, 28, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262 последовательных аминокислот, включая все целочисленные значения между ними, референсной полипептидной последовательности, например от 50 до 260, от 50 до 255, от 50 до 250, от 50 до 200, от 50 до 150 последовательных аминокислот референсной полипептидной последовательности. Термин "фрагмент" однозначно исключает полноразмерные полипептиды fHbp и их зрелые липопротеины.

После определения серогруппы классификация менингококков включает серотип, сероподтип и затем иммунотип, и стандартная номенклатура указывает на серогруппу, серотип, сероподтип и иммунотип, каждые из которых отделены двоеточием, например B:4:P1.15:L3,7,9. В серогруппе B некоторые линии часто вызывают заболевание (гиперинвазивные), некоторые линии вызывают более тяжелые формы заболевания, чем другие (гипервирулентные), и другие совсем редко вызывают заболевание. Идентифицировано семь гипервирулентных линий, а именно подгруппы I, III и IV-1, комплекс ET-5, комплекс ET-37, кластер A4 и линия 3. Такие линии определены с использованием мультилокусного ферментативного электрофореза (MLEE), но для классификации менингококков также использовали мультилокусное типирование последовательностей (MLST). Четыре основных гипервирулентных кластера представляют собой комплексы ST32, ST44, ST8 и ST11.

В общем, изобретение не охватывает различные последовательности fHbp, в частности раскрытые в источниках 2, 3, 5, 6, 7, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166 и 167.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 демонстрирует отличающуюся чувствительность вариантов fHbp к расщеплению химотрипсином. Стрелка демонстрирует положение полноразмерных белков fHbp.

Фиг. 2 демонстрирует анализ путем вестерн-блоттинга мутантов v2 мутанты. Дорожки представляют собой: (1 и 2) рекомбинантный очищенный v2 дикого типа; (4) лизат v2 дикого типа; (5) мутант #1; (6) мутант #2; (7) мутант #4; (8) мутант #5; (9) мутант #7; (10) мутант #8; (11) мутант #12; (12) мутант #14 (13) мутант #15; (14) контроль fHbp var2 Δ G-trx, т.е. белок v2, где N-концевая последовательность GPDSRLQRR (SEQ ID NO: 37) заменена на GSKDISS (SEQ ID NO: 38). Дорожки 2-14 включали химотрипсин. M представляет собой молекулярные маркеры.

Фиг. 3 демонстрирует дополнительный анализ путем вестерн-блоттинга мутантов v2. Дорожки представляют собой: (1 и 2) мутант #3; (3 и 4) мутант #6; (5 и 6) мутант #9; (7 и 8) мутант #10; (9 и 10) мутант #13; (11 и 12) Δ gono; (13 и 14) v2 дикого типа; (15 и 16) мутант #22. Нечетные дорожки относятся к белкам, которые были инкубированы без химотрипсина, тогда как четные дорожки относятся к белкам, которые были инкубированы с химотрипсином. Белок " Δ gono" представляет собой рекомбинантный v2, где N-концевая последовательность (SEQ ID NO: 37) удалена.

Фиг. 4 демонстрирует дополнительный анализ путем вестерн-блоттинга для мутантов v2. Дорожки представляют собой: (1 и 2) мутант #11; (3 и 4) N-trx; (5-7) мутант #19; (8 и 9) мутант #20; (10 и 11) мутант #21. Дорожки 2, 4, 7, 9 и 11 для белков, которые инкубировали с химотрипсином, тогда как другие дорожки были без химотрипсина. Белок "N-trx" представляет собой рекомбинантный v2, где N-концевая

последовательность (SEQ ID NO: 37) заменена на SEQ ID NO: 39.

Фиг. 5 демонстрирует результаты DSC для v2 fHbp дикого типа и мутанта S58V/L149R. На С-концевой домен не влияла мутация, но Tm N-концевого домена увеличивалась на >20°C (обозначена стрелкой). Ось y демонстрирует Cp (ккал/моль/°C), а ось x демонстрирует температуру (°C).

Фиг. 6 демонстрирует ответ в SPR (поверхностном плазмонном резонансе) для v2 fHbp дикого типа (сплошная линия) и мутанта (пунктирная линия).

Фиг. 7 демонстрирует ответ в SPR для v3 fHbp, как дикого типа (сверху) или с различными мутациями.

Фиг. 8 демонстрирует результаты DSC для тройного слитого белка SEQ ID NO: 48. Оси являются такими, как на фиг. 5.

Конкретные воплощения изобретения

В изобретении предложены следующие конкретные пронумерованные воплощения.

1. Мутант v3 или v2 fHbp, который обладает повышенной стабильностью по сравнению с fHbp дикого типа и, предпочтительно, также обладает меньшей аффинностью в отношении человеческого фактора H, чем fHbp дикого типа;

например:

(А) полипептид, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v2, где: (а) аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5 и/или содержит фрагмент SEQ ID NO: 5, длина которого составляет по меньшей мере 7 аминокислот и который содержит по меньшей мере один из остатков, указанных в (б); но (б) аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 5 по одному или более из следующих остатков: 32, 33, 39, 41, 69, 100, 113, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 151, 239, и/или 240; при условии, что:

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 включает замену только по остатку 32, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 включает замену только по остатку 113, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б).

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 включает замену только по остатку 122, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 включает замену по остатку 123, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 включает замену только по остатку 124, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 включает замену только по остатку 127, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б); и

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2 включает замену только по остатку 240, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

или (Б) полипептид, содержащий мутантную аминокислотную последовательность fHbp v3, где: (а) аминокислотная последовательность обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17 и/или содержит фрагмент SEQ ID NO: 17, длина которого составляет по меньшей мере 7 аминокислот и который содержит по меньшей мере один из остатков, перечисленных в (б); но (б) аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 17 по одному или более чем одному из следующих остатков: 32, 33, 39, 41, 72, 103, 116, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 154, 242, и/или 243; при условии, что:

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 включает замену по остатку 32, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 включает замену по остатку 113, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 включает замену только по остатку 125, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 включает замену по остатку 126, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополни-

тельный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 включает замену по остатку 127, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б);

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 включает замену по остатку 130, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б); и

если мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 включает замену только по остатку 243, то либо эта замена не представляет собой замену на аланин, либо заменен по меньшей мере один дополнительный остаток, перечисленный в (б).

2. Полипептид в соответствии с воплощением 1(Б), где аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 17 заменой по одному или более чем одному из остатков, перечисленных в (б); например, где замена(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из: S32V; I33C; L39C; L41C; F72C; V103T; T116S; F125C; L126R; V127I; S128G или S128T; G129D; L130I; G131A; S154C; H242R; и E243H.

3. Полипептид в соответствии с воплощением 1 (Б) или воплощением 2, содержащий более чем одну замену по остаткам, перечисленным в (б), и выбранную из групп 3А-3П, как указано выше.

4. Полипептид в соответствии с воплощением 1(А), где аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 5 заменой по одному или более чем одному из остатков, перечисленных в (б); например, когда замена(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из: S32V; V33C; L39C; L41C; F69C; V100T; I113S; F122C; L123R; V124I; S125G или S125T; G126D; L127I; G128A; S151C; H239R; и E240H.

5. Полипептид в соответствии с воплощением 1(А) или воплощением 4, содержащий более чем одну замену по остаткам, перечисленным в (б), и выбранную из групп 2А-2П, как указано выше.

6. Полипептид в соответствии с любым из воплощений 1-5, также включающий одну или более чем одну дополнительную(ые) мутацию(и), которая(ые) нарушает(ют) способность полипептида связываться с человеческим фактором H; например, v2, включающий замену по одному или более чем одному из R73, D203, E210, G228, S121, F122, L123, A192, E194, V199, I200, L201, T213, H215, F219, T231, и E240, или v3, включающий замену по одному или более чем одному из Q35, I178, L87, A88, L126, V127, V202, E213, T216, T234, V241, и E243.

7. Полипептид, содержащий:

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, возможно с 1, 2, 3, 4 или 5 единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками, где полипептид может вызывать образование антител, которые связываются с менингококковым полипептидом fHbp, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40 (например, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 с 1, 2 или 3 единичными аминокислотными заменами), но без мутации по остатку V32 или R126;

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, возможно с 1, 2, 3, 4 или 5 единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками, где полипептид может вызывать образование антител, которые связываются с менингококковым полипептидом fHbp, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (например, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 с 1, 2, или 3 единичными аминокислотными заменами), но без мутации по остатку V32 или R123;

аминокислотная последовательность fHbp v3, которая идентична аминокислотной последовательности v3 дикого типа, за исключением мутации по аминокислотному положению, соответствующему Leu-126 в SEQ ID NO: 17, при условии, что мутация не представляет собой замену на аланин (например, когда мутация представляет собой замену на аргинин);

аминокислотная последовательность fHbp v2, которая идентична аминокислотной последовательности v2 дикого типа, за исключением мутации по аминокислотному положению, соответствующему Leu-123 в SEQ ID NO: 5, при условии, что мутация не представляет собой замену на аланин (например, когда мутация представляет собой замену на аргинин); или

аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 47, возможно с 1, 2, 3, 4 или 5 единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками, где полипептид может вызывать образование антител, которые связываются с каждым из: менингококкового полипептида fHbp, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46; менингококкового полипептида fHbp, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и менингококкового полипептида fHbp, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40 (например, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48).

8. Плазмида или другая нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид в соответствии с любым из воплощений 1-7.

9. Клетка-хозяин, трансформированная плазмидой в соответствии с воплощением 8; например где клетка представляет собой бактерию менингококк, такую как бактерия менингококк, имеющую понижающую регуляцию или нокаут гена *mltA* и также возможно имеющую понижающую регуляцию или нокаут: (1) по меньшей мере одного гена, вовлеченного в придание токсичности фрагменту липида А в LPS, в частности гена *lpxII*; и/или (2) по меньшей мере одного гена, вовлеченного в синтез или экспорт

капсульного полисахарида или, в частности, synX и/или ctrA.

10. Мембранные везикулы, полученные из клетки-хозяина в соответствии с воплощением 9, которые включают полипептид в соответствии с любым из воплощений 1-7.

11. Иммуногенная композиция, содержащая полипептид в соответствии с любым из воплощений 1-7, или везикулу в соответствии с воплощением 10.

12. Композиция в соответствии с воплощением 11, дополнительно содержащая второй полипептид, который при введении млекопитающему вызывает ответ в виде антител, которые являются бактерицидными в отношении менингококка.

13. Композиция в соответствии с воплощением 11 или 12, дополнительно содержащая (1) конъюгированный капсульный сахарид *N.meningitidis* серогруппы A, C, W135 и/или Y, и/или (2) конъюгированный капсульный сахарид *S.pneumoniae*.

14. Способ индуцирования антительного ответа у млекопитающего, включающий введение иммуногенной композиции в соответствии с любым из воплощений 11-13.

Способы реализации изобретения

Мутации fHbp.

Считается, что v2 fHbp является нестабильным. Для анализа лежащих в основе этого нежелательного свойства структурных причин с намерением сконструировать последовательность для улучшения стабильности, авторы изобретения проанализировали выравнивание последовательности и 3D структуры полипептидов fHbp. Одна из областей конкретного интереса представляла собой структурную границу между N-концевым и C-концевым доменами [168].

Авторы изобретения идентифицировали мутации, разъясняемые в табл. 1. Три из положений, идентифицированных для мутации, перекрываются с источниками 24 и 25, но изобретение не охватывает полипептиды, о которых сообщалось в предшествующем уровне техники, т.е. когда полипептиды включают замены исключительно по этим положениям на аланин. Например, E240 может быть заменен на гистидин для того, чтобы соответствовать v1, и предпочтительно находится в сочетании с заменой по остатку H239 (мутанты #1 и #11). Аналогично, если F122 заменен, то он предпочтительно находится в сочетании с заменой по S151, оба с цистеином для того, чтобы дать возможность для образования дисульфидной мостиковой связи (мутант #10). Кроме того, если L123 заменен, то он может быть заменен на аргинин (нежели чем на аланин), или он может находиться в сочетании с заменой по другим остаткам, например по S32 (см. мутант #3), по S125 (см. мутанты #20 и #22), или с заменой по остаткам 124-128 (см. мутант #12).

Исследования стабильности.

Нестабильные белки имеют тенденцию к меньшему сворачиванию и по этой причине предрасположены к расщеплению и деградации протеазами. Фиг. 1 демонстрирует, что v2 fHbp более чувствителен к деградации химотрипсином, нежели чем v1 и v3, и, таким образом, этот тест может быть использован для оценки стабильности мутантных белков.

Для фиг. 1, v1, v2 и v3 fHbp дикого типа готовили в концентрации 0,5 мг/мкл в 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8. Химотрипсин добавляли в отношении 1:100 (мас./мас). Образцы инкубировали при 24°C в объеме 50 мл без встряхивания. Образцы экстрагировали и кипятили в течение 0, 1, 3 или 6 часов; затем анализировали на 12% геле бис-Tris (буфер MES). Полоса слева, обозначенная *, указывает на образец, инкубируемый в течение 6 ч без протеазы.

Клеточные лизаты *E. coli*, экспрессирующей рекомбинантные белки, инкубировали с химотрипсином в отношении 1:100 мас./мас., в течение 3 ч при 25°C. Картины деградации анализировали при помощи вестерн-блоттинга с последующей инкубацией с иммунной поликлональной сывороткой крови, образующейся у кролика против всех трех вариантов fHbp. Присутствие продуктов расщепления с меньшей кажущейся молекулярной массой (фиг. 2-4) интерпретируется как показатель нестабильности, тогда как присутствие полосы, соответствующей кажущейся MW приблизительно 30 кДа интерпретируется как показатель увеличенной стабильности. Все мутанты #1-6, #12 и #22 продемонстрировали увеличенную устойчивость к расщеплению химотрипсином по сравнению с диким типом v2.

DSC использовали в качестве независимого подхода для оценки действия мутаций в отношении стабильности очищенных рекомбинантных белков fHbp v2. T_m (температура плавления), измеренная при помощи DSC, соответствует температуре, при которой анализируемый белок на 50% находится в свернутом состоянии и на 50% в развернутом состоянии. Изменения, которые стабилизируют конформацию белка, увеличивают T_m , тогда как дестабилизирующие изменения уменьшают T_m . Как видно на фиг. 3D в источнике 24, профиль DSC для v2 fHbp дикого типа демонстрирует два значения T_m : T_{m1} при приблизительно 40°C, которая соответствует температуре плавления N-концевого домена, и T_{m2} при приблизительно 80°C, соответствующая температуре плавления C-концевого домена. Значения T_{m1} и T_{m2} для анализируемых мутантов представлены в табл. 1. Мутанты #2, #4, #5, #12, #19 и #21 демонстрировали уменьшенную T_m для N-концевого домена по сравнению с белком дикого типа, и это действие было более значительным для мутантов #2, #4 и #12.

Гель-фильтрационную хроматографию (SEC) использовали для оценки процента мономерного бел-

ка, и результаты также представлены в табл. 1.

Мутанты #2, #3 и #4.

Мутант #3 (группа 2Б) продемонстрировал самые лучшие суммарные результаты в исследованиях стабильности v2. Этот белок (SEQ ID NO: 20) включает мутации по Ser-58 (S32 в SEQ ID NO: 5) и Leu-149 (L123 в SEQ ID NO: 5), с заменами на Val и Arg, соответственно. Мутантный белок v2 (SEQ ID NO: 20, содержащий SEQ ID NO: 45) анализировали при помощи DSC и, по сравнению с последовательностью дикого типа, T_m для его N-концевого домена была более чем на 20°C выше (фиг. 5).

В бактерицидном анализе сыворотки крови этот мутант v2 может конкурировать за связывание с человеческими антителами, которые возникают при использовании последовательности v2 дикого типа.

Хотя мутации S58V и L149R введены для улучшения стабильности и действительно достигли этой цели, фиг. 6 демонстрирует, что мутантный полипептид v2 (пунктирная линия) неожиданно демонстрировал намного уменьшенное связывание с fH по сравнению с последовательностью v2 дикого типа (сплошная линия) при измерении при помощи поверхностного плазмонного резонанса против иммобилизованного fH. Сама мутация S58V оказывает небольшое воздействие на связывание fH, и двойной мутант S58V/L149R демонстрировал более высокое связывание с fH чем с fHbp, несущем только мутант L149R.

Когда мутант #3 дополнительно комбинировали с мутацией "E313A" в v2, тогда обнаружена полная потеря связывания fH, измеряемая при помощи SPR.

Эквивалентные мутации вводили в последовательность v3 (SEQ ID NO: 17) с получением мутанта v3 SEQ ID NO: 44. Действия индивидуальных мутаций S58V и L149R на связывание fH исследовали в v3 (т.е. эквиваленты v3 мутантов v2 #2 и #4). Таким образом, пронумерованную в соответствии с SEQ ID NO: 17 мутацию S32V или L126R вводили в последовательность v3. Эти два мутанта сравнивали с двумя отличающимися последовательностями v3 дикого типа, и также с мутантом "E313A", который, как известно, нарушает связывание с fH в v3 [23].

Как представлено на фиг. 7, v3 дикого типа связывается с fH (две верхние полосы). Мутация S58V, которая была сконструирована для улучшения стабильности, уменьшала величину пика SPR приблизительно в 2 раза. Самое неожиданное то, что мутация L149R (опять же сконструированная для улучшения стабильности) уменьшала аффинность fH на уровень, близкий к уровню для известного мутанта E313A (нижние две полосы).

Мутации S58V и L149R в v3 также исследовали при помощи DSC, и обнаружили, что они увеличивают T_m для N-конца на 5,5°C (S58V) или на 6,7°C (L149R) по сравнению с диким типом. T_m для обоих мутантов была выше, чем обнаруженная в двойном мутанте v2 (63,5°C - см. табл.1). Мутант L149R v3 также демонстрировал более высокое значение T_m для своего C-концевого домена, тогда как почти отсутствовал сдвиг для мутанта S58V v3. SPR продемонстрировал, что связывание с fH мутанта #2 уменьшалось приблизительно вдвое, но для мутанта #4 аффинность к fH уменьшалась до уровня, близкого к известному мутанту E313 A (в соответствии с также обнаруженным для v2). Когда комбинировали две мутации (т.е. мутант #3), тогда T_m увеличение по сравнению с диким типом составило 11,2°C. Когда мутацию "E313 A" добавляли к мутанту #3, тогда связывание с fH полностью устранялось, хотя T_m для N-концевого домена также уменьшалась на 2,9°C при сравнении с мутантом #3 (оставаясь на 8,3°C выше чем для v3 дикого типа). Сама мутация "E313A" была гораздо менее стабильной, чем дикий тип, демонстрируя уменьшение T_m на 6,3°C.

Таким образом, мутации #2 и #4 могут быть использованы сами по себе или в комбинации (т.е. мутант #3), возможно с дополнительными мутациями для стабилизации v2 или v3 fHbp, а также для нарушения аффинности к fH.

Бактерицидный анализ с сывороткой использовали для оценки иммуногенной эффективности мутантов #3 и #4 в v2 и v3. Кроме того, мутант "E313A" также тестировали в v2 и v3, сам по себе или в комбинации с мутациями #3. Для сравнения, также тестировали v2 и v3 fHbp дикого типа. Белки вводили в количестве 20 мкг/дозу с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта, и образующуюся в результате сыворотку крови тестировали в отношении бактерицидной активности против панели семи штаммов (четыре штамма v2, три штамма v3), включающих штаммы, которые экспрессируют тот же самый fHbp, как исходные последовательности fHbp дикого типа (т.е. последовательность v2 2.16 и последовательность v3 3.42).

Результаты для белков v2 также были следующими (SEQ ID для формы ΔG; * = гомологичный fHbp):

Белок	SEQ	SBA против штаммов v2				SBA против штаммов v3		
	ID	v2.16*	v2.19	v2.21	v2.24	v3.42*	v3.28	v3.30
Дикий тип	5	32768	32	32	1024	>32768	<16	32
#4	21	32768	<16	<16	128	1024	<16	16
#3	45	4096	32	<16	<16	>32768	128	<16
#3+E313A	57	4096	16	<16	<16	>32768	<16	<16
E313A	56	128	16	<16	<16	4096	<16	<16

Результаты для белков v3 были следующими:

Белок	SEQ	SBA против штаммов v3			SBA против штаммов v2			
	ID	v3.42*	v3.28	v3.30	v2.16*	v2.19	v2.21	v2.24
Дикий тип	17	>32768	512	1024	1024	32	64	256
#4	53	1024	<16	16	<16	16	<16	128
#3	44	4096	32	16	4096	<16	16	16
#3+E313A	43	256	<16	16	64	<16	<16	16
E313A	41	4096	32	256	8192	32	32	128

Комбинация мутантов #2 и #12.

Каждый из мутантов #2 и #12 демонстрировал улучшения в стабильности v2, таким образом, эти два мутанта комбинировали в одном fHbr (SEQ ID NO: 58, форма ΔG). По сравнению с мутантом #12 Tm для N-конца этого комбинированного мутанта увеличивалась на дополнительные 4,2°C, приводя к самой высокой Tm для любого из тестируемых мутантных белков v2. Кроме того, мутант продемонстрировал значительно уменьшенное связывание с fH (величина пика SPR уменьшалась приблизительно в 8 раз).

Мутантный слитый белок.

Мутантные последовательности v2 и v3 были слиты через линкер GSGGGG (SEQ ID NO: 50), также с мутантной последовательностью v1 с получением SEQ ID NO: 48. Эта последовательность включает мутации S58V и L149R для обеих v2 и v3, и мутацию R41S [21] для v1. SEQ ID NO: 47 включает от N-конца к С-концу: мутант v2 #3 (SEQ ID NO: 45); мутант v3 #3 (SEQ ID NO: 44); и мутант v1 "R41S" (SEQ ID NO: 49), связанные обогащенной глицином линкерной последовательностью SEQ ID NO: 50. Слитый белок для удобства может экспрессироваться путем добавления по N-концу последовательности Met-[SEQ ID NO: 37]-, таким образом, обеспечивая получение зрелого белка SEQ ID NO: 48.

Таким образом, этот слитый белок обладает преимуществом, заключающимся в том, что обнаружили, что мутант #3 придает обоим v2 и v3 значительное увеличение стабильности (Tm) и значительное уменьшение аффинности к fH. Для v1 мутация R41S оказывает незначительное влияние на температурную стабильность, но значительно уменьшает связывание с fH.

Исследования при помощи DSC тройного слитого белка (фиг. 8) демонстрируют, что три N-концевых перехода оказываются вместе в пределах широкого пика, имеющего центр при 68°C. Три С-концевых перехода также оказывались вместе. UPLC (сверхэффективная жидкостная хроматография) продемонстрировала, что белок был на 94,9% чистым, и анализ при помощи HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии) продемонстрировал меньше 1,5% олигомеров.

Мутантные белки, экспрессируемые в мембранных везикулах "GMMA".

Менингококковый штамм v1 получали с нокаутами по генам mltA, lpxL1 и synX с получением генетического фона для гиперэкспрессии липопroteinов v2 и v3 fHbr под контролем промотора "ST2" [157] в вакцине "GMMA". Гены v2 встраивали в геном по подвергнутому делеции локусу lpxL1, тогда как гены v3 встраивали по локусу synX. Кроме того, нативный ген v1 fHbr подвергали делеции таким образом, что v2 и v3 могли быть исследованы без взаимного влияния.

Мутанты #3 и #4 тестировали для v2, и мутант #4 тестировали для v3. Кроме того, получали штамм с обоими мутантами v2 и v3 #4. Для этих бактерий экспрессия fHbp и связывание fH оценивали при помощи FACS (клеточного сортера с активацией флуоресценцией).

Для штаммов, экспрессирующих только v2 fHbp, FACS продемонстрировал, что различные белки экспрессировались с похожими уровнями, причем с уровнями на 2 логарифма выше, чем базовый штамм ΔfHbp. Тем не менее, с точки зрения связывания fH мутанты #3 и #4 демонстрировали гораздо меньшее связывание, причем связывание в мутанте #4 было лишь слегка выше фонового. Эти результаты отражают данные SPR, полученные с рекомбинантными белками v2.

Для штамма, экспрессирующего мутант v3 #4, FACS продемонстрировал полную экспрессию fHbp, но его связывание с fH устранялось (соответствуя связыванию fH, обнаруженному для мутации "H222R" [19,25]).

Для штамма, экспрессирующего мутант #4 из v2 и v3, оба белка fHbp могут быть обнаружены при помощи FACS, но связывание с fH было лишь слегка выше, чем обнаруженное для базового штамма ΔfHbp.

Анализ путем вестерн-блоттинга использовали для тестирования стабильности экспрессии fHbp у этих бактерий, выращиваемых в жидкой культуре в течение 6 суток. Экспрессия мутантных белков v2 оставалась стабильной с течением времени, даже когда коэкспрессировался v3. Экспрессия мутантных белков v3 также оставалась стабильной за исключением штамма, экспрессирующего оба мутанта v2 и v3, где экспрессия v3 уменьшалась с течением времени.

Понятно, что изобретение описано выше исключительно в качестве примера, и модификации могут быть осуществлены, оставаясь в объеме и сущности изобретения.

Перечень последовательностей

>SEQ ID NO: 1 [MC58, v1/]

MNRTAFCCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAETTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVY
KQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFG
SDDAGGKLTYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQA
EKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

>SEQ ID NO: 2 [2996, v2/]

MNRTAFCCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAETTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFIY
KQDHSVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 3 [M1239, v3/]

MNRTAFCCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLT
LEDSPQNGTLTSLAQAQGAETTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGQTITLA
SGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPKIDTSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYH
GKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDT
RYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 4 [зрелый 2996]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNP
 DKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGH
 GKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGS
 ATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 5 [2996 ΔG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNT
 GKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLINQ
 RSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
 PEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE
 KVEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 6 [NHBA]

MFKRSVIAMACIFALSACGGGGGGSPDVK SADTL SKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQ
 GQGAPSAQGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDVAQNDMPQNAAGTDSSTPN
 HTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAADGMQGDDPSAGGQNAGNTAA
 QGANQAGNNQAAGSSDPIPASNPAPANGGSNFG RVDLANGVLIDGPSQNITLTHCKGDS
 CSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSADKISNYKKDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIFYK
 PKPTS FARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNRYLT
 YGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGAAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAAKVD
 FGSKSVDGIIDSGDDLHMG TQKFKA AIDGN GFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAG
 KYSYRPTDAEKGFGVFAGKKEQD

>SEQ ID NO: 7 [NadA]

MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAGETI
 YDIGEDGTITQKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAASEI
 EKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENITTFEETKTNIVKIDEKLEAVADT
 VDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAETAAGKA
 EAAAGTANTAADKAEVA AKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQ
 GLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTA AVGGYKSES AVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTS
 SGSSAAYHVG VNYEW

>SEQ ID NO: 8 [NspA]

MKKALATLIALALPAAALAEGASGFYVQADAAHAKASSSLGSAKGFSPRISAGYRINDL
RFAVDYTRYKNYKAPSTDFKLYSIGASAIYDFDTQSPVKPYLGARLSLNRASVDLGGSD
SFSQTSIGLGVLTGVSYAVTPNVDLDAGYRYNYIGKVNTVKNVRSGELSAGVRVKF

>SEQ ID NO: 9 [*HmbR*]

MKPLQMLPIAALVGSIFGNPVLAADAAATETTPVKAIEKAVRVKGQRNAPAAVERVNL
NRIKQEMIRDNKDLVRYSTDVGLSDSGRHQKGFAVRGVEGNRVGVSIDGVNLPDSEEN
SLYARYGNFNSSRLSIDPELVRNIEIVKGADSFNTGSGALGGGVNYQTLQGRDLLDDR
QFGVMMKNGYSTRNREWTNTLGFVSNDRVDAALLYSQRRGHETESAGNRGYAVEG
EGSGANIRGSARGIPDSSKHYNHHALGKIAYQINDNHRIGASLNGQQGHNYTVEESYN
LTASSWREADDVNRRRNANLFYEWMPPDSNWLSSLKADFDYQKTKVA AVNNKGSFPM
DYSTWTRNYNQKDLDEIYNRSMDFRFRFTLRLD SHPLQLGGGRHRLSFKTFVSRDFE
NLNRDDYYFSGRVVRTTSSIQHPVKTTNYGFSLS DQIQWNVFSSRAGIRYDHTKMTPQ
ELNAECHACDKTPPAANTYKGWSGFVGLAAQLNQAWRVGYDITSGYRVPNASEVYFT
YNHSGSNWLPNPNLKAERSTHTLSLQGRSEKGM LDANLYQSNYRNFLSEEQKLTTSG
TPGCTEENAYYGICSDPYKEKLDWQMKNIDKARIRGIELTGRLNVDKVASFVPEGWKLF
GSLGYAKSKLSGDNSLLSTQPLKVIAGIDYESPSEK WGVFSRLTYLGAKKVKDAQYTVY
ENKGWGTPLQKKVKDYPWLNKSAYVFDMYGFYKPAKNLTLRAGVYNLFNRKYTTWD
SLRGLYSYSTTNAVDRDGKGLDRYRAPGRNYAVSLEWKF

>SEQ ID NO: 10 [*NhhA*]

MNKIYRIIWNALNAWVVVSELTRNHTKRASATVKTA VLATLLFATVQASANNEEQEE
DLYLDPVQRTVAVLIVNSDKEGTGEKEKVEENSDWAVYFNEKGVLTAREITLKAGDNL
KIKQNGTNFTYSLKKDLTDLTSVGTEKLSFSANGNKVNITSDTKGLNFAKETAGTNGDT
TVHLNGIGSTLDTLLNTGATTNVTNDNVTDDEKKRAASVKDVLNAGWNIKGVP GTT
ASDNVDFVRTYDTVEFLSADTKTTTVNVESKDNGKKTEVKIGAKTSVIKEKDGLVTG
KDKGENGSSTDEGEGLVTAKEVIDAVNKAGWRMKT TTANGQTGQADKFETVTS GTNV
TFASGKGTATVSKDDQGNITVMYDVNVGDALNVNQLQNSGWNLD SKAVAGSSGKVI
SGNVSPSKGKMDETVNINAGNNIEITRNGKNIDIA TSMTPQFSSVSLGAGADAPTLSVDG
DALNVGSKKDNKPVRITNVAPGVKEGDVTNVAQLKGVAQNLNNRIDNV DGNARAGIA
QAIATAGLVQAYLPGKSMMAIGGGTYRGEAGYAIGYSSISDGGNWI IKG TASGNSRGHF
GASASVGYQW

>SEQ ID NO: 11 [*App*]

MKTTDKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYQYYRDFAE
 NKGKFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMTKAPMIDFSVVS RNGVAALVGDQYIVSVAHN
 GGYNNVDFGAEGRNPQHRFTYKIVKRNNYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTD AEP
 VEMTSYMDGRKYIDQNNYPDRVRIGAGRQYWRSD EDEPNNRESSYHIASAYSWLVGG
 NTFAQNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGF LPTGGSFGDSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQT
 GNPYIGKSNGFQLVRKDWFYDEIFAGDTHSVFYEP RQNGKYSFNDDNNGTGKINAKHE
 HNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYHAAGGVNSYRPRLNNGENISFIDEKGELIL
 TSNINQGAGGLYFQGDFTVSPENNETWQGAGVHI SEDSTVTWKVNGVANDRLSKIGKG
 TLHVQAKGENQGSISVGDGTVILDQQADDKGKKQAFSEIGLVSGRGT VQLNADNQFNP
 DKLYFGFRGGRLDLNGHSLSFHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTITGNKD IATTGNNN
 SLDSKKEIAYNGWFG EKDTTKTNGRLNLVYQPAAEDRTLLSGGTNLNGNITQTNGKLF
 FSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIVWDNDWINRTFKAENFQIKGGQAVVSRNVA
 KVKGDWHL SNHAQAVFGVAPHQSHTICTRSDWTGLTNCVEKTITDDKVIASLTKTDISG
 NVDLADHAHLNLTGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATL
 NGNTSASGNASFNLSDHAVQNGSLTSGNAKANVSHSALNGNVSLADKAVFHFESSRF
 TGQISGGKDTALHLKDSEWTLPSGTELGNLNLDNATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAP
 RRRRRSRRSLLSVTPPTSVESRFNTLTVNGKLN GQGTFRFMSELFGYRSDKLKLAESSE
 GTYTLAVNNTGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSEN LNF TLQNEIIVDAGAWRYQLIRKDG
 EFRLHNPVKEQELSDKLGKAEAKKQAEKDNAQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQA
 GGENVGIMQAEEEKRVQADKDTALAKQREAE TRPATTAFPRARRARRDLPLQLPQPQ
 PQPQRDLISRYANGLSEFSATLNSVF AVQDELDRVFAEDRRNAVWTS GIRDTKHYRSQ
 DFRAYRQQTDLRQIGMQKNLGSGRVGILFSHNRTENTFDDGIGNSARLAHGAVFGQYGI
 DRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGKIRRRVLHYGIQARYRAGFGGFGIEPHIGATRYFVQK
 ADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQHISITPYLSLSYTD AASGKVRTRVNT
 AVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAAA KGPQLEAQHSAGIKLGYRW

>SEQ ID NO: 12 [Omp85]

MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGD TYNDTHGS
 AIIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ
 SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLN IQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIEF
 EGNQVYSRKL MRQMSLTEGGIWTWLTRSNQFNEQKFAQDMEKVTD FYQNNGYFDFR
 ILDTDIQTNEDKTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYE
 RQQMTAVLGEIQNRMGSAGYAYSEISVQPLPNAETKTVD FVLHIEPGRKIYVNEIHITGN
 NKTRDEVVRREL RQMESAPYDTSKLQRSKERV ELLGYFDNVQF DAVPLAGTPDKVDLN
 MSLTERSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLF GTGKSAALRASRSKTTLNGSLSF

TDPYFTADGVSLGYDVYGKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGL
 VAEHLTVNTYNKAPKHYADFIKKYGKTDGTDGSFKGWLYKGTVGWGRNKTDLSALWP
 TRGYLTGVNAEIALPGSKLQYYSSATHNQWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIP
 FFENFYGGGLGSGVRGYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDAR
 TVRLSLFADAGSVWDGKTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVT
 WLSPLGPMKFSYAYPLKKKPEDEIQRFFQQLGTTT

>SEQ ID NO: 13 [NMB2091]

MVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLRQNNQTKGYTPQISV
 VGYDRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNT
 SKVRATLLGISPATRARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQN
 YVQR

>SEQ ID NO: 14 [слияние NHBA]

MASPDVKSADTLSPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQGGQDMAAVSEEN
 TGNGGAAATDKPKNEDEGAQNMPQNAADTDSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAG
 ESEQPANQPDMAANTADGMQGGDPSAGGENAGNTAAQGTNQAENNQTAGSQNPASST
 NPSATNSGGDFGRTNVGNNSVVIDGPSQNITLTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLS
 ADKISNYKKDGKNDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFAFRRSARSRRS
 LPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQ
 GEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRSPSRGRFAAKVDFGSKSVDGIIDSGDGLH
 MGTQKFKAIDGNGFKGTWTENGGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGFGFV
 FAGKKEQDGSGGGGATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRD
 GKIDITIPVANLQSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFGKKLVSDGNLTM
 HGKTAPVKLKA EKFCYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRID
 QIEAAKQ

>SEQ ID NO: 15 [фрагмент NadA]

ATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDF
 KGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDA
 TTNALNKLGENITTTAEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADE
 AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEAVAAKVT
 DIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHD
 TRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

>SEQ ID NO: 16 [MC58, AG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKGIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAGKQ

>SEQ ID NO: 17 [M1239, AG]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTSLAQGAEKTFKAGDKDNLNTGKLNNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 18 [MYTAHT #1]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVVRHIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 19 [MYTAHT #2]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVV RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVVRHIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 20 [MYTAHT #3]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVV RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF RVSGLGGEHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 21 [MYTAHT #4]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF RV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 22 [MYTAHT #5]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF LV GDLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 23 [MYTAHT #6]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVTALQIEKINNPDKIDSLINQRSF LV GDLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 24 [MYTAHT #7]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKSDSLINQRSF LV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 25 [MYTAHT #8]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSC
RKNECKKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF LV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSD
DAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 26 [MYTAHT #9]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLLKCAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRCDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 27 [MYTAHT #10]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSCLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSC
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 28 [MYTAHT #11]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVTALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLV**GDL**GGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKV**RH**IGIAGKQ

>SEQ ID NO: 29 [MYTAHT #12]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF**RIGDI**AGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 30 [MYTAHT #13]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVTALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 31 [MYTAHT #14]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKCAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 32 [MYTAHT #15]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSCLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 33 [MYTAHT #19]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVV
RKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVTGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 34 [MYTAHT #20]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDIHKDKSLQSLTLDQVV
RKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSF RV TGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 35 [MYTAHT #21]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVV
RKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLV GGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 36 [MYTAHT #22]

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVV
RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNDSLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVGGGGEHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSS
DDAGGKLTYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 37

GPDSDRQLQRR

>SEQ ID NO: 38

GSKDISS

>SEQ ID NO: 39

GSKDISSGGGG

>SEQ ID NO: 40 [зрелый M1239]

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTLAQGAIE
KTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQI
EKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDF
TKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDR
AQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 41 [v3(M1239), E243A, AG]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTLAQGAIEKTFKAGDKDNSL
NTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSL
INQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHL
KTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHAIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 42 [v3(M1239), S32V+E243A, AG]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTLAQGAIEKTFKAGDKDNSL
NTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSL
INQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHL

KTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHAIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 43 [*v3(M1239), S32V+L126R+E243A, ΔG*]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTSLAQGAETFKAGDKDNSL
NTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVVALQIEKINNPDKTDSL
NQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHL
KTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHAIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 44 [*v3, S32V + L126R, ΔG*]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTSLAQGAETFKAGDKDNSL
NTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVVALQIEKINNPDKTDSL
NQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHL
KTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 45 [*v2 MYTAHT #3 S32V + L123R, ΔG*]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSL
TGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVVALQIEKINNPDKIDSL
QRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAQGHGKIEHL
KTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 46 [*зрелый MC58, v1*]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTY
GNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDS
EHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAQ
GNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

>SEQ ID NO: 47 [*мутантный слитый v2-v3-v-1*]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSL
TGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVVALQIEKINNPDKIDSL
QRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAQGHGKIEHL

KTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
 EKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTL
 SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNH
 AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKA EYHGKAFSSDDPNG
 RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH
 LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKD
 KGLQSLTLDQSVSKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDG
 QLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIA GEHTSFDKLP
 EGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKR
 HAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLA AKQ

>SEQ ID NO: 48 [мутантный слитый, с лидерной последовательностью v2-v3-v1]

MGPDSRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLA AQG
 AEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVALQIE
 KINNPDKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKA EYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
 QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTL
 EDVIPQNGTLTL SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLAS
 GEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKA EYH
 GKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDT
 RYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLA
 DALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVSKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS
 RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIA
 GEHTSFDKLP EGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLA
 AADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLA
 AKQ

>SEQ ID NO: 49 [MC58, ΔG, мутация 'R41S']

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVSKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNT
 TGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMV
 AKRQFRIGDIA GEHTSFDKLP EGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKIEH
 LKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTV
 NGIRHIGLA AKQ

>SEQ ID NO: 50 [линкер]

GSGGGG

>SEQ ID NO: 51 [последовательность v2 дикого типа, например для подхода GMMa]

VAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNT
GKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLINQ
RSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
PEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE
K VHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 52 [последовательность v3 дикого типа, например для подхода GMMa]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNT
TGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKM
VAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIE
HLKSPELNVELATAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK
IREKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 53 [m1239, мутация L126R]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTSLAQAQAEKTFKAGDKDNSL
NTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVVALQIEKINNPDKTDSLI
NQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHL
KTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 54 [v2, штамм 8047 дикого типа]

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE K VHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 55 [v2, штамм 8047, ΔG]

VAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNT
GKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLINQ
RSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKT

PEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEK
VHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 56 [v2, мутант 'E313A', AG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNT
GKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLNQ
RSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
PEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEK
VHAIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 57 [v2, мутант #3 + 'E313A', AG]

VAADIGAGLADALTAPI.DHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKIKLAAQAQGAEKTYGNGDSLNT
TGKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLIN
QRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHL
KTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHAIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 58 [MYTAHT #2 + #12]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNT
TGKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLIN
QRSFR**RIGD**IAGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLK
TPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE
KVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 59 [v2, штамм 8047, мутант #4, зрелый]

CSSGGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGH
GKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGS
ATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 60 [v2, штамм 8047, мутант #3, зрелый]

CSSGGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTY
GNGDSLNTGKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGH
HGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAG
SATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO: 61 [v3, мутант #2 + #12, AG]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTSLAQAQGAEKTFKAGDKDNSL
NTGKCLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVVALQIEKINNPDKTDSLI
NQRSFR**RIGD**IAGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHL
KTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIAGKQ

Литературные источники

- [1] WO99/57280.
- [2] Massignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
- [3] Welsch *et al.* (2004) *J Immunol* 172:5605-15.
- [4] Hou *et al.* (2005) *J Infect Dis* 192(4):580-90.
- [5] WO03/063766.
- [6] Fletcher *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100.
- [7] Zhu *et al.* (2005) *Infect Immun* 73(10):6838-45.
- [8] Cendron *et al.* (2011) *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 67:531-5.
- [9] Mascioni *et al.* (2009) *J Biol Chem* 284:8738-46.
- [10] Pizza *et al.* (2008) *Vaccine* 26 Suppl 8:I46-8.
- [11] Malito *et al.* (2013) *PNAS USA* 110:3304-9.
- [12] Marshall *et al.* (2012) *Pediatr Infect Dis J* 31:1061-8.
- [13] McNeil *et al.* (2013) *Microbiol Mol Biol Rev* 77:234-52.
- [14] Serruto *et al.* (2012) *Vaccine* 30 Suppl 2: B87-97.
- [15] Scarselli *et al.* (2011) *Sci Transl Med* 3:91ra62.
- [16] WO2011/051893.

- [17] WO2010/046715.
- [18] Schneider *et al.* (2009) *Nature* 458:890-5.
- [19] WO2011/126863.
- [20] Beernink *et al.* (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074-8.
- [21] Beernink *et al.* (2011) *J Immunol* 186:3606-14.
- [22] Rossi *et al.* (2013) *Vaccine* 31:5451-7.
- [23] van der Veen *et al.* (2014) *Infect Immun* PMID 24379280.
- [24] Johnson *et al.* (2012) *PLoS Pathogen* 8:e1002981.
- [25] Pajon *et al.* (2012) *Infect Immun* 80:2667-77.
- [26] Granoff *et al.* (2013) *Clin Vaccine Immunol* 20:1099-107.
- [27] Beernink *et al.* (2008) *Infect Immun* 76:4232-40.
- [28] Scarselli *et al.* (2009) *J Mol Biol* 386:97-108.
- [29] Giuntini *et al.* (2012) *PLoS One* 7:e34272.
- [30] Vu *et al.* (2012) *Sci Rep* 2:341.
- [31] Faleri *et al.* (2013) *FASEB J* fj.13-239012.
- [32] Johnson (2013) *Arch Biochem Biophys* 531:100-9.
- [33] Bruylants *et al.* (2005) *Current Medicinal Chemistry* 12:2011-20.
- [34] Veggi *et al.* (2012) *Biochemistry* 51:9384-93.
- [35] WO2014/030003.
- [36] Jongerius *et al.* (2013) *PLoS Pathog* 9(8): e1003528.
- [37] Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [38] WO2007/028408.
- [39] <http://pubmlst.org/neisseria/>

- [40] Budroni *et al.* (2011) *PNAS USA* 108:4494-99.
- [41] Goldschneider *et al.* (1969) *J. Exp. Med.* 129:1307-26.
- [42] Santos *et al.* (2001) *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:616-23.
- [43] Frasch *et al.* (2009) *Vaccine* 27S:B112-6.
- [44] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [45] WO03/009869.
- [46] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [47] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [48] WO00/66741.
- [49] Martin *et al.* (1997) *J Exp Med* 185(7):1173-83.
- [50] WO96/29412.
- [51] Perkins-Balding *et al.* (2003) *Microbiology* 149:3423-35.
- [52] WO01/55182.
- [53] WO01/38350.
- [54] WO00/23595.
- [55] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:10834-9.
- [56] WO2004/032958.
- [57] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [58] Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [59] WO03/007985.
- [60] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [61] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [62] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.

- [63] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [64] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [65] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [66] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [67] Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- [68] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [69] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [70] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [71] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [72] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [73] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- [74] WO02/34771.
- [75] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [76] Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [77] Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; смотри также страницы 1218-1219.
- [78] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [79] Ravenscroft *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [80] WO03/080678.
- [81] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002).
- [82] EP-A-0372501.
- [83] EP-A-0378881.
- [84] EP-A-0427347.
- [85] WO93/17712.

- [86] WO94/03208.
- [87] WO98/58668.
- [88] EP-A-0471177.
- [89] WO91/01146.
- [90] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [91] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
- [92] EP-A-0594610.
- [93] Ruan *et al.* (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
- [94] WO00/56360.
- [95] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [96] Michon *et al.* (1998) *Vaccine*. 16:1732-41.
- [97] WO02/091998.
- [98] WO01/72337.
- [99] WO00/61761.
- [100] WO00/33882
- [101] Lees *et al.* (1996) *Vaccine* 14:190-198.
- [102] WO95/08348.
- [103] патент США 4882317
- [104] патент США 4695624
- [105] Porro *et al.* (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s
- [106] EP-A-0208375
- [107] WO00/10599
- [108] Gever *et al.* *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).

- [109] патент США 4057685.
- [110] патенты США 4673574; 4761283; 4808700.
- [111] патент США 4459286.
- [112] патент США 4965338
- [113] патент США 4663160.
- [114] патент США 4761283
- [115] патент США 4356170
- [116] WO02/09643.
- [117] Katial *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:702-707.
- [118] WO01/52885.
- [119] Европейский патент 0301992.
- [120] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [121] Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [122] WO02/09746.
- [123] Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [124] WO01/09350.
- [125] Европейский патент 0449958.
- [126] EP-A-0996712.
- [127] EP-A-0680512.
- [128] WO02/062378.
- [129] WO99/59625.
- [130] патент США 6180111.
- [131] WO01/34642.

- [132] WO03/051379.
- [133] патент США 6558677.
- [134] WO2004/019977.
- [135] WO02/062380.
- [136] WO00/25811.
- [137] Peeters *et al.* (1996) *Vaccine* 14:1008-1015.
- [138] Vermont *et al.* (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.
- [139] WO2006/081259.
- [140] Европейский патент 0011243.
- [141] Fredriksen *et al.* (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
- [142] WO01/91788.
- [143] WO2005/004908.
- [144] WO98/56901.
- [145] Claassen *et al.* (1996) 14(10):1001-8.
- [146] WO99/10497.
- [147] Steeghs *et al.* (2001) *The EMBO Journal* 20:6937-6945.
- [148] Fisseha *et al.* (2005) *Infect Immun* 73:4070-80.
- [149] WO2004/015099.
- [150] WO2004/014417.
- [151] WO2004/046177.
- [152] WO2006/046143.
- [153] Adu-Bobie *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:1914-19.
- [154] WO2011/036562.

- [155] Koeberling *et al.* (2014) *Vaccine* 32:2688-95.
- [156] WO2013/033398.
- [157] WO2013/113917.
- [158] Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- [159] Rice *et al.* (2000) *Trends Genet* 16:276-277.
- [160] WO01/64920.
- [161] WO03/020756.
- [162] WO2004/048404.
- [163] WO2004/094596
- [164] WO2006/024954.
- [165] WO2007/060548.
- [166] WO2009/104097.
- [167] WO2013/132452.
- [168] Krissinel & Henrick (2007) *J. Mol. Biol.* 372:774-97

Таблица 1

#	Остаток(и)*	Мутация(и)	Указания	SEQ ID NO	Хим **	Tm1 °C	Tm2 °C	Мон ***
1	H239+E240	R, H	Поверхность между N- и C-концевыми доменами. Задача заключается в том, чтобы имитировать v1. Дополнительный переход в DSC обнаружен при 100,3°C, и обнаружена некоторая агрегация.	18	Да	Н/Д (нет данных)	83,5	34,29
2	S32	V	N-концевой домен. Гидрофильная боковая цепь S32 направлена в гидрофобную полость. Задача заключается в повышении гидрофобности и стабилизации полости.	19	Да	57,0	84,2	80,38
3	S32+L123	V, R	Мутанты #2 + #4	20	Да	63,5	83,84	76,1
4	L123	R	N-концевой домен. В v1 обратное изменение уменьшало стабильность [11].	21	Да	54,1	84,1	89,97
5	S125+G126	G, D	N-концевой домен. Задача заключается в том, чтобы имитировать v1	22	Да	52,3	83,3	90,48

6	V100+S125 +G126	T, G, D	N-концевой домен. Задача заключается в том, чтобы имитировать v1	23	Да	52	83,7	86,4 1
7	I113	S	Поверхностная петля N-концевого домена. Удаление с поверхности возможного сайта расщепления протеазой.	24	Нет	Н/Д	Н/Д	Н/Д
8	V33+L39	C, C	Кор N-концевого домена. Введение мостиковой связи S-S. Обнаружена некоторая агрегация.	25	Нет	55,9	85	28,7 1
9	L41+F69	C, C	Кор N-концевого домена. Введение мостиковой связи S-S.	26	Нет	46,4	84,4	33,5 + 53,2 2
10	F122+S151	C, C	Кор N-концевого домена. Введение мостиковой связи S-S.	27	Нет	-	-	-
11	V100+S125 +G126+H2 39+E240	T, G, D, R, H	Мутанты #1 + #6	28	Нет	47,9	82,2	85,1
12	L123-G128	RIGDIA	N-концевой домен. Задача заключается в том, чтобы имитировать v1 во всей области 123-128	29	Да	62,8	84,4	71,2 8
13	V100	T	Частичный мутант #6	30	Нет	43	84,3	91,0
								6
14	L41	C	Частичный мутант #9. Обнаружена некоторая агрегация.	31	Нет	-	85	24,8 2
15	F122	C	Частичный мутант #10. Обнаружена некоторая агрегация.	32	Нет	-	84,4	16,6 3
19	S32+S125	V, T	N-концевой домен. Дополнительное увеличение гидрофобности по сравнению с #2	33	Нет	50,6	83,5	81,3
20	S32+S125+ L123	V, T, R	Комбинация #4 + #19	34	Нет	-	-	-
21	S32+S125	V, G	N-концевой домен. Дополнительное увеличение гидрофобности по сравнению с #2	35	Нет	52,8	84	75,3
22	S32+S125+ L123	V, G, R	Комбинация #4 + #21	36	Да	-	-	-
23	S32+L123- G128	RIGDIA S	Комбинация #2 + #12	62	Да	66,3	84,7	-

* Пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO: 5; добавлены +26 для того, чтобы соответствовать SEQ ID NO: 18-39.

** Устойчивость к расщеплению химотрипсином.

*** % мономерная форма.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый полипептид, содержащий мутантный вариант 2 полипептида, связывающего фактор Н (v2 fHbp), и мутантный вариант 3 полипептида, связывающего фактор Н (3 fHbp), где:

1) мутантный v2 fHbp полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, и/или содержит фрагмент SEQ ID NO: 5, длина которого составляет по меньшей мере 7 аминокислот и который содержит остаток, соответствующий остатку 32 в SEQ ID NO: 5; где аминокислотная последовательность мутантного v2 fHbp отличается от SEQ ID NO: 5 по остатку 32 заменой S32V; и

2) мутантный v3 fHbp полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17, и/или содержит фрагмент SEQ ID NO: 17, длина которого составляет по меньшей мере 7 аминокислот и который содержит остаток, соответствующий остатку 32 в SEQ ID NO: 17; где аминокислотная последовательность мутантного v3 fHbp отличается от SEQ ID NO: 17 по остатку 32 заменой S32V.

2. Полипептид по п.1, где:

1) аминокислотная последовательность мутантного v2 fHbp полипептида дополнительно отличается от SEQ ID NO: 5 заменой по одному или более чем одному из L123, V124, S125, G126, L127 и/или G128, где замена(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из: L123R; V124I; S125G или S125T; G126D; L127I; G128A; и/или

2) аминокислотная последовательность мутантного v3 fHbp полипептида дополнительно отличается от SEQ ID NO: 17 заменой по L126, где замена представляет собой L126R.

3. Полипептид по любому из пп.1, 2, содержащий:

1) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, возможно модифицированную единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками в количестве вплоть до 5; и/или

2) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, возможно модифицированную единичными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками в количестве вплоть до 5.

4. Полипептид по любому из пп.1-3, где мутантный v2 fHbp полипептид и/или мутантный v3 fHbp полипептид дополнительно объединен(ы) с v1 fHbp полипептидом.

5. Полипептид по п.4, где v1 fHbp полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 16, и/или содержит фрагмент SEQ ID NO: 16.

6. Полипептид по любому из пп.3-5, который содержит:

1) v1 fHbp полипептид;

2) мутантный v2 fHbp полипептид; и

3) мутантный v3 fHbp полипептид,

где полипептиды расположены в порядке: v2 fHbp полипептид, v3 fHbp полипептид и v1 fHbp полипептид от N-конца к С-концу.

7. Полипептид по любому из пп.4-6, где мутантный v2 fHbp, мутантный v3 fHbp и мутантный v1 fHbp полипептиды соединены линкером, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, между каждой из последовательностей.

8. Плазмида или другая нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп.1-7.

9. Мембранные везикулы, полученные из клетки-хозяина, трансформированной плазмидой по п.8, где везикулы включают полипептид по любому из пп.1-7.

10. Иммуногенная композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-7 или мембранные везикулы по п.9.

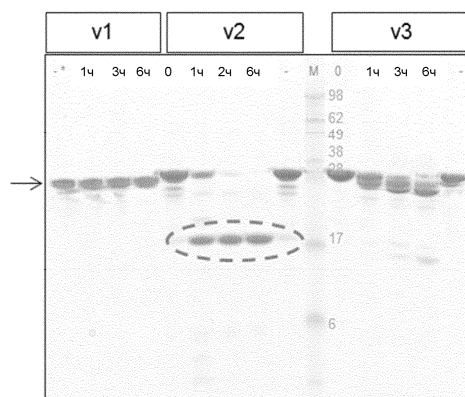
11. Композиция по п.10, дополнительно содержащая (1) конъюгированный капсульный сахарид из *N. meningitidis* серогруппы A, C, W135 и/или Y, и/или (2) конъюгированный капсульный сахарид из *S. pneumoniae*.

12. Полипептид по любому из пп.1-7 в качестве лекарственного средства.

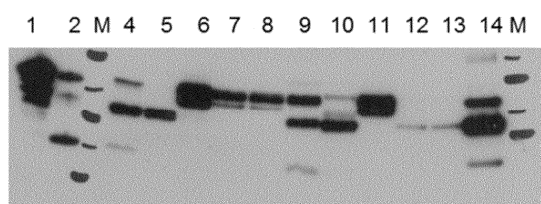
13. Композиция по любому из пп.10, 11 в качестве лекарственного средства.

14. Полипептид по любому из пп.1-7 для предупреждения инфекции, вызванной *Neisseria*.

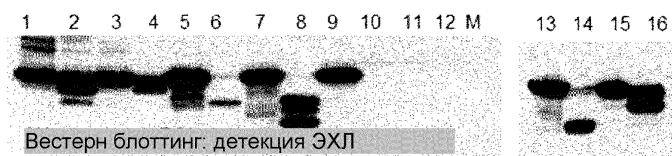
15. Композиция по любому из пп.10, 11 для предупреждения инфекции, вызванной *Neisseria*.



Фиг. 1



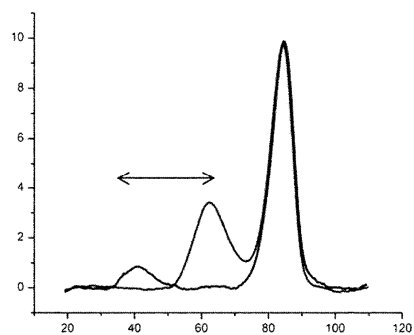
Фиг. 2



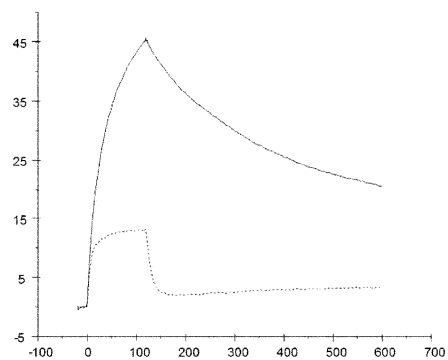
Фиг. 3



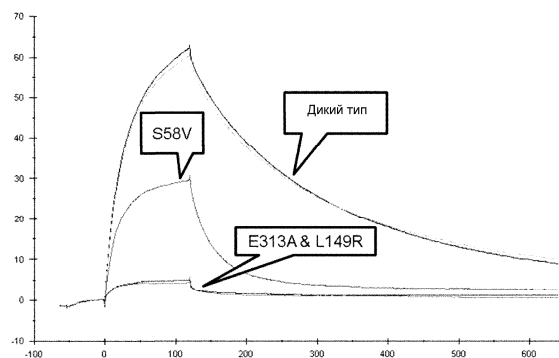
Фиг. 4



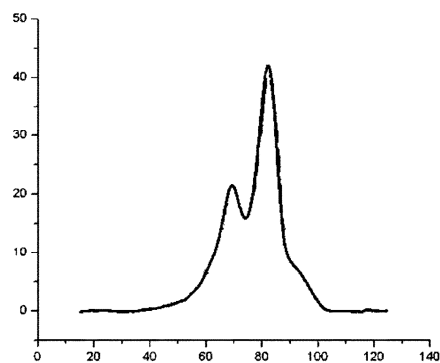
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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