

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292058** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.04.19

(22) Дата подачи заявки  
2021.02.17

(51) Int. Cl. *A61K 39/112* (2006.01)  
*A61K 39/116* (2006.01)  
*A61K 39/09* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

(54) **ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ СРЕПТОКОККА ГРУППЫ А С  
КОНЬЮГАТАМИ ПОЛИСАХАРИД-БЕЛОК**

(31) 62/977,886; 63/013,924; 63/090,069;  
63/123,293

(32) 2020.02.18; 2020.04.22; 2020.10.09;  
2020.12.09

(33) US

(86) PCT/US2021/018402

(87) WO 2021/167996 2021.08.26

(71) Заявитель:  
ВЭКСАЙТ, ИНК. (US)

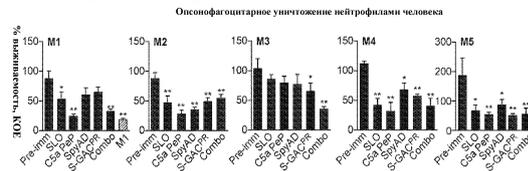
(72) Изобретатель:

Фэйрман Джеффри С., Капур Нирадж,  
Дэйви Питер Т., Седра Энджи А. (US)

(74) Представитель:

Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,  
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,  
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф. (RU)

(57) Изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим полипептидные антигены стрептококка группы А (GAS) и по меньшей мере один конъюгат полипептид-полисахарид. В настоящем изобретении также предлагаются способы применения таких композиций для индукции у субъектов иммунных ответов против инфекций, вызываемых GAS.



**A1**

**202292058**

**202292058**

**A1**

## **ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ СТРЕПТОКОККА ГРУППЫ А С КОНЬЮГАТАМИ ПОЛИСАХАРИД-БЕЛОК**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США 62/977886, поданной 18 февраля 2020 г.; предварительной заявки США 63/013924, поданной 22 апреля 2020 г.; предварительной заявки США 63/090069, поданной 9 октября 2020 г.; и предварительной заявки США 63/123293, поданной 9 декабря 2020 г., полное раскрытие которых включено в настоящий документе путем ссылки.

### **Декларация государственного интереса**

Это изобретение было сделано при поддержке правительства Соединенных Штатов в рамках гранта № 93.360, субгранта 4500003905, предоставленного Health and Human Services Office of the Assistant Secretary for Preparedness and Response (HHS/ASPR) в соответствии с CARB-X Pass Through Entity. Правительство имеет определенные права на изобретение.

### **ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

Перечень последовательностей, связанный с этой заявкой, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен посредством ссылки в описание. Имя текстового файла, содержащего список последовательностей, STRO\_011\_04WO\_ST25.txt. Текстовый файл размером 321 kb был создан 12 февраля 2020 г. и отправляется в электронном виде через EFS-Web.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящая заявка относится к областям микробиологии и разработки вакцин.

### **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Стрептококк группы А (GAS) является основным патогеном человека, ежегодно вызывающим 700 миллионов случаев фарингита («стрептококкового фарингита») во всем мире и возрастающее число случаев тяжелых инвазивных инфекций, сепсиса, некротизирующего фасциита, отита среднего уха и синдрома токсического шока. Фарингит широко распространен среди детей школьного возраста и является основным

источником назначения антибиотиков во всем мире; оказывая селективное давление на резистентность всей микрофлоры человека. GAS также ответственен за постинфекционную иммуноопосредованную ревматическую болезнь сердца (RHD), ведущую причину смертности в развивающихся странах. Около 30 миллионов человек в настоящее время страдают RHD, при этом ежегодно умирает более 300000 человек (60% моложе 70 лет) и теряется 11,5 миллионов лет жизни с поправкой на инвалидность.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую первый полипептидный антиген стрептококка группы А (GAS); второй полипептидный антиген GAS; и по меньшей мере один конъюгат полипептид-полисахарид, где полипептид конъюгата представляет собой третий полипептидный антиген GAS или не несущий GAS полипептид, и содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту (nnAA), и где полисахарид конъюгата представляет собой полисахарид GAS или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой полноразмерный антиген GAS. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой пептидный фрагмент полноразмерного антигена GAS. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептидные антигены GAS независимо выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина О (SLO), Sib35 и Sfb1. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична

SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления не несущий GAS полипептид представляет собой ферритин. В некоторых вариантах осуществления третий полипептидный антиген GAS или не несущий GAS полипептид выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдезимины (ADI), SEQ ID NO: 25 и белка D. В некоторых вариантах осуществления третий полипептидный антиген GAS представляет собой SLO.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна неприродная аминокислота (nnAA) заменяет лизин, лейцин или изолейцин в полипептиде конъюгата. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна nnAA заменяет лизин, лейцин, аргинин или изолейцин в полипептиде конъюгата. В некоторых вариантах осуществления nnAA содержит реакционноспособную группу, подходящую для клик-химии. В некоторых вариантах осуществления nnAA выбирают из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-4-азидобутановой кислоты, 2-азидо-3-фенилпропионовой кислоты, 2-амино-3-азидопропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-

ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты и 2-амино-5-азидопентановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления ппАА представляет собой рАМФ.

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления полипептид SpyAD содержит замену на рАМФ в положениях K64, K287, K386 и K657 SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления полипептид SpyAD содержит замену на рАМФ в положениях K64, K287, K386 и K657 SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит замену на рАМФ в положениях K15, K193 и K316 SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит замену на рАМФ в положениях K15, K193 и K316 SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или SEQ ID: 36.

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой полипептид ферритин и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах

осуществления полипептид ферритин содержит замену на рAMF в положении I5 SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления полипептид ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата содержит полирамнозное ядро. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 7 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата представляет собой тетрамерный, гексамерный, октамерный или декамерный полисахарид. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу примерно от 10 кДа до 40 кДа.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы А (GAS); полипептидный антиген стрептолизин О (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, который лишен иммунодоминантной боковой цепи N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9 и содержит замену на рAMF в положениях K64, K287, K386 и K657. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33 и содержит замену на рAMF в положениях K64, K287, K386 и K657. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы А (GAS); полипептидный антиген стрептолизин О (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид аргининдезимиразу (ADI) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15 и содержит замену на рAMF в положениях K15, K193 и K316. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 и содержит замену на рAMF в положениях K15, K193 и K316. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS); полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид ферритин и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления белок ферритин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21, и содержит замену на рAMF в положении I5. В некоторых вариантах осуществления белок ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от примерно 10% до примерно 50% первого антигена GAS, от примерно 10% до примерно 50% второго антигена GAS и от примерно 10% до примерно 50% конъюгата полипептид-полисахарид. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит один или несколько адъювантов, выбранных из квасцов, сапонины, монофосфориллипида A (MPL) или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит Alhydrogel.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии стрептококка группы A (GAS) у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции, описанной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет 18 лет или больше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет меньше 18 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет от 5 лет до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

В некоторых вариантах осуществления бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M11, M12, M22, M28, M75 и M89. В некоторых вариантах осуществления бактерия GAS представляет собой серотип, выбранный из M1, M3, M5, M9, M12, M18, M22, M25, M28, M71, M72 и M74. В некоторых вариантах осуществления бактерия GAS представляет собой серотип, выбранный из M1, M4, M6, M11, M12, M22, M44, M75, M77, M77 и M81. В некоторых вариантах осуществления бактерия GAS представляет собой серотип, выбранный из M1, M2, M3, M4, M6, M9, M12, M18, M22, M75, M77, M89 и M92. В некоторых вариантах осуществления бактерия GAS представляет собой серотип, выбранный из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M28, M62 и M89. В некоторых вариантах осуществления бактерия GAS представляет собой серотип, выбранный из M1, M2, M3, M4, M6, M12, M22, M28, M49, M53, M68, M77, M80, M83, M87, M89 и M92.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция индуцирует у субъекта выработку антител против бактерии стрептококка группы A (GAS) и не индуцирует выработку антител у субъекта против человеческой ткани. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ против бактерии *Shigella* у субъекта, при этом бактерия *Shigella* содержит полисахарид с полириманозным остовом.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает применение иммуногенной композиции, описанной в настоящем документе, для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает применение иммуногенной композиции, описанной в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет 18 лет или больше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет меньше 18 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет от 5 лет до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фигуре 1A и фигуре 1B показаны уровни экспрессии нативных полипептидных антигенов и природных аминокислот, содержащих полипептидные антигены, используемые для получения конъюгатов с полисахаридом GAS.

На фигуре 2 показаны титры сывороток, иммунизированных конъюгатом полипептидный антиген- и полипептид-полисахарид, в сравнении с контрольным образцом сыворотки до иммунизации.

На фигуре 3A, фигуре 3B, фигуре 3C, фигуре 3D и фигуре 3E показаны титры антител и изменение связывания IgG в иммунной сыворотке в сравнении с преиммунной контрольной сывороткой.

На фигуре 3F показано связывание IgG кролика с GAS, нокаутным по SpyAD, подтверждая связывание с нативным GAS.

На фигуре 4 показана повышенная уничтожающая способность иммунной сыворотки по сравнению с контрольной преиммунной сывороткой.

На фигуре 5A, фигуре 5B, фигуре 5C, фигуре 5D, фигуре 5E и фигуре 5F показаны результаты экспериментов по активной иммунизации, включая титры антител, размер очагов поражения и бактериальную нагрузку, и процентная выживаемость.

На фигуре 6A и фигуре 6B показаны данные по процентной выживаемости после пассивной иммунизации мышей, подвергнутых внутрибрюшинному (IP) заражению.

На фигуре 7 показаны данные по размеру поражения и бактериальной нагрузке после пассивной иммунизации мышей, подвергнутых подкожному заражению.

На фигуре 8 показан ELISA-анализ титров иммунной сыворотки против *S. flexneri 2a* OPS.

На фигуре 9 показана общая схема реакции для дериватизации GAS с помощью DBCO-PEG<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> и последующей конъюгации с рAMF-модифицированным SpyAD.

На фигуре 10 показан анализ SEC MALS очищенного нативного GAS, очищенного нативного SpyAD[4pAMF] и их очищенных конъюгатов полипептид-полисахарид.

На фигуре 11 показан вестерн-блот-анализ, оценивающий антиген-специфические антисыворотки на перекрестную реактивность с лизатом сердца человека.

Фигура 12 представляет собой графическое представление последовательностей фрагментов для выбранных антигенов.

На фигуре 13 показаны сравнительные данные по экспрессии выбранных антигенов.

На фигуре 14 показаны данные по экспрессии выбранных одиночных и двойных мутантов SLO по сравнению с GFP.

Фигура 15 представляет собой графическое представление усеченных последовательностей SLO по сравнению с неусеченной последовательностью SLO.

На фигуре 16 показаны уровни экспрессии (общие и растворимые) для усеченных вариантов SLO.

На фигуре 17 показана чистота захваченных пептидных фрагментов с помощью колоночной хроматографии HisTrap.

На фигуре 18 показана чистота выбранных экспрессированных пептидов после расщепления TEV и очистки с помощью HisTrap.

На фигуре 19 показаны результаты очистки экспрессированных пептидов методом эксклюзионной хроматографии.

На фигуре 20 показана оценка иммуногенности выбранных фрагментов SLO *in vivo* у кроликов.

На фигуре 21 показано использование сыворотки от ложно иммунизированных и иммунизированных пептидной комбинацией мышей для опсонизации GAS в анализе ОРК.

На фигуре 22A, фигуре 22B и фигуре 22C показаны результаты внутрикожного заражения (M1 89155 GAS) мышей CD-1 дикого типа, ложно иммунизированных или иммунизированных пептидной комбинацией, включая данные по размеру поражения и нагрузке GAS.

На фигуре 23 показаны результаты анализа гемолиза эритроцитов для оценки присутствия функциональных антител против вариантов SLO.

На фигуре 24A, фигуре 24B и фигуре 24C показано опсонофагоцититарное уничтожение GAS различных серотипов нейтрофилами человека в присутствии иммунной сыворотки от иммунизированных кроликов, блокирование лизиса антисывороткой и способность к «кислородному взрыву» нейтрофилов человека, подвергшихся воздействию супернатантов GAS, содержащих SLO.

На фигуре 25A и фигуре 25B показано дифференциальное связывание IgG иммунных сывороток с дополнительными поверхностными антигенами серотипа GAS.

На фигуре 26 показана экспрессия 10 pAMF-содержащих вариантов полипептида SLO.

На фигурах 27А и 27В показан анализ SDS-PAGE вариантов SLO во время двух стадий очистки.

На фигуре 28 показаны условия для конъюгирования вариантов SLO с DBCO-GAC.

На фигуре 29 показан анализ SDS-PAGE конъюгатов вариантов 3- и 4-pAMF с вариантами SLO.

На фигуре 30 показаны данные SEC-MALS для конъюгатов вариантов 3- и 4-pAMF с вариантами SLO.

На фигуре 31А и фигуре 31В показаны титры антител у мышей после иммунизации с использованием конъюгатов, изготовленных с отобранными вариантами SLO( $\Delta$ C101) в качестве белков-носителей, и результаты анализа гемолиза с использованием антисывороток, полученных от мышей, вакцинированных конъюгатами, изготовленными с использованием тех же вариантов. На фигуре 31С показаны титры антител у мышей после иммунизации с использованием конъюгатов, изготовленных с отобранными вариантами SLO( $\Delta$ C101), и с использованием длинного полисахарида в качестве покрывающего антигена в ELISA.

На фигуре 32 показаны данные SEC-MALS для конъюгата SpyAD[4pAMF] и длинного полисахарида.

На фигуре 33А и фигуре 33В показаны уровни экспрессии 22 вариантов SLO с 3-8 pAMF и соответствующие гели для очищенных вариантов, содержащих 5-8 pAMF.

На фигуре 34 показан анализ SDS-PAGE конъюгатов SLO, содержащих 5- и 6-pAMF варианты, с длинным GAC.

На фигуре 35 показаны данные SEC-MALS для конъюгатов SLO, содержащих варианты 5- и 6-pAMF, с длинным GAC.

На фигуре 36А, фигуре 36В и фигуре 36С показан ЯМР-анализ очищенного полисахарида, происходящего из бактериального штамма GAS, экспрессирующего PS, лишенный GlcNAc.

На фигуре 37 показан вестерн-блоттинг, демонстрирующий удаление М-белка из полисахарида при очистке, как описано в примере 19.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### *Обзор*

Несмотря на высокий мировой спрос, не существует безопасной и эффективной коммерческой вакцины против GAS. Особенности патогена создают особые проблемы для вакцинации, включая его инвариантную капсулу из гиалуроновой кислоты, иммунологически инертного углевода, повсеместно встречающегося в соединительных тканях. Кроме того, иммунодоминантные поверхностно-заякоренные белки M GAS являются высоко полиморфными (> 200 типов *emm*), и области их димерной суперспиральной структуры могут вызывать аутоиммунный ответ против сердечной ткани при ревматической болезни сердца (RHD). Всемирная организация здравоохранения, Международный институт вакцин, фонд Wellcome Trust, Фонд Билла и Мелинды Гейтс, и другие недавно собрались для консультаций по разработке вакцины против GAS, чтобы решить эти серьезные научные проблемы и удовлетворить эту первостепенную глобальную потребность в области здравоохранения.

### ***Стрептококк группы А***

Бактерии стрептококков группы А (GAS) представляют собой грамположительные бета-гемолитические кокки, собранные в цепочки. Они отвечают за целый ряд заболеваний у людей. Эти заболевания включают острый фарингит (острый фарингит), средний отит и инфекции кожи и мягких тканей, такие как импетиго и целлюлит. Сюда также могут входить редкие случаи инвазивных (серьезных) заболеваний, таких как некротизирующий фасциит (болезнь поедания плоти) и синдром токсического шока (TSS). Несколько факторов вирулентности вносят вклад в патогенез GAS, такие как белок M, гемолизины и внеклеточные ферменты.

Вакцинология GAS была сосредоточена в основном на белке M, заякоренном на клеточной стенке. В исторических исследованиях добровольцам вводили препараты неочищенного цельного белка M, после чего в глотку вводили живые бактерии GAS. Несмотря на то, что эти препараты уменьшали колонизацию GAS, сообщалось об увеличении частоты случаев появления острой ревматической лихорадки (ARF) у некоторых иммунизированных субъектов. К настоящему времени клинические испытания на людях прошли два препарата вакцины с N-концевым белком M: шестивалентный препарат (Dale JB. 1999. *Vaccine*, 17:193–200; Kotloff et al, 2004. *JAMA* 292:709–715; Hall et al., 2004. *Infect. Immun.* 72:2507–2512) и 26-валентный препарат (Hu et al., 2002. *Infect. Immun.* 70:2171–2177; McNeil et al., 2005. *Clin. Infect. Dis.* 41:1114–1122). Эти препараты хорошо переносились взрослыми добровольцами. Совсем недавно была разработана аналогичная поливалентная вакцина, которая

включает N-концевые пептиды, представляющие 30 серотипов GAS ((Dale et al., 2011. *Vaccine* 29:8175–8178.). Сыворотки, полученные против этой экспериментальной вакцины, проявляли бактерицидную активность в отношении всех 30 вакцинных серотипов, а также 24 (из 40 протестированных) невакцинных серотипов. Хотя было показано, что такие препараты обладают способностью защищать от некоторых невакцинных серотипов, они не защищают от всех глобально циркулирующих серотипов (Abdissa et al., 2006. *Clin. Infect. Dis.* 42:1362–1367; Ikebe et al., Working Group for Beta-Haemolytic Streptococci in Japan. 2007. 2001-2005. *Epidemiol. Infect.* 135:1227–1229; Nir-Paz et al., 2010. *Epidemiol. Infect.* 138:53–60; Steer et al., 2009. *Lancet Infect. Dis.* 9:611–616; O’Loughlin et al., 2007. *Clin. Infect. Dis.* 45:853–862). 30 включенных серотипов основаны на серотипах, распространенных в Северной Америке и Европе (Dale JB et al., 2011. *Vaccine* 29:8175–8178.), которые часто отличаются от различных серотипов, выделенных в эндемичных регионах. Недавно сообщалось об использовании белков GAS и конъюгатов белок-GAC в качестве вакцин (Di Benedetto, R. et al., 2020. *J. Mol. Sci.* no 22: 8558), хотя в них используются неспецифические методы конъюгации, которые могут разрушают как В/Т-клеточные эпитопы на белке-носителе, так и остов PS. Кроме того, эти конъюгаты также были изготовлены с нативным GAC, который содержит потенциально перекрестно-реактивный иммунодоминантный эпитоп GlcNAc.

Таким образом, в данной области существует потребность в улучшенных вакцинах против GAS.

### ***Комбинированные вакцины***

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую два или более полипептидных антигена GAS и конъюгат полипептид-полисахарид. Для ясности, в описанных в настоящем документе композициях каждый полипептид является разным. Например, в композициях, содержащих первый, второй и третий полипептидный антиген или конъюгат полипептид-полисахарид, первый, второй и третий полипептиды имеют различные последовательности.

### ***Антигены GAS***

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции по настоящему раскрытию содержат два или более полипептидных антигена GAS. В

некоторых вариантах осуществления полипептидные антигены GAS выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина O (SLO), стрептококкового иммуноглобулин-связывающего белка 35 (Sib35) и фибронектин-связывающего белка F1 (Sfb1). В некоторых вариантах осуществления полипептидные антигены GAS выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина O (SLO), стрептококкового иммуноглобулин-связывающего белка 35 (Sib35), фибронектин-связывающего белка F1 (Sfb1) и полипептида Adhesion and Division polypeptide (SpyAD). В таблице 1 ниже представлены справочные идентификаторы UniProt для каждого из этих антигенов GAS.

**Таблица 1: Справочные идентификаторы UniProt для иллюстративных антигенов GAS**

<b>Антиген</b>	<b>Идентификатор UniProt</b>
C5a	P15926
SLO	P0C0I3
Sib35	Q1XG74
Sfb1	Q48VN7

В некоторых вариантах осуществления полипептидные антигены GAS содержат полную последовательность полипептидного антигена. В некоторых вариантах осуществления полипептидные антигены GAS содержат фрагмент полной последовательности полипептидного антигена. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген C5a GAS, где полипептид C5a представляет собой фрагмент полного полипептида C5a. В некоторых вариантах осуществления фрагмент C5a содержит аминокислоты 90-1035 полного белка (*например*, содержит SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген SLO GAS, где полипептид SLO представляет собой фрагмент полного полипептида SLO. В некоторых вариантах осуществления фрагмент SLO содержит аминокислоты 79-571 полного белка (*например*, содержит SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления полипептидные антигены GAS содержат одну или несколько аминокислотных мутаций в аминокислотной последовательности дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген C5a GAS, где полипептид C5a содержит

одну или несколько аминокислотных мутаций. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные мутации представляют собой D131A и S513A (*например*, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген SLO GAS, где полипептид SLO содержит одну или несколько аминокислотных мутаций. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная мутация представляет собой W535A (*например*, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 32).

В таблице 2 ниже представлены аминокислотные последовательности иллюстративного антигена GAS. Мутированные аминокислоты выделены жирным шрифтом. В некоторых вариантах осуществления подчеркнутые и выделенные курсивом аминокислоты отщепляются от зрелых антигенов GAS.

**Таблица 2: Иллюстративные антигены GAS**

Антиген	Аминокислотная последовательность	SEQ ID:
SLO [фрагмент 79-571] WT с His tag и TEV последовательность	<i>MHHHHH</i> HGSGENLYFOGAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEE DHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKF IVIERKKKNINTTPVDISIIDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPD AVVTKRNPQKIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVST AidNLV NQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILD GTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDK SVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSNVAYGRTV FVKLETSSKSN VEA AFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTA VVLGGDAAEHN KVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAG VNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEIN YD DKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMAREC TGLAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK	5
SLO [фрагмент 79-571] W535A с лидером	<i>MHHHHH</i> HGSGENLYFOGAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEE DHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKF IVIERKKKNINTTPVDISIIDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPD AVVTKRNPQKIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVST AidNLV NQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILD GTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDK SVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSNVAYGRTV FVKLETSSKSN VEA AFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTA VVLGGDAAEHN KVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAG VNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEIN YD DKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMAREC TGLAAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK	7
SLO(ΔC101) фрагмент W535A без лидера, с G, выступающим после расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNE LEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDIS IIDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPD AVVTKRNPQKIHIDL PGMGDKATVEVNDPTYANVST AidNLV NQWHDNYSGGNTLP ARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEK KVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSNVAYGRTV FVKLETSSKSN DVEA AFSAALKGTDV KTNGKYS DILENSSFTA VVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVI	53

Антиген	Аминокислотная последовательность	SEQ ID:
	KDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTE YTSGKINLSHQ	
C5a [фрагмент 90-1035] WT с лидером	<u>MHHHHHHS</u> GENLYFOGKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTL QEKAGKGAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKE DLEKAKKEHGITYGEVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHG THVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLAD YARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETKKA FDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFSGKTRLPLADHPDYGVVGTPA AADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKEMPVLSTNRFE PNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDIDFKDKIAN AKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAFISRKDGLLL KDNPKKTITFNATPKVLPTASGKLSRFSSWGLTADGNPKPI AAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQYET QYPMTPSERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSRQQA GAVDAKKASAATMYVTDKNTSSKVHLNNSDTEFEVTVTVH NKSDKPQELYQATVQTDKVDGKHFALAPKALYETSWQKITI PANSSKQVTPIDASRFSKDLAQMKNFYFLEGFVRFKQDPT KEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDA KDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIE DIESSEITETIFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGD GNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLKKEGNVVTSEVTEQV VKNYNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYR VRYTPISSGAKEQHTDFDVVDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLA SKPKTSQPVYRERIAITYMDEDLPTTEYISPNEDEGTFLLPEEAE TMEGATVPLKMSDFTYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK	1
C5a [фрагмент 90-1035] D131A/S513A с лидером	<u>MHHHHHHS</u> GENLYFOGKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTL QEKAGKGAGTVVAVIAAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKE DLEKAKKEHGITYGEVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHG THVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLAD YARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETKKA FDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFSGKTRLPLADHPDYGVVGTPA AADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKEMPVLSTNRFE PNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDIDFKDKIAN AKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAFISRKDGLLL KDNPKKTITFNATPKVLPTASGKLSRFSSWGLTADGNPKPI AAPGQDILSSVANNKYAKLSGTAMSAPLVAGIMGLLQKQYET QYPMTPSERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSRQQA GAVDAKKASAATMYVTDKNTSSKVHLNNSDTEFEVTVTVH NKSDKPQELYQATVQTDKVDGKHFALAPKALYETSWQKITI PANSSKQVTPIDASRFSKDLAQMKNFYFLEGFVRFKQDPT KEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDA KDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIE DIESSEITETIFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGD GNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLKKEGNVVTSEVTEQV VKNYNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYR VRYTPISSGAKEQHTDFDVVDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLA SKPKTSQPVYRERIAITYMDEDLPTTEYISPNEDEGTFLLPEEAE TMEGATVPLKMSDFTYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK	3

Положения остатков в таблице 2 выше и в других местах в настоящем раскрытии относятся к нумерации остатков в соответствии с положением остатков в полноразмерных последовательностях (например, как указано в таблицах 1 и 3 со

ссылкой на базу данных последовательностей UniProt) для идентификации фрагментов и/или остатков лизина, модифицированных ppAA (например, замены определенных остатков лизина pAMF).

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген C5a GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген C5a GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95 %, 95%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 29-30. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген C5a GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген C5a GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 29-30. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген SLO GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 5-8. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген SLO GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген SLO GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 5-8. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген SLO GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген SpyAD GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 95%, 97%, 98% или 99%

идентична SEQ ID NO: 10 или 33. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит полипептидный антиген SpyAD GAS, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10 или 33.

#### *Конъюгаты полипептид-полисахарид*

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере один конъюгат полипептид-полисахарид. Конъюгаты полипептид-полисахарид содержат полипептид конъюгата (также называемый белком-носителем) и полисахарид, конъюгированный с полипептидом конъюгата в одном или нескольких положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата выбран из SpyAD, ADI, SEQ ID NO: 25, ферритина и белка D. В таблице 3 ниже представлены справочные идентификаторы UniProt для иллюстративных полипептидов конъюгата.

**Таблица 3. Справочные идентификаторы UniProt и CAS для иллюстративных полипептидов конъюгата**

<b>Антиген</b>	<b>Справочный идентификатор UniProt (или CAS)</b>
SpyAD	Q9A1H3
ADI	P0C0B3
Белок D	R4R7Q5
ферритин	P02792
CRM197	(CAS: 1272033-67-6)

В некоторых вариантах осуществления полипептиды конъюгата содержат полную последовательность полипептидного антигена. В некоторых вариантах осуществления полипептиды конъюгата содержат фрагмент полной последовательности. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит конъюгат полипептид-полисахарид, где полипептид конъюгата представляет собой SpyAD и представляет собой фрагмент полного полипептида SpyAD (*например*, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления фрагмент SpyAD содержит аминокислоты 33-849 полного белка (*например*, содержит SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит конъюгат

полипептид-полисахарид, где полипептид конъюгата представляет собой ADI и представляет собой фрагмент полноразмерного полипептида ADI (*например*, содержит SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит конъюгат полипептид-полисахарид, где полипептид конъюгата представляет собой ферритин и представляет собой фрагмент полноразмерного полипептида ферритина (*например*, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22).

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата содержит одну или несколько аминокислотных мутаций в аминокислотной последовательности дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SpyAD, при этом полипептид SpyAD содержит одну или несколько аминокислотных мутаций. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой ADI, где полипептид ADI содержит одну или несколько аминокислотных мутаций. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная мутация представляет собой D277A (*например*, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16).

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата содержит одну или несколько неприродных аминокислот (npAA). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько npAA содержат реакционноспособную группу, подходящую для клик-химии. В настоящем документе «реакционноспособная группа, подходящая для клик-химии» относится к фрагменту, такому как азид или алкин, способному подвергаться реакции клик-химии со второй реакционноспособной группой, подходящей для клик-химии. В некоторых вариантах осуществления одна реакционноспособная группа, подходящая для клик-химии, взаимодействует со второй реакционноспособной группой, подходящей для клик-химии, с образованием замещенного триазола. Примеры такого типа клик-реакции можно найти, например, в международной публикации РСТ № WO 2018/126229. Общие примеры клик-реакций без использования металлов, используемых в биомедицинских приложениях, можно найти, например, в работе Kim, *et al.*, *Chemical Science*, 2019, 10, 7835-7851. Примеры npAA, содержащие реакционноспособные группы, подходящие для клик-химии, включают 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановую кислоту (pAF), 2-амино-4-азидобутановую кислоту, 2-азидо-3-фенилпропионовую кислоту, 2-амино-3-азидопропановую кислоту, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановую кислоту (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-

ил)пропановую кислоту и 2-амино-5-азидопентановую кислоту. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата содержит одну или несколько ппАА, при этом каждые из ппАА представляют собой рАМФ.

В таблице 4 ниже представлены аминокислотные последовательности иллюстративных полипептидов конъюгата. Сайты, подходящие для замены на ппАА, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В некоторых вариантах осуществления подчеркнутые и выделенные курсивом аминокислоты отщепляются от зрелого белка во время получения.

**Таблица 4: Иллюстративные белки-носители**

Белок	Аминокислотная последовательность	SEQ ID:
ADI [полной длины] WT с лидером	<u>MHHHHHHGSGENLYFQGTAQTP</u> IHVYSEIG <u>K</u> LKKVLLHHRPG KEIENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYL ETLAAESLVTPEIREAFIDEYLSANIRGRATKKAIRELLMAIEDN QELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPNLYF TRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYG <u>KY</u> IFTHHPYGGGKVP VYDRNETTRIEGGDELVLVKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNI FKQ NLGFKKVLAFEFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVY SVTYDNEELHIVEE <u>K</u> GDLAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGR EQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELV RGRGGPRCMSMPFEREDI	13
ADI [полной длины] D277A с лидером	<u>MHHHHHHGSGENLYFQGTAQTP</u> IHVYSEIG <u>K</u> LKKVLLHHRPG KEIENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYL ETLAAESLVTPEIREAFIDEYLSANIRGRATKKAIRELLMAIEDN QELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPNLYF TRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYG <u>KY</u> IFTHHPYGGGKVP VYDRNETTRIEGGDELVLVKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNI FKQ NLGFKKVLAFEFANNRKFMHLA TVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVY SVTYDNEELHIVEE <u>K</u> GDLAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGR EQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELV RGRGGPRCMSMPFEREDI	15
SpyAD [фрагмент 33-849] WT с лидером	<u>MHHHHHHGSGENLYFQGQVK</u> ADDRASGETKASNTHDDSLPK PETIQEA <u>K</u> ATIDAVEKTLSSQQAELTELATALTKTAEINHLKEQQ DNEQKALTSAQEIYTNLASSSEETLLAQGAEHQRELTATETELHNA QADQHSKETALSEQKASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLNAMI SNPDAITKAAQTANDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEEL AAQKAALAEKEAELSRKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELK <u>K</u> LEASGYIGSASYNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADRNR FVDPDNLTPEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFAR LLSTSYK <u>K</u> THGNTRPSFVYGGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASG LIRNDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTY GHAINFLRVDKHNPAPVYLGFEVSTSNVGLSNEHFVMFPESNIHQ RFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTIAAIKGVSSLENRLSAIHQ EADIMAAQAKVSQLQGKLASTLQSDSLNLQVRQLNDTKGSLRTEL LAAKAKQAQLEATRQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAAARVTALV AK <u>K</u> AHLQYLRDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTTSSLLNAQEA LAAALQAKQSSLEATIATTEHQLTLLKTLANEKEYRHLDEDIATVPD LQVAPPLTGKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETKQLLEASARLAAENT SLVAEALVGQTSSEMVASNAIVSKITSSITQPSSKTSYSGSSTTSN	9

Белок	Аминокислотная последовательность	SEQ ID:
	LI SDVDESTQR	
hFL [полной длины] WT с лидером	<u>MHHHHHHS</u> GS SQ I RQ NYST DVEAAVNSLVNLYLQASYTYL SLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRAL FQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDP HLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERL TLKHD	21
eCRM-pAMF6 мутант	MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQXGIQKPKS GTQGNYYYYDWEKFEYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKTYP GLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGAS RVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAM YEYMAQACAGNRVRNSVGSLSLSCINLDWDVIRDXTKTKIESLKEHG PIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPELSELXTVTGTN PVFAGANYAAAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGI ADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVE SIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPFLHDGYAVSWNTVEDSII RT GFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNG RKIRMRCAIDGDVTFPCRPKSPVYVGNVHANLHVAFHRSSEKIH SNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSXLSLFFFEIKS	25

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SpyAD и содержит четыре nnAA, замененные в положениях K64, K287, K396 и K657 SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SpyAD и содержит четыре nnAA, замененные в положениях K64, K287, K396 и K657 SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления каждая из четырех nnAA представляет собой pAMF. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SpyAD и содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления каждая из четырех nnAA представляет собой pAMF. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SpyAD и содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SpyAD и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SpyAD и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой ADI и содержит три nnAA, замененные в положениях K15, K193 и K316 SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет

собой ADI и содержит три nnAA, замененные в положениях K15, K193 и K316 SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления каждая из трех nnAA представляет собой pAMF. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой ADI и содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления каждая из трех nnAA представляет собой pAMF. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SpyAD и содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 26, 27, 37 или 38. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой ADI и содержит или состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой ADI и содержит или состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 26, 27, 37, 38.

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой полипептид SLO. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SLO( $\Delta$ C101) и содержит три или четыре nnAA, замененные в положениях, выбранных из K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375, K407 и K464 SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SLO( $\Delta$ C101) и содержит или состоит из nnAA, замененных в положениях K98, R151, K272 и K357; положениях K112, K189, K323 и K375; положениях R151, K272, K357 и K407; положениях R151, K272, K375 и K464; положениях K112, K272, K357 и K464; положениях K98, K189 и K357; положениях K112, K189 и K323; положениях K98, R151 и K272; положениях K112, K272 и K375; или положениях K112, K323 и K407. В некоторых вариантах осуществления каждая из трех или четырех nnAA представляет собой pAMF. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой полипептид SLO и содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой полипептид SLO и содержит или состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой полипептид SLO. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SLO( $\Delta$ C101) и содержит пять, шесть, семь или восемь nnAA, замененных в положениях, выбранных из K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375, K407 и K464 последовательности SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой SLO( $\Delta$ C101) и содержит или состоит из nnAA, замененных в положениях K98, R151, K272, K357 и K407; положениях K112, K189, K323, K375 и K464; положениях K112, P151, K272, K357, K407; положениях K98, P151, K272, K357, K407, K464; положениях K112, P151, K189, K323, K375, K464; положениях K98, K112, K189, K323, K375 и K464; положениях K112, P151, K189, K272, K357, K407, K464; положениях K98, P151, K189, K323, K375, K407, K464; положениях K112, K189, K272, K357, K375, K407, K464; положениях K98, K112, P151, K189, K272, K323, K357, K375; положениях K98, P151, K189, K272, K323, K357, K407, K464; или положениях K112, K189, K272, K323, K357, K375, K407 и K464. В некоторых вариантах осуществления пять, шесть, семь или восемь nnAA, каждая, представляют собой pAMF. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой полипептид SLO и содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 или 76. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой полипептид SLO и содержит или состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 или 76.

В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой ферритин и содержит одну nnAA, замененную в положении I5 SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления nnAA представляет собой pAMF. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой ферритин и содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата представляет собой ADI и содержит или состоит из SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24.

*Полисахариды*

В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата представляет собой полисахарид GAS, такой как углевод группы А (GAC). GAC состоит из полираманозного остова с иммунодоминантной боковой цепью GlcNAc и присутствует на поверхности штаммов всех серотипов GAS, независимо от типа M, и был исследован в качестве кандидата на вакцину против GAS. Полисахарид конъюгата можно определить как полисахаридный компонент конъюгата. Аффинно-очищенные антитела против GAC успешно опсонизировали три протестированных серотипа GAS (Salvadori et al., 1995. J. Infect. Dis. 171:593–600.), а мыши, иммунизированные GAC, были защищены как от внутрибрюшинного, так и интраназального заражения GAS (Sabharwal et al., 2006. J. Infect. Dis. 193:129–135). Однако иммунологическая перекрестная реактивность между анти-GAC антителами и белками клапана сердца хозяина (Goldstein et al., 1967. Nature 213:44–47) и белками цитоскелета, такими как актин, кератин, миозин и виментин, вызывает беспокойство относительно важной потенциальной безопасности использования GAC в качестве компонента вакцины GAS.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка *Streptococcus pyogenes* может быть сконструирована таким образом, чтобы продуцировать полисахарид или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата представляет собой вариант GAC, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь GlcNAc (см., например, публикацию международной заявки PCT № WO 2013/020090, патент США 10780155, и Gao, N. J. et al., December 29, 2020. Infectious Microbes and Diseases, doi: 10.1097/IM9.0000000000000044). В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата представляет собой GAC, содержащий полираманозное ядро. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 3 кДа до примерно 10 кДа, от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа, от примерно 9 кДа до примерно 10 кДа, от примерно 9 кДа до примерно 10 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 9 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 7 кДа, примерно от 3 кДа до примерно 5 кДа, от примерно 5 кДа до примерно 9 кДа или от примерно 5 кДа до примерно 7 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу примерно 3 кДа, 4 кДа, 5 кДа, 6 кДа, 7 кДа, 8 кДа, 9 кДа или примерно 10 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид

конъюгата представляет собой тетрамер, пентамер, гексамер, септамер, октамер, нономер или декамер полисахарида.

В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 10 кДа до примерно 45 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 10 кДа до примерно 15 кДа, от примерно 15 кДа до примерно 20 кДа, от примерно 20 кДа до примерно 25 кДа, от примерно 25 кДа до примерно 30 кДа, от примерно 30 кДа до примерно 35 кДа или от примерно 35 кДа до примерно 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 15 кДа до примерно 40 кДа, от примерно 15 кДа до примерно 35 кДа, от примерно 15 кДа до примерно 30 кДа, от примерно 15 кДа до примерно 25 кДа или от примерно 15 кДа до около 45 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 20 кДа до примерно 40 кДа, от примерно 20 кДа до примерно 35 кДа, от примерно 20 кДа до примерно 30 кДа или от примерно 20 кДа до примерно 45 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу примерно 10 кДа, 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа, 35 кДа, 40 кДа или примерно 45 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу по меньшей мере примерно 10 кДа, 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа или примерно 35 кДа.

В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата очищают из бактериальных культур GAS или исходных бактериальных штаммов. Способы такой очистки известны в данной области, *см., например*, WO 2010/049806, международную публикацию PCT WO 2013/020090 и van Sorge, *et al.*, *Cell Host Microbe.*, 2014, 15(6), 729-740. *См. также* пример 1. В некоторых вариантах осуществления полисахарид конъюгата представляет собой синтезированный полисахарид. Способы синтеза полисахаридов известны в данной области, *см., например*, Zhao, *et al.*, *Org. Chem. Front.*, 2019, 6, 3589-3596. *См. также* пример 3. В некоторых вариантах осуществления полисахариды конъюгата модифицированы реакционноспособной группой, подходящей для клик-химии, для содействия конъюгации с белком конъюгата. Примеры реакционноспособных групп, подходящих для клик-химии, можно найти, например, в международной публикации PCT WO 2018/126229, полностью включенной в настоящее описание посредством ссылки. Например, в некоторых вариантах осуществления полисахариды конъюгата модифицированы DBCO или



осуществления конъюгат полипептид-полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от примерно 1000 кДа до примерно 3000 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгат полипептид-полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от примерно 1000 кДа до примерно 2000 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгат полипептид-полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от примерно 2000 кДа до примерно 3000 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгат полипептид-полисахарид имеет среднюю молекулярную массу около 5000 кДа или более.

### ***Иллюстративные комбинированные вакцины***

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу GAS; полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 и содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: NO: 33 и содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу GAS; полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген SLO



47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53 .

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу GAS; полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген C5a пептидаза содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53; и белок SpyAD конъюгата содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33 и содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления полипептидный антиген C5a пептидаза содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53; и белок SpyAD конъюгата содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33 и содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657. В некоторых вариантах осуществления белок SpyAD содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящее

изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 52; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO SEQ ID NO: 32; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 29; полипептидный антиген с последовательностью SLO SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, и

полисахарид GAS конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29; полипептидный антиген SLO, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей полипептидный антиген C5a пептидазу; полипептидный антиген SLO GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид ADI конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 13-16 и содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 17-20. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 35-36 и содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит или состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 37-38. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит или состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 17-20. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 35-36 и содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316. В некоторых вариантах осуществления полипептид ADI содержит или состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 37-38.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую полипептидный антиген C5a пептидазу; полипептидный антиген SLO GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид ферритина и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором

отсутствует иммунодоминантная боковая цепь GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления полипептид ферритина содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22 и содержит замену на рAMF в положении I5. В некоторых вариантах осуществления полипептид ферритина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления полипептид ферритина содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24.

### *Терапевтические способы*

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии GAS у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предлагается применение иммуногенных композиций, описанных в настоящем документе, для индукции защитного иммунного ответа против бактерии GAS у субъекта. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагается применение иммуногенных композиций, описанных в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии GAS у субъекта.

В настоящем документе термин «субъект» относится к млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления субъектом является мышь, крыса, собака, морская свинка, овца, примат, не являющийся человеком, или человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления возраст субъектов-людей составляет 18 лет или старше. В некоторых вариантах осуществления субъекты-люди моложе 18 лет.

В некоторых вариантах осуществления субъекты-люди находятся в возрасте от 6 месяцев до 17 лет. В некоторых вариантах осуществления субъекты-люди находятся в возрасте от 6 месяцев до 9 лет, от 6 месяцев до 8 лет, от 6 месяцев до 7 лет, от 6 месяцев до 6 лет, от 6 месяцев до 5 лет, от 6 месяцев до 4 лет, от 6 месяцев до 3 лет, от 6 месяцев до 2 лет или от 6 месяцев возраста до 1 года. В некоторых вариантах осуществления субъекты-люди находятся в возрасте от 5 лет до 17 лет, от 7 лет до 17 лет, от 9 лет до 17 лет, от 11 лет до 17 лет, от 13 лет до 17 лет или от 15 лет до 17 лет. В некоторых вариантах осуществления субъекты-люди находятся в возрасте 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет, 11 лет, 12 лет, 13 лет, 14 лет, 15 лет, 16 лет, 17 лет или 18 лет.

В настоящем документе термин «защитный иммунный ответ» включает вызывание выработки антител к GAS у субъекта. Титры антител, генерированных после введения описанных в настоящем документе иммуногенных композиций, могут быть определены с помощью способов, известных в данной области, например, с помощью ELISA-анализов образцов сыворотки, полученных от иммунизированных субъектов (см. пример 6). В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с множеством (*m.e.* двумя или более) серотипов GAS. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или более серотипами GAS. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, не вызывают выработку антител против белков или тканей человека.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются по меньшей мере с одним серотипом GAS, выбранным из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M18, M22, M25, M28, M62, M71, M72, M74, M75, M77, M80, M81, M83, M87, M89 и M92. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с двумя или более серотипами GAS, выбранными из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M18, M22, M25, M28, M62, M71, M72, M74, M75, M77, M80, M81, M83, M87, M89 и M92.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются по меньшей мере с одним серотипом GAS, выбранным из M1, M2, M3, M4, M6, M11, M12, M22, M28, M75 и M89. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с двумя или более

серотипами GAS, выбранными из M1, M2, M3, M4, M6, M11, M12, M22, M28, M75 и M89.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются по меньшей мере с одним серотипом GAS, выбранным из M1, M3, M5, M9, M12, M18, M22, M25, M28, M71, M72 и M74. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с двумя или более серотипами GAS, выбранными из M1, M3, M5, M9, M12, M18, M22, M25, M28, M71, M72 и M74.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются по меньшей мере с одним серотипом GAS, выбранным из M1, M4, M6, M11, M12, M22, M44, M75, M77, M77 и M81. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с двумя или более серотипами GAS, выбранными из M1, M4, M6, M11, M12, M22, M44, M75, M77, M77 и M81.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются по меньшей мере с одним серотипом GAS, выбранным из M1, M2, M3, M4, M6, M9, M12, M18, M22, M75, M77, M89 и M92. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с двумя или более серотипами GAS, выбранными из M1, M2, M3, M4, M6, M9, M12, M18, M22, M75, M77, M89 и M92.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются по меньшей мере с одним серотипом GAS, выбранным из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M28, M62 и M89. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции,

описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с двумя или более серотипами GAS, выбранными из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M28, M62 и M89.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются по меньшей мере с одним серотипом GAS, выбранным из M1, M2, M3, M4, M6, M12, M22, M28, M49, M53, M68, M77, M80, M83, M87, M89 и M92. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, при этом генерированные антитела связываются с двумя или более серотипами GAS, выбранными из M1, M2, M3, M4, M6, M12, M22, M28, M49, M53, M68, M77, M80, M83, M87, M89 и M92.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, которые связываются с одним или несколькими серотипами *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, вызывают выработку антител у подвергнутых лечению субъектов, которые связываются с одним или несколькими серотипами GAS, а также связываются с одним или несколькими серотипами *Shigella*. В некоторых вариантах осуществления серотипы *Shigella* содержат полисахарид, содержащий полираманозный остов. Примеры серотипов *Shigella*, содержащих такие полисахариды, включают *S. flexneri*, такие как *S. flexneri* 2A и 3A, и *S. flexneri* 6.

#### **Дополнительные пронумерованные варианты осуществления**

Дополнительные варианты осуществления настоящего раскрытия представлены в пронумерованных ниже вариантах осуществления:

Вариант осуществления 1: Иммуногенная композиция, содержащая первый полипептидный антиген стрептококка группы А (GAS); второй полипептидный антиген GAS; и по меньшей мере один конъюгат полипептид-полисахарид, где полипептид конъюгата представляет собой третий полипептидный антиген GAS или не несущий GAS полипептид, и содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, и где полисахарид конъюгата представляет собой полисахарид GAS или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления 2: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 1, где по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой полноразмерный антиген GAS.

Вариант осуществления 3: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 1, где по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой пептидный фрагмент полноразмерного антигена GAS.

Вариант осуществления 4: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-3, где первый и второй полипептидные антигены GAS независимо выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина O (SLO), Sib35 и Sfb1.

Вариант осуществления 5: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-3, где первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO.

Вариант осуществления 6: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 5, где полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 7: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 5, где полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 8: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 5, где полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 9: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 5, где полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 10: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-9, где не несущий GAS полипептид представляет собой ферритин.

Вариант осуществления 11: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-10, где третий полипептидный антиген GAS выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдезимины (ADI), eCRM и белка D.

Вариант осуществления 12: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-11, где по меньшей мере одна ппАА заменяет лизин, лейцин или изолейцин в полипептиде конъюгата.

Вариант осуществления 13: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-11, где ппАА содержит реакционноспособную группу, подходящую для клик-химии.

Вариант осуществления 14: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 13, где ппАА выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (рАФ), 2-амино-4-азидобутановой кислоты, 2-азидо-3-фенилпропионовой кислоты, 2-амино-3-азидопропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (рАМФ), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты и 2-амино-5-азидопентановой кислоты.

Вариант осуществления 15: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 13, где ппАА представляет собой рАМФ.

Вариант осуществления 16: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 12-15, где полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 17: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 16, где полипептид SpyAD содержит замену на рАМФ в положениях K64, K287, K386 и K657 в SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 18: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 17, где полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления 19: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 12-15, где полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 20: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 19, где полипептид ADI содержит замену на рАМФ в положениях K15, K193 и K316 в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 21: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 20, где полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 22: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 12-15, где полипептид конъюгата представляет собой полипептид ферритин и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 23: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 22, где полипептид ферритин содержит замену на рAMF в положении I5 в SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 24: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 23, где полипептид ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления 25: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-23, где полисахарид конъюгата содержит полирамнозное ядро.

Вариант осуществления 26: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-23, где полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от около 5 кДа до около 7 кДа.

Вариант осуществления 27: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-26, где полисахарид конъюгата представляет собой тетрамерный, гексамерный, октамерный или декамерный полисахарид.

Вариант осуществления 28: Иммуногенная композиция, содержащая полипептидный антиген С5а пептидазу стрептококка группы А (GAS); полипептидный антиген стрептолизин О (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид Streptococcus pyogenes Adhesion and Division (SpyAD) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления 29: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 28, где белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9, и содержит замену на рAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления 30: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 28, где белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления 31: Иммуногенная композиция, содержащая полипептидный антиген С5а пептидазу стрептококка группы А (GAS); полипептидный антиген стрептолизин О (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид аргининдезимиразу (ADI) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления 32: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 31, где полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15, и содержит замену на рAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления 33: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 31, где полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 34: Иммуногенная композиция, содержащая полипептидный антиген С5а пептидазу стрептококка группы А (GAS); полипептидный антиген стрептолизин О (SLO) GAS; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид ферритин и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления 35: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 34, где белок ферритин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21, и содержит замену на рAMF в положении I5.

Вариант осуществления 35А: Иммуногенная композиция по варианту осуществления 34, где белок ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления 36: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-35, где композиция содержит от примерно 10% до примерно 50% первого антигена GAS, от примерно 10% до примерно 50% второго антигена GAS и от примерно 10% до примерно 50% конъюгата полипептид-полисахарид.

Вариант осуществления 37: Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 1-36, дополнительно содержащая один или несколько адъювантов, выбранных из квасцов, сапонины, монофосфориллипида А (MPL) или их комбинаций.

Вариант осуществления 38: Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии стрептококка группы А (GAS) у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-37.

Вариант осуществления 38А: Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-37 для индукции защитного иммунного ответа против бактерии стрептококка группы А (GAS) у субъекта.

Вариант осуществления 38В: Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-37 в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии стрептококка группы А (GAS) у субъекта.

Вариант осуществления 39: Способ по любому из вариантов осуществления 38-38В, в котором возраст субъекта составляет 18 лет или больше.

Вариант осуществления 40: Способ по любому из вариантов осуществления 38-38В, в котором возраст субъекта составляет меньше 18 лет.

Вариант осуществления 41: Способ по любому из вариантов осуществления 38-38В, в котором возраст субъекта составляет от 5 до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

Вариант осуществления 42: Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M11, M12, M22, M28, M75 и M89.

Вариант осуществления 43: Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M3, M5, M9, M12, M18, M22, M25, M28, M71, M72 и M74.

Вариант осуществления 44: Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M4, M6, M11, M12, M22, M44, M75, M77, M77 и M81.

Вариант осуществления 45: Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M9, M12, M18, M22, M75, M77, M89 и M92.

Вариант осуществления 46: Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M28, M62 и M89.

Вариант осуществления 47: Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M12, M22, M28, M49, M53, M68, M77, M80, M83, M87, M89 и M92.

Вариант осуществления 48: Способ по любому из вариантов осуществления 38-47, где иммуногенная композиция индуцирует у субъекта выработку антител против бактерии стрептококка группы А (GAS) и не индуцирует выработку антител у субъекта против человеческой ткани.

Вариант осуществления 49: Способ по любому из вариантов осуществления 38-48, где иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ против бактерии *Shigella* у субъекта, при этом бактерия *Shigella* содержит полисахарид с полириманозным остовом.

Вариант осуществления 50: Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-37.

Вариант осуществления 51: Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-37 для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта.

Вариант осуществления 52: Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-37 в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта.

Вариант осуществления 53: Способ или применение по любому из вариантов осуществления 50-52, где возраст субъекта составляет 18 лет или больше.

Вариант осуществления 54: Способ или применение по варианту осуществления 53, где возраст субъекта составляет меньше 18 лет.

Вариант осуществления 55: Способ или применение по варианту осуществления 54, где возраст субъекта составляет от 5 до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

Вариант осуществления II-1. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. первый полипептидный антиген стрептококка группы А (GAS);
- b. второй полипептидный антиген GAS; и
- c. по меньшей мере один конъюгат полипептид-полисахарид, где полипептид конъюгата представляет собой третий полипептидный антиген GAS или не несущий GAS полипептид, и содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, и где полисахарид конъюгата представляет собой полисахарид GAS или

его вариант, у которого отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления II-2. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-1, в которой по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой полноразмерный антиген GAS.

Вариант осуществления II-3. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-1, в которой по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой пептидный фрагмент полноразмерного антигена GAS.

Вариант осуществления II-4. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS независимо выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина O (SLO), Sib35 и Sfb1.

Вариант осуществления II-5. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO.

Вариант осуществления II-6. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-5, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления II-7. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-5, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления II-8. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-6, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления II-9. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-5, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления II-10. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-6 или II-9, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и

полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления II-11. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-5, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления II-12. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-6, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления II-13. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-12, в которой не несущий GAS полипептид представляет собой ферритин.

Вариант осуществления II-14. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-13, в которой третий полипептидный антиген GAS выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдезимины (ADI), eCRM и белка D.

Вариант осуществления II-15. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-14, в которой по меньшей мере одна ппАА заменяет лизин, лейцин или изолейцин в полипептиде конъюгата.

Вариант осуществления II-16. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-14, в которой ппАА содержит реакционноспособную группу, подходящую для клик-химии.

Вариант осуществления II-17. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-16, в которой ппАА выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-4-азидобутановой кислоты, 2-азидо-3-фенилпропионовой кислоты, 2-амино-3-азидопропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты и 2-амино-5-азидопентановой кислоты.

Вариант осуществления II-18. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-16, в которой nпАА представляет собой рАМФ.

Вариант осуществления II-19. Иммуногенная композиция по любому из пп. II-15 - II-18, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления II-20. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-19, в которой полипептид SpyAD содержит замену на рАМФ в положениях K64, K287, K386 и K657 в SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления II-21. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-20, в которой полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления II-22. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-15 - II-18, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления II-23. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-22, в которой полипептид SpyAD содержит замену на рАМФ в положениях K64, K287, K386 и K657 SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления II-24. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-23, в которой полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления II-25. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-15 - II-18, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления II-26. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-25, в которой полипептид ADI содержит замену на рАМФ в положениях K15, K193 и K316 в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления II-27. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-26, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления П-28. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления П-15 - П-18, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

Вариант осуществления П-29. Иммуногенная композиция по варианту осуществления П-28, в которой полипептид ADI содержит замену на рAMF в положениях K15, K193 и K316 в SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

Вариант осуществления П-30. Иммуногенная композиция по варианту осуществления П-29, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления П-31. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления П-15 - П-18, в которой полипептид конъюгата представляет собой полипептид ферритин и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления П-32. Иммуногенная композиция по варианту осуществления П-31, в которой полипептид ферритин содержит замену на рAMF в положении I5 в SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления П-33. Иммуногенная композиция по варианту осуществления П-32, в которой полипептид ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления П-34. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления П-1 - П-33, в которой полисахарид конъюгата содержит полирамнозное ядро.

Вариант осуществления П-35. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления П-1 - П-33, в которой полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 7 кДа.

Вариант осуществления П-36. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления П-1 - П-35, в которой полисахарид конъюгата представляет собой тетрамерный, гексамерный, октамерный или декамерный полисахарид.

Вариант осуществления П-37. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген С5а пептидазу стрептококка группы А (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин О (SLO) GAS; и

с. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид Streptococcus pyogenes Adhesion and Division (SpyAD) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления II-38. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-37, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9, и содержит замену на rAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления II-39. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-37, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления II-40. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-37, где белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33, и содержит замену на rAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления II-41. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-37, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления II-42. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-41, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления II-43. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-1 или II-37, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления II-44. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-1 или II-37, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 52; и конъюгат полипептид-полисахарид,

содержащий полипептидный конъюгат SpyAD с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления II-45. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-1 или II-37, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 32; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления II-46. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-1 или II-37, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 29; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления II-47. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид аргининдезимиразу (ADI) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления II-48. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-47, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15, и содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления II-49. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-47, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления II-50. Иммуногенная композиция по вариантами осуществления II-47 - II-48, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36, и содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления II-51. Иммуногенная композиция по вариантам осуществления II-47 - II-48, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления II-52. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид ферритин и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления II-53. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-52, в которой белок ферритин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21, и содержит замену на rAMF в положении I5.

Вариант осуществления II-54. Иммуногенная композиция по варианту осуществления II-52, в которой белок ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления II-55. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-54, отличающаяся тем, что композиция содержит от примерно 10% до примерно 50% первого антигена GAS, от примерно 10% до примерно 50% второго антигена GAS и от примерно 10% до примерно 50% конъюгата полипептид-полисахарид.

Вариант осуществления II-56. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления II-1 - II-55, дополнительно содержащая один или несколько адъювантов, выбранных из квасцов, сапонины, монофосфориллипида A (MPL) или их комбинаций.

Вариант осуществления II-57. Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии стрептококка группы A (GAS) у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления II-1 - II-56.

Вариант осуществления II-58. Способ по варианту осуществления II-57, где возраст субъекта составляет 18 лет или больше.

Вариант осуществления II-59. Способ по варианту осуществления II-57, где возраст субъекта составляет меньше 18 лет.

Вариант осуществления II-60. Способ по варианту осуществления II-57, где возраст субъекта составляет от 5 лет до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

Вариант осуществления II-61. Способ по любому из вариантов осуществления II-57 - II-60, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M11, M12, M22, M28, M75 и M89.

Вариант осуществления II-62. Способ по любому из вариантов осуществления II-57 - II-60, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M3, M5, M9, M12, M18, M22, M25, M28, M71, M72 и M74.

Вариант осуществления II-63. Способ по любому из вариантов осуществления II-57 - II-60, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M4, M6, M11, M12, M22, M44, M75, M77, M77 и M81.

Вариант осуществления II-64. Способ по любому из вариантов осуществления II-57 - II-60, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M9, M12, M18, M22, M75, M77, M89 и M92.

Вариант осуществления II-65. Способ по любому из вариантов осуществления II-57 - II-60, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M28, M62 и M89.

Вариант осуществления II-66. Способ по любому из вариантов осуществления II-57 - II-60, где бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M12, M22, M28, M49, M53, M68, M77, M80, M83, M87, M89 и M92.

Вариант осуществления II-67. Способ по любому из вариантов осуществления II-57 - II-66, в котором иммуногенная композиция индуцирует выработку антител у субъекта против бактерии стрептококка группы А (GAS) и не индуцирует выработку антител у субъекта против человеческой ткани.

Вариант осуществления II-68. Способ по любому из вариантов осуществления II-57 - II-67, в котором иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ против бактерии Shigella у субъекта, при этом бактерия Shigella содержит полисахарид с полириманозным остовом.

Вариант осуществления II-69. Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии Shigella у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления II-1 - II-56.

Вариант осуществления II-70. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления II-1 - II-56 для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта.

Вариант осуществления II-71. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления II-1 - II-56 в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта.

Вариант осуществления II-72. Способ или применение по любому из вариантов осуществления II-69 - II-71, где возраст субъекта составляет 18 лет или больше.

Вариант осуществления II-73. Способ или применение по варианту осуществления II-72, где возраст субъекта составляет меньше 18 лет.

Вариант осуществления II-74. Способ или применение по варианту осуществления II-73, где возраст субъекта составляет от 5 лет до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

Вариант осуществления III-1. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. первый полипептидный антиген стрептококка группы А (GAS);
- b. второй полипептидный антиген GAS; и
- c. по меньшей мере один конъюгат полипептид-полисахарид, где полипептид конъюгата представляет собой третий полипептидный антиген GAS или не несущий GAS полипептид, и содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, и где полисахарид конъюгата представляет собой полисахарид GAS или его вариант, у которого отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления III-2. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-1, в которой по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой полноразмерный антиген GAS.

Вариант осуществления III-3. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-1, в которой по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой пептидный фрагмент полноразмерного антигена GAS.

Вариант осуществления III-4. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS независимо выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина O (SLO), Sib35, Sfb1 и SpyAD.

Вариант осуществления III-5. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS независимо выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина O (SLO), Sib35 и Sfb1.

Вариант осуществления III-6. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO.

Вариант осуществления III-7. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-6, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления III-7A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-6, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления III-8. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-6, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления III-9. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-6, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления III-9A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-6, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген C5a пептидаза состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления III-10. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-6, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления III-10A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-6, в которой полипептидный антиген SLO по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления III-11. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-7 или III-10, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления III-11A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-17, III-10, III-7A или III-10A, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления III-12. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-6, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления III-12A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-6, в которой полипептидный антиген SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления III-13. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-7, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления III-13A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-7 или III-7A, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления III-14. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SpyAD.

Вариант III-15. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-14, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления III-15A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-14, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления III-16. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-14, где полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления III-16A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-14, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления III-17. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-16, в которой не несущий GAS полипептид представляет собой ферритин.

Вариант осуществления III-18. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-16, в которой третий полипептидный антиген GAS выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдеиминазы (ADI), eCRM и белка D.

Вариант осуществления III-19. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-16, в которой третий полипептидный антиген GAS выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдезиминазы (ADI), eCRM, белка D и SLO.

Вариант осуществления III-20. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-19, в которой по меньшей мере одна nnAA заменяет лизин, лейцин или изолейцин в конъюгированном полипептиде.

Вариант осуществления III-21. Иммуногенная композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления III-1 - III-19, в которой nnAA содержит реакционноспособную группу, подходящую для клик-химии.

Вариант осуществления III-22. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-16, в которой nnAA выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-4-азидобутановой кислоты, 2-азидо-3-фенилпропионовой кислоты, 2-амино-3-азидопропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты и 2-амино-5-азидопентановой кислоты.

Вариант осуществления III-23. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-21, где nnAA представляет собой pAMF.

Вариант осуществления III-24. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления III-24A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD, который по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления III-25. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-24, в которой полипептид SpyAD содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657 в SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления III-26. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-25, в которой полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления III-26A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-25, в которой полипептид SpyAD содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления III-27. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления III-27A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления III-28. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-27, в которой полипептид SpyAD содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657 SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления III-29. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-28, в которой полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления III-30. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13. или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления III-30A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления III-31. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-30, в которой полипептид ADI содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316 SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления III-32. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-31, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления III-32A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-31, в которой полипептид ADI состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления III-33. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

Вариант осуществления III-33A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

Вариант осуществления III-34. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-33, в которой полипептид ADI содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316 в SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

Вариант осуществления III-35. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-34, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления III-35A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-34, в которой полипептид ADI состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления III-36. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид SLO и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления III-36A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид SLO и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления III-37. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-36, в которой полипептид SLO содержит 3 или 4 замены на pAMF в положениях, выбранных из K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375, K407 или K464.

Вариант осуществления III-38. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-36 или III-37, в которой полипептид SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64.

Вариант осуществления III-38A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-36 или III-37, в которой полипептид SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64.

Вариант осуществления III-39. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой полипептид ферритин и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления III-39A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-20 - III-23, в которой полипептид конъюгата представляет собой полипептид ферритин и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления III-40. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-39, в которой полипептид ферритин содержит замену на pAMF в положении I5 в SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления III-41. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-40, в которой полипептид ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления III-41A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-40, в которой полипептид ферритин состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления III-42. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-41, в которой полисахарид конъюгата содержит полирамнозное ядро.

Вариант осуществления III-43. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-41, в которой полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 7 кДа.

Вариант осуществления III-44. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-43, в которой полисахарид конъюгата представляет собой тетрамерный, гексамерный, октамерный или декамерный полисахарид.

Вариант осуществления III-45. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и

с. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления III-46. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-45, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9, и содержит замену на rAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления III-46A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-45, в которой белок SpyAD по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 9 и содержит замену на rAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления III-47. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-45, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления III-47A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-45, в которой белок SpyAD состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления III-48. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-45, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 33, и содержит замену на rAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления III-48A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-45, в которой белок SpyAD по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 33 и содержит замену на rAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления III-49. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-45, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления III-49A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-45, в которой белок SpyAD состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления III-50. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-49, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44,

SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления III-50А. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-49 или III-49А, в которой полипептидный антиген SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления III-51. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-1 или III-45, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления III-52. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-1 или III-45, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 52; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34, и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления III-53. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-1 или III-45, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 32; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления III-54. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-1 или III-45, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 29; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления III-55. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы А (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин О (SLO) GAS; и

с. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид аргининдезимиразу (ADI) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления III-56. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-55, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15, и содержит замену на рAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления III-56A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-55, в которой полипептид ADI по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15 и содержит замену на рAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления III-57. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-55, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления III-57A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-55, в которой полипептид ADI состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления III-58. Иммуногенная композиция по вариантам осуществления III-55 - III-56, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36, и содержит замену на рAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления III-58A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-55 - III-56 или III-56A, в которой полипептид ADI по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 и содержит замену на рAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления III-59. Иммуногенная композиция по вариантам осуществления III-55 - III-56, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления III-59A. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-55 - III-56 или III-56A, в которой полипептид ADI состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления III-60. Иммуногенная композиция, содержащая

а. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);

- b. полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид ферритин и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления III-61. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-60, в которой белок ферритин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21 и содержит замену на rAMF в положении I5.

Вариант осуществления III-61A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-60, в которой белок ферритин является по меньшей мере на 95% идентичным SEQ ID NO: 21 и содержит замену на rAMF в положении I5.

Вариант осуществления III-62. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-60, в которой белок ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления III-62A. Иммуногенная композиция по варианту осуществления III-60, в которой белок ферритин состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления III-63. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-62, отличающаяся тем, что композиция содержит от примерно 10% до примерно 50% первого антигена GAS, от примерно 10% до примерно 50% второго антигена GAS и от примерно 10% до примерно 50% конъюгата полипептид-полисахарид.

Вариант осуществления III-64. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления III-1 - III-63, дополнительно содержащая один или несколько адъювантов, выбранных из квасцов, сапонины, монофосфориллипида A (MPL) или их комбинаций.

Вариант осуществления III-65. Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии стрептококка группы A (GAS) у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления III-1-56.

Вариант осуществления III-66. Способ по варианту осуществления III-65, в котором возраст субъекта составляет 18 лет или больше.

Вариант осуществления III-67. Способ по варианту осуществления III-65, в котором возраст субъекта составляет меньше 18 лет.

Вариант осуществления III-68. Способ по варианту осуществления III-65, в котором возраст субъекта составляет от 5 до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

Вариант осуществления III-69. Способ по любому из вариантов осуществления III-65 - III-68, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M11, M12, M22, M28, M75 и M89.

Вариант осуществления III-70. Способ по любому из вариантов осуществления III-65 - III-68, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M3, M5, M9, M12, M18, M22, M25, M28, M71, M72 и M74.

Вариант осуществления III-71. Способ по любому из вариантов осуществления III-65 - III-68, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M4, M6, M11, M12, M22, M44, M75, M77, M77 и M81.

Вариант осуществления III-72. Способ по любому из вариантов осуществления III-65 - III-68, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M9, M12, M18, M22, M75, M77, M89 и M92.

Вариант осуществления III-73. Способ по любому из вариантов осуществления III-65 - III-68, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M28, M62 и M89.

Вариант осуществления III-74. Способ по любому из вариантов осуществления III-65 - III-68, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M12, M22, M28, M49, M53, M68, M77, M80, M83, M87, M89 и M92.

Вариант осуществления III-75. Способ по любому из вариантов осуществления III-65 - III-74, в котором иммуногенная композиция индуцирует у субъекта выработку антител против бактерии стрептококка группы А (GAS) и не индуцирует выработку антител у субъекта против человеческой ткани.

Вариант осуществления III-76. Способ по любому из вариантов осуществления III-65 - III-75, в котором иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ против бактерии Shigella у субъекта, при этом бактерия Shigella содержит полисахарид с полириманозным остовом.

Вариант осуществления III-77. Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии Shigella у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления III-1-56.

Вариант осуществления III-78. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления III-1 - III-54 для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта.

Вариант осуществления III-79. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления III-1 - III-54 в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта.

Вариант осуществления III-80. Способ или применение по любому из вариантов осуществления III-77 - III-79, где возраст субъекта составляет 18 лет или больше.

Вариант осуществления III-81. Способ или применение по варианту осуществления III-80, где возраст субъекта составляет меньше 18 лет.

Вариант осуществления III-82. Способ или применение по варианту осуществления III-81, где возраст субъекта составляет от 5 лет до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

Вариант осуществления IV-1. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. первый полипептидный антиген стрептококка группы А (GAS);
- b. второй полипептидный антиген GAS; и
- c. по меньшей мере один конъюгат полипептид-полисахарид, в котором полипептид конъюгата представляет собой третий полипептидный антиген GAS или не несущий GAS полипептид, и содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, и в котором полисахарид конъюгата представляет собой полисахарид GAS или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления IV-2. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-1, в которой по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой полноразмерный антиген GAS.

Вариант осуществления IV-3. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-1, в которой по меньшей мере один из полипептидных антигенов GAS представляет собой пептидный фрагмент полноразмерного антигена GAS.

Вариант осуществления IV-4. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS независимо выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина О (SLO), Sib35, Sfb1 и SpyAD.

Вариант осуществления IV-5. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS независимо выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина O (SLO), Sib35 и Sfb1.

Вариант осуществления IV-6. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO.

Вариант осуществления IV-7. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-6, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-8. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-5, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-9. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-6, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-10. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-6, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-11. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-6, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген C5a пептидаза состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-12. Иммуногенная композиция по любому из вариантов NO IV-1 - IV-11, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

Вариант осуществления IV-13. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-11, в которой полипептидный антиген SLO по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

Вариант осуществления IV-14. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-9, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления IV-15. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-9, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления IV-16. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-11, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

Вариант осуществления IV-17. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-6, в которой полипептидный антиген SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

Вариант осуществления IV-18. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-9, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления IV-19. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-9, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления IV-20. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-4, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SpyAD.

Вариант осуществления IV-21. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-6, 16-17 или 20, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-22. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-20 или IV-21, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-23. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-6, 16-17 или 20, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-24. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-6, 16-17, 20 или 23, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления IV-25. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-24, в которой не несущий GAS полипептид представляет собой ферритин.

Вариант осуществления IV-26. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-24, в которой третий полипептидный антиген GAS или не-GAS полипептидный антиген выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдезимины (ADI), SEQ ID NO: 25 и белка D.

Вариант осуществления IV-27. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-24, в которой третий полипептидный антиген GAS или не-GAS полипептидный антиген выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдезимины (ADI), SEQ ID NO: 25, белка D и SLO.

Вариант осуществления IV-28. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-27, в которой по меньшей мере одна ппАА заменяет лизин, лейцин, аргинин или изолейцин в конъюгированном полипептиде.

Вариант осуществления IV-29. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-1 - IV-27, в которой ппАА содержит реакционноспособную группу, подходящую для клик-химии.

Вариант осуществления IV-30. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-29, в которой ппАА выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (рАФ), 2-амино-4-азидобутановой кислоты, 2-азидо-3-фенилпропионовой кислоты, 2-амино-3-азидопропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (рАМФ), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты и 2-амино-5-азидопентановой кислоты.

Вариант осуществления IV-31. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-29 или IV-30, где ппАА представляет собой рАМФ.

Вариант осуществления IV-32. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-26 по IV-31, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления IV-33. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-28 по IV-32, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления IV-34. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-26 по IV-33, в которой полипептид SpyAD содержит замену на рАМФ в положениях K64, K287, K386 и K657 в SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления IV-35. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-26 по IV-31 или 34, в которой полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления IV-36. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-34, в которой полипептид SpyAD состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления IV-37. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-26 по IV-31, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

Вариант осуществления IV-38. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-26 по IV-31, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

Вариант осуществления IV-39. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-26 по IV-31 или 37-38, в которой полипептид ADI содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316 в SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

Вариант осуществления IV-40. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-39, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления IV-41. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-26 по IV-31 или 39, в которой полипептид ADI состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления IV-42. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-27 по IV-31, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид SLO и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления IV-43. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-27 по IV-31, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид SLO и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления IV-44. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-42 или IV-43, в которой полипептид SLO содержит 3 или 4 замены на pAMF в положениях, выбранных из K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375, K407 или K464.

Вариант осуществления IV-45. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-44, в которой полипептид SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64.

Вариант осуществления IV-46. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-44, в которой полипептид SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64.

Вариант осуществления IV-47. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-42 или IV-43, в которой полипептид SLO содержит 5, 6, 7 или 8 замен на pAMF в положениях, выбранных из K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375, K407, или K464.

Вариант осуществления IV-48. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-47, в которой полипептид SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76.

Вариант осуществления IV-49. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-47, в которой полипептид SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76.

Вариант осуществления IV-50. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-28 по IV-31, в которой полипептид конъюгата представляет собой полипептид ферритин и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления IV-51. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-28 по IV-31, в которой полипептид конъюгата представляет собой полипептид ферритин и по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления IV-52. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-50 или IV-51, в которой полипептид ферритин содержит замену на pAMF в положении I5 в SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления IV-53. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-52, в которой полипептид ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления IV-54. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-52, в которой полипептид ферритин состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления IV-55. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-54, в которой полисахарид конъюгата не содержит иммунодоминантную боковую цепь GlcNAc.

Вариант осуществления IV-56. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-56, в которой полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 7 кДа.

Вариант осуществления IV-57. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-56, в которой полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 10 кДа до примерно 45 кДа.

Вариант осуществления IV-58. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-55, в которой полисахарид конъюгата представляет собой тетрамерный, гексамерный, октамерный или декамерный полисахарид.

Вариант осуществления IV-59. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген С5а пептидазу стрептококка группы А (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин О (SLO) GAS; и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид

*Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления IV-60. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-59, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33, и содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления IV-61. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-59, в которой белок SpyAD по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 33 и содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

Вариант осуществления IV-62. Иммуногенная композиция по вариантам осуществления с IV-59 по IV-61, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления IV-63. Иммуногенная композиция по вариантам осуществления с IV-59 по IV-61, в которой белок SpyAD состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления IV-64. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-59 по IV-63, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления IV-65. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-59 по IV-64, в которой полипептидный антиген SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления IV-66. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-1 или IV-59, содержащая полипептидный антиген пептидазу C5a с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления IV-67. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-1 или IV-59, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 52; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления IV-68. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-1 или IV-59, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 32; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления IV-69. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-1 или IV-59, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 29; полипептидный антиген SLO с

последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

Вариант осуществления IV-70. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид аргининдезимиразу (ADI) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления IV-71. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-70, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 и содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления IV-72. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-70, в которой полипептид ADI по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 и содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316.

Вариант осуществления IV-73. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-72, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления IV-74. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления IV-72, в которой полипептид ADI состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления IV-75. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид ферритин и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Вариант осуществления IV-76. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-75, в которой белок ферритин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21, и содержит замену на pAMF в положении I5.

Вариант осуществления IV-77. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-75, в которой белок ферритин по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 21 и содержит замену на pAMF в положении I5.

Вариант осуществления IV-78. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-75, в которой белок ферритин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления IV-79. Иммуногенная композиция по варианту осуществления IV-75, в которой белок ферритин состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления IV-80. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-79, отличающаяся тем, что композиция содержит от примерно 10% до примерно 50% первого антигена GAS, от примерно 10% до примерно 50% второго антигена GAS и от примерно 10% до примерно 50% конъюгата полипептид-полисахарид.

Вариант осуществления IV-81. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-80, дополнительно содержащая один или несколько адъювантов, выбранных из квасцов, сапонина, монофосфориллипида А (MPL) или их комбинаций.

Вариант осуществления IV-82. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-81, в которой конъюгат полипептид-полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от примерно 10 кДа до примерно 5000 кДа.

Вариант осуществления IV-83. Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии стрептококка группы А (GAS) у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-82.

Вариант осуществления IV-84. Способ по варианту осуществления IV-83, в котором возраст субъекта составляет 18 лет или больше.

Вариант осуществления IV-85. Способ по варианту осуществления IV-65, в котором возраст субъекта составляет меньше 18 лет.

Вариант осуществления IV-86. Способ по варианту осуществления IV-65, в котором возраст субъекта составляет от 5 лет до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

Вариант осуществления IV-87. Способ по любому из вариантов осуществления с IV-83 по IV-86, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M11, M12, M22, M28, M75 и M89.

Вариант осуществления IV-88. Способ по любому из вариантов осуществления с IV-83 по IV-86, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M3, M5, M9, M12, M18, M22, M25, M28, M71, M72 и M74.

Вариант осуществления IV-89. Способ по любому из вариантов осуществления с IV-83 по IV-86, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M4, M6, M11, M12, M22, M44, M75, M77, M77 и M81.

Вариант осуществления IV-90. Способ по любому из вариантов осуществления с IV-83 по IV-86, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M9, M12, M18, M22, M75, M77, M89 и M92.

Вариант осуществления IV-91. Способ по любому из вариантов осуществления с IV-83 по IV-86, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, M11, M12, M13, M28, M62 и M89.

Вариант осуществления IV-92. Способ по любому из вариантов осуществления с IV-83 по IV-86, в котором бактерия GAS относится к серотипу, выбранному из M1, M2, M3, M4, M6, M12, M22, M28, M49, M53, M68, M77, M80, M83, M87, M89 и M92.

Вариант осуществления IV-93. Способ по любому из вариантов осуществления с IV-83 по IV-92, в котором иммуногенная композиция индуцирует выработку антител у субъекта против бактерии стрептококка группы A (GAS) и не индуцирует выработку антител у субъекта против человеческой ткани.

Вариант осуществления IV-94. Способ по любому из вариантов осуществления с IV-83 по IV-93, в котором иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ против бактерии Shigella у субъекта, при этом бактерия Shigella содержит полисахарид с полириманозным остовом.

Вариант осуществления IV-95. Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии Shigella у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-82.

Вариант осуществления IV-96. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-82 для индукции защитного иммунного ответа против бактерии Shigella у субъекта.

Вариант осуществления IV-97. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-82 в изготовлении лекарственного

средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии *Shigella* у субъекта.

Вариант осуществления IV-98. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-82 в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии GAS у субъекта.

Вариант осуществления IV-99. Применение иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления с IV-1 по IV-82 для индукции защитного иммунного ответа против бактерии GAS у субъекта.

Вариант осуществления IV-100. Способ или применение по любому из вариантов осуществления с IV-93 по IV-99, где возраст субъекта составляет 18 лет или больше.

Вариант осуществления IV-101. Способ или применение по варианту осуществления IV-100, где возраст субъекта составляет меньше 18 лет.

Вариант осуществления IV-102. Способ или применение по варианту осуществления IV-100, где возраст субъекта составляет от 5 лет до 17 лет, от 6 месяцев до 9 лет или от 5 лет до 9 лет.

### **Включение путем ссылки**

Все ссылки, статьи, публикации, патенты, патентные публикации и патентные заявки, цитируемые в настоящем документе, полностью включены путем ссылки для всех целей. Однако упоминание любой ссылки, статьи, публикации, патента, патентной публикации и патентной заявки, цитируемых здесь, не является и не должно восприниматься как признание или любая форма предположения о том, что они представляют собой действительный предшествующий уровень техники или являются частью общепринятого общие знания в любой стране мира.

### **Примеры**

#### **Пример 1: Экспрессия и очистка полисахаридов GAS**

Были проведены эксперименты по экспрессии и очистке полисахаридов GAS из бактериальных культур GAS.

500 мл стартовых культур готовили из соответствующей рекомбинантной колонии GAS, оставляя бактерии расти в течение нескольких часов перед инокуляцией большого объема 1,25 л культуры для роста в течение ночи при 37°C без встряхивания. Бактерии осаждали центрифугированием, однократно промывали PBS. К клеточному осадку 50-мл конической пробирке добавляли 5 мл холодного 48%-го водного раствора фтористоводородной кислоты, используя полистироловые наконечники, осторожно

пипетируя вверх и вниз с помощью серологической пипетки для разрушения клеточного осадка. Используя небольшую магнитную мешалку смесь перемешивали в течение 48 часов при 4°C. В вытяжном шкафу с коническими пробирками на льду к бактериальной суспензии добавляли 45 мл (10-кратный объем 48% HF) ледяной воды Milli-Q® (сверхчистой) для подготовки к диализу.

Для диализа 4-литровые пластиковые стаканы для диализа заполняли деионизированной водой. В каждый стакан помещали мешалку и стаканы оставляли охлаждаться закрытыми в холодильной камере. Для каждой бактериальной культуры отрезали диализную трубку из регенерированной целлюлозы 1000 MWCO (макс. ~17 см для стаканов объемом 4 л). Для шести культур объемом 1,25 л требуется 3 отрезка трубки. Пробирки промывали деионизированной водой и споласкивали водой Milli-Q® (сверхчистой) перед погружением в химические стаканы, содержащие холодную воду Milli-Q® (сверхчистую). В вытяжном шкафу трубки помещали в стаканы, а затем осторожно заполняли разведенной бактериальной суспензией и закрывали зажимом. Образцы диализовали следующим образом: День 1: 4°C при перемешивании; 2-й день: замена воды, 4°C, при перемешивании; 3-й день: замена воды, комнатная температура, при перемешивании.

Содержимое диализной трубки переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. Конические пробирки объемом 50 мл промывали водой Milli-Q® (сверхчистой) 3 раза для удаления остатков растворимого пластика. В каждую пробирку декантировали до 30 мл супернатанта, содержащего полисахарид, и замораживали на сухом льду в течение 1 часа. Затем замороженные образцы лиофилизировали, а остаток ресуспендировали в 8 мл холодной воды, при необходимости слегка обрабатывая ультразвуком. Добавляли 1 мл 10-кратного буфера протеиназы К (500 mM Tris HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) и 12,5 мг протеиназы К на препарат полисахарида. Образцы инкубировали при 56°C в печи для гибридизации в течение ночи, время от времени перемешивая. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 100 mM PMSF в этаноле (конечная концентрация 5 mM) и инкубировали в течение 1-2 часов при 37°C, периодически перемешивая. Затем смесь подвергали диализу в деионизированной воде с 0,05% азидом натрия при перемешивании в течение 24 часов для удаления солей. Полученный неочищенный раствор полисахарида замораживали и лиофилизировали.

Неочищенный полисахарид очищали эксклюзионной хроматографией с использованием колонки Biogel P4 100 см x 1,5 см, предварительно уравновешенной

7% этанолом, снабженной спиральным коллектором, настроенным на 20,0 мин на образец. Неочищенный материал ресуспендировали в 500 мкл 7% этанола и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 минут для удаления всех нерастворимых твердых частиц. Образец наносили на колонку и предварительно нанесенный объем и четыре последующие фракции элюировали 500 мкл 7% этанола. Колонку элюировали 7% этанолом, собирая в течение примерно 20 часов. Фракции анализировали с использованием фенол-сернокислотного метода для обнаружения присутствия полисахарида, и образцы считывали при 490 нм для количественного определения. Фракции, давшие положительный результат в тесте на фенол-серную кислоту, объединяли и лиофилизировали с получением конечного очищенного продукта PS.

### **Пример 2: Экспрессия и очистка рAMF-модифицированного полипептида конъюгата**

Были проведены эксперименты по экспрессии и очистке рAMF-модифицированных полипептидов конъюгатов из экстракта бесклеточного синтеза белка.

Полипептиды конъюгата, например, SpyAD (SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 34), содержащие ппАА (например, рAMF), экспрессировали в реакции бесклеточного синтеза белка (CFPS) с использованием экстракта (XtractCF<sup>+</sup>), полученного из штамма *E. coli*, сконструированного для получения ортогональной tRNA для вставки ппАА в янтарный стоп-кодон. Примеры протоколов, используемых для клонирования, экспрессии и очистки этих модифицированных полипептидов конъюгатов, можно найти, например, в работе Karoor *et al.*, *Biochemistry*, 2018, 57(5), 516-519.

Например, контролируемая крупномасштабная экспрессия антигена может быть осуществлена с использованием мини-биореакторной системы DASbox в течение 10 ч при 25°C при постоянном перемешивании со скоростью 650 об/мин, рН 7,2, растворенном кислороде 30%. Через 10 ч реакционные смеси собирали и центрифугировали при 15000 x g при 4°C в течение 30 мин, пропускали через фильтр 0,45 мкм, фильтрат наносили на 5 мл колонку HisTrap Excel (Cytiva), уравнивали и тщательно промывали буфером А [50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM имидазол] до возвращения поглощения к исходному уровню (на фиг. 17 показаны образцы гелей после очистки выбранных вариантов SLO). Белки элюировали с использованием 50% ступенчатого градиента буфера В [50 mM Tris, 150 mM NaCl, 500 mM имидазол] и

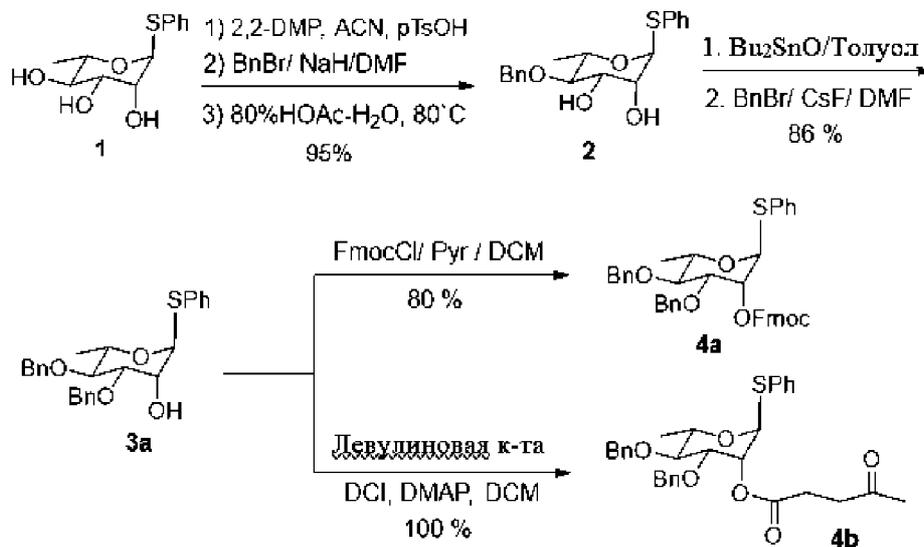
элюированные фракции объединяли, концентрировали и инкубировали с избытком очищенной his6-меченой протеазы TEV в течение ночи при диализе против буфера A (на фиг. 18 показан образец геля после расщепления TEV пептидов SLO). Диализированную реакционную смесь в результате расщепления наносили обратно на предварительно уравновешенную колонку HisTrap Excel объемом 5 мл (Cytiva) и немеченые белки собирали в проточных фракциях (FT). После этого FT концентрировали и наносили на колонку для эксклюзионной хроматографии (SEC) Superdex 200 26/60, предварительно уравновешенную буфером S [50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl], и чистоту элюированных фракций оценивали с помощью SDS-PAGE в гель-анализе (на фиг. 19 показана чистота выбранных вариантов SLO после эксклюзионной хроматографии). Очищенный SpyAD[4pAMF] инкубировали с избытком красителя дибензоциклооктин-PEG4-тетраметилродамина (DBCO-TAMRA) в течение 1 часа при комнатной температуре для подтверждения сайтов pAMF с помощью геля SDS-PAGE, и показания флуоресценции регистрировали с использованием устройства для визуализации геля Syngene G-box.

Полипептиды, не модифицированные npAA, получали с использованием CFPS в соответствии со способами, аналогичными описанным выше. На фигуре 12 показана модульная архитектура белковых антигенов GAS и выбранных фрагментов иммуногенного ядра, экспрессируемых в CFPS.

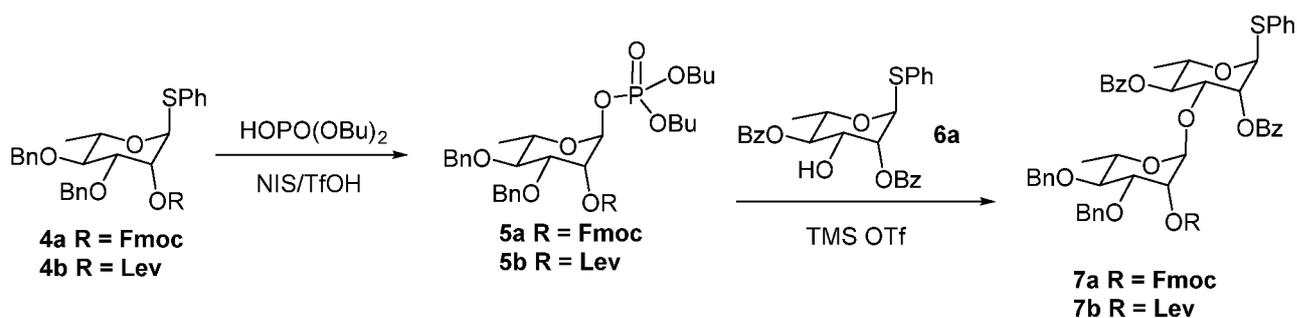
Одноцентровое исследование мутагенеза проводили на SpyAD (SEQ ID NO: 9), чтобы понять, каким образом замена отдельных аминокислотных остатков на pAMF влияет на экспрессию, измеряемую как по общему белку, так и по растворимому белку. На фигуре 1A показаны уровни экспрессии, полученные в результате исследования методом лизин-сканирующего мутагенеза. Как показано, введение остатков pAMF в единичные точки в белке SpyAD имело различные эффекты на экспрессию общего и растворимого белка. На фигуре 1B показаны уровни экспрессии антигенов и конъюгатов антигенов, содержащих npAA. На фигуре 13 показана более 95% чистота вариантов SLO, C5a пептидазы и SpyAD, измеренная с помощью окрашивания реагентом Safe Blue, и дополнительно показано включение pAMF в вариант SpyAD SpyAD[4pAMF], что подтверждается мечением DBCO-TAMRA.

**Пример 3: Синтез и очистка рамнозных полисахаридов, модифицированных реакционноспособными группами, подходящими для клик-химии**

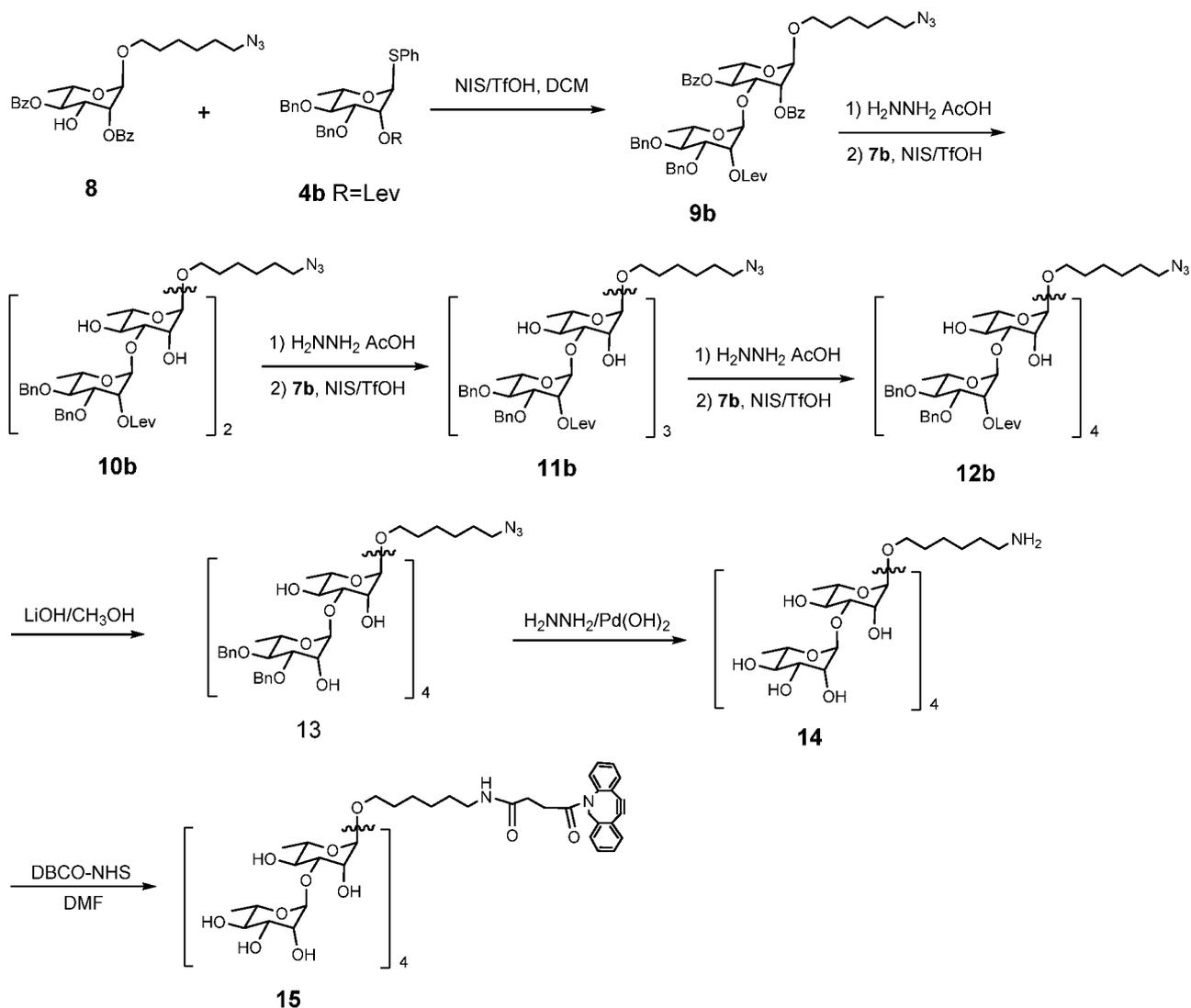
Полисахариды, модифицированные DBCO, синтезировали с использованием поэтапного подхода, позволяющего регулировать длину олигомера.



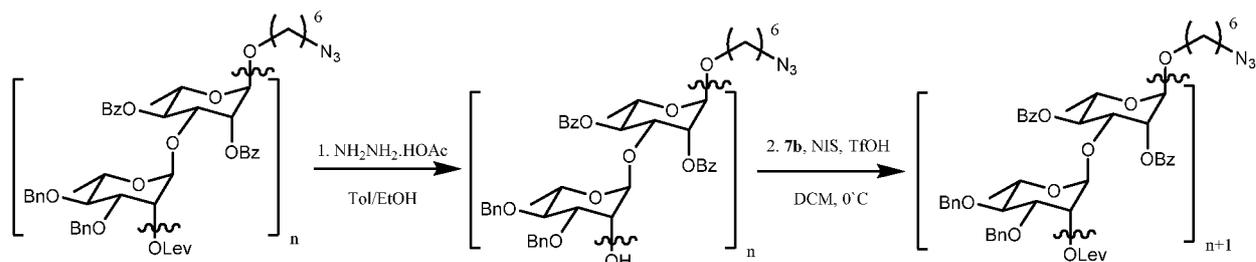
*Синтез моносахаридных промежуточных соединений 4a и 4b:* Мономер 1 подвергли монобензилированию с получением соединения 2, которое дополнительно защищали бензилом с получением промежуточного соединения 3a. Обработка 3a левоулиновой кислотой в условиях этерификации обеспечила получение мономера эфира левоулиновой (Lev) кислоты 4a. Альтернативно, Fmoc-защита 3a обеспечила получение мономера 4b.



*Синтез дисахаридных доноров 7a и 7b:* Промежуточные моносахариды 4a/b превращали в сложные эфиры фосфорной кислоты 5a/b, которые впоследствии обрабатывали TMSOTf и 6a с получением дисахаридных доноров 7a/b.



Синтез рамнозного октасахарид с использованием реакционноспособной группой, подходящей для клик-химии: Промежуточный азид **8** подвергали реакции сочетания с промежуточным моносахаридом **4b** в присутствии NIS/TfOH с получением димера **9b**, который затем подвергали трем последовательным последовательностям реакции снятия защиты/сочетания с дисахаридным донором **7b** с получением частично защищенного октамерного промежуточного соединения **12b**. Обработка **12b** смесью LiOH/метанол гидролизовала левулиновый эфир с получением **13**, а дальнейшая обработка  $\text{H}_2\text{NNH}_2/\text{Pd(OH)}_2$  одновременно восстанавливала подвешенный азид и восстановительно расщепляла оставшиеся бензиловые эфиры с получением **14**. Сочетание **14** с DBCO-NHS дало конечный октасахарид **15**.



Полисахариды различной длины, например, додекасахарид и гексасахарид, могут быть получены путем изменения количества последовательностей снятия защиты/сочетания с донором **7b**, как показано на приведенной выше общей схеме реакции.

Полисахариды по настоящему изобретению также могут быть синтезированы посредством твердофазного синтеза с использованием Fmoc-защищенных производных вышеуказанных промежуточных соединений, происходящих из мономера **4a**.

#### Пример 4: Связывание очищенного PS с линкером DBCO-PEG

Очищенные полисахариды, например, полученные с помощью способов по примеру 1, могут быть функционализированы линкером DBCO-PEG.

Как правило, к раствору полисахарида в воде (конечная концентрация 5,5 мМ после добавления всех реагентов) добавляли боратный буфер (1М, pH 8,5) таким образом, чтобы конечная концентрация бората составляла 100 мМ в конечном объеме. Затем добавляли воду, чтобы заполнить любой дополнительный реакционный объем. 2,5 эквивалента (по отношению к повторяющемуся звену полисахарида) тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP; из раствора 100 мг/мл в ацетонитриле) добавляли при интенсивном перемешивании. CDAP хранится при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и раствор необходимо готовить непосредственно перед использованием. Через пять минут после добавления CDAP (это время имеет решающее значение - любое время дольше 5 минут приводит к уменьшению включения DBCO-PEG-Амина) добавляли 0,5 молярных эквивалентов линкера дибензоциклооктин-амина (из исходного раствора DMSO, конечная концентрация DMSO составляет 5% об./об.). Линкер DBCO-PEG4-Амин хранится при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и должен быть приготовлен непосредственно перед использованием. После одного часа дополнительной реакции добавляли глицин (2М, pH 8,35) в соотношении 1:10 по объему с получением конечной концентрации глицина 200 мМ для гашения

любых непрореагировавших цианатных эфиров. После гашения в течение 1 ч дериватизированный полисахарид затем очищали на спин-колонке Zeba. В каждую колонку Zeba объемом 10 мл добавляли 2-3 мл раствора. Очищенный полисахарид анализировали методом HPLC со связанным/свободным DBCO, чтобы определить, был ли полностью удален остаточный линкер DBCO-PEG4-Амин и DMAP при очистке на колонке. При необходимости материал может быть дополнительно очищен. Концентрацию полисахарида измеряли, используя анализ антрона, а концентрацию дибензоциклооктина измеряли, используя оптическую плотность при 309 нм. Эти два значения объединяли с получением оценки процентного содержания полисахарида, дериватизированного функциональной группой дибензоциклооктина. Процент DBCO должен составлять 5-10% для реакций CDAP.

*DBCO-PEG4 Дериватизация GAC:* К 6 мМ раствору GAC в 100 мМ боратном буфере, pH 8,5, добавляли три эквивалента (повторяющегося звена полисахарида) 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторбората (CDAP; из 100 мг/мл раствора в ацетонитриле) при интенсивном перемешивании для облегчения цианилирования по реакционноспособным гидроксильным группам. Через 5 минут после добавления CDAP добавляли 2 молярных эквивалента исходного раствора линкера дибензоциклооктин-амин в DMSO, так что конечная концентрация DMSO составляла 5% (об./об.). После DBCO-дериватизации в реакционную смесь добавляли 200 мМ глицина для гашения непрореагировавших сложных эфиров цианата. DBCO-дериватизированный полисахарид очищали на колонке для обессоливания Zeba-spin, и чистоту извлеченного материала оценивали с помощью обращенной фазы. Единственный пик в HPLC при мониторинге поглощения при 309 нм подтвердил полное удаление избытка линкера DBCO и других побочных продуктов реакции. Наконец, концентрацию полисахарида измеряли, используя анализ на антроны (см. ниже), и концентрацию дибензоциклооктина измеряли, используя поглощение при 309 нм. Эти два значения объединяли с получением оценки процентного содержания полисахарида, дериватизированного функциональной группой дибензоциклооктина. Для конъюгации % DBCO-дериватизации GAC поддерживали в пределах 5-10%.

*Анализ на антроны для определения общей концентрации полисахаридов:* Исходный 2 мг/мл раствор антронового реактива (Sigma-Aldrich, CAS#90-44-8) готовили в холодной серной кислоте, а исходный 1 мМ раствор повторяющегося звена полисахарида (PSRU), содержащий 2х рамнозу, готовили в воде в качестве стандарта. В лунки в трех повторностях вносили 100 мкл исходного раствора PSRU (серийно

разведенного в эталонные стандарты) или неизвестные образцы (разбавленные 1:3) (96-луночный планшет) с последующим добавлением 200 мкл на лунку исходного раствора реактива антрон. Все реакционные смеси тщательно перемешивали и закрывали крышкой планшета для инкубации при 95°C в течение 10 мин. Планшет помещали на лед на непродолжительный период времени для охлаждения до температуры окружающей среды, после чего измеряли поглощение при 620 нм с использованием планшетного ридера UV/VIS. Для определения концентрации неизвестных образцов использовали стандартные концентрации PSRU и коэффициенты поглощения для построения кривой регрессии методом наименьших квадратов.

### **Пример 5: Конъюгация белка-носителя с DBCO-derivатизированными полисахаридами**

Как правило, белки-носители ферритин (SEQ ID NO: 23), SpyAD (SEQ ID NO: 34), ADI (SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 38), SEQ ID NO: 25 и белок D, содержащие ппАА (например, рАМF) конъюгировали с очищенными DBCO-derivатизированными полисахаридами из примера 3 и примера 4 посредством реакции циклооктинового фрагмента группы DBCO с азидным фрагментом боковой цепи ппАА, включенной в белок-носитель. Примеры протоколов реакции конъюгации между DBCO и азидными группами можно найти, например, в Zimmerman *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, 2014, 25(2), 351-361 и Karoog *et al.*, *Biochemistry*, 2018, 57(5), 516-519.

*Конъюгация рАМF-derivатизированного GAC с SpyAD:* SpyAD[4рАМF] (SEQ ID NO: 34) смешивали с DBCO-derivатизированным GAC в соотношении 1:1 [0,5 мг/мл каждый] для облегчения конъюгации посредством клик-химии. После конъюгации реакционную смесь подвергали диализу с использованием мембраны с отсечкой 50 кДа для удаления избытка непрореагировавшего свободного полисахарида. Извлеченные конъюгаты анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) с детектором многоуглового светорассеяния лазерного света (MALS), и концентрацию оценивали с использованием анализа по антрону. На фигуре 9 показана схема, иллюстрирующая derivатизацию GAC с помощью DBCO-(PEG)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> и последующую конъюгацию с рАМF-derivатизированным SpyAD. На фигуре 10 показан анализ SEC MALS очищенного нативного GAC, очищенного нативного SpyAD[4рАМF] и очищенных конъюгатов. Анализ SEC-MALS очищенного нативного GAC оценил среднюю молекулярную массу в 7,2 кДа. Анализ SEC-MALS очищенного

нативного SpyAD[4pAMF] оценил среднюю молекулярную массу в 87,3 кДа. Анализ SEC-MALS после клик-химии очищенных конъюгатов оценил среднюю объединенную молекулярную массу в 153,4 кДа. На вставке показан анализ SDS-PAGE с окрашиванием Safe Blue SpyAD[4pAMF] до и после конъюгации, с отсутствием непрореагировавшего белка, оставшегося после конъюгации.

SEC MALS-UV-RI выполняли с помощью дегазатора Agilent HPLC 1100, автосамплера с регулируемой температурой (4°C), колоночного отделения (25°C) и детектора на диодной матрице UV-VIS (Agilent, Santa Clara, CA), расположенного на одной линии с детектором многоугольного рассеяния лазерного света DAWN-HELEOS и дифференциальным рефракционным интерферометром Optilab T-rEX (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA), последовательно соединенным с тремя колонками TOSOH: TSKgel Guard PWXL ID 6,0 мм x длина 4,0 см, размер частиц 12 мкм; TOSOH TSKgel 6000 PWXL, ID 7,8 мм x длина 30 см, размер частиц 13 мкм; и TSKgel 3000 PWXL ID 7,8 мм x длина 30 см, размер частиц 7 мкм. Подвижную фазу, состоящую из отфильтрованного 0,2 мкм 1x PBS с 5% (об./об.) ацетонитрила, использовали при скорости потока 0,5 мл/мин, и для анализа вводили образец 50-100 мкг. Программное обеспечение Agilent Open Lab использовали для контроля HPLC, и программное обеспечение Wyatt Astra 7 использовали для сбора данных и анализа молекулярной массы.

### **Пример 6: Выработка антител, индуцированная антигенами GAS и конъюгатами антиген-полисахарид**

Были проведены эксперименты для оценки выработки антител в ответ на очищенные антигены GAS и их конъюгаты. Вкратце, кроликов внутримышечно иммунизировали 50 мкг каждого указанного антигена или конъюгата, или контрольного носителя на 0, 14 и 28 дни. У животных отбирали кровь перед иммунизацией (предотбор), и на 7, 21 и 35 дни (терминальный отбор) после иммунизаций. Из каждого образца крови собирали сыворотку и титры антител против иммунизирующих антигенов оценивали с помощью ELISA.

Для ELISA-анализа титров антител указанный рекомбинантный белковый антиген высевали в стерильный PBS при концентрации 3 мкг/лунку. Плоскдонные 96-луночные планшеты с высоким связыванием покрывали 100 мкл полученного антигена и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре без перемешивания. Планшеты промывали 3 раза 100 мкл PBS + 0,05% Tween 20 с использованием

устройства для промывки микропланшетов Aquamax Microplate Washer, затем промокали насухо бумажными полотенцами. Лунки блокировали 100 мкл Reagent Diluent 2 в течение 2 часов. Также можно использовать 100 мкл PBS с 1% BSA. Планшеты, закрытые крышкой и запечатанные, можно хранить в блокирующем растворе при 4°C в течение 3 дней. Затем планшеты промывали 3 раза 100 мкл PBS + 0,05% Tween 20, как и ранее.

Образцы сыворотки готовили путем разведения образца в 1x Reagent Diluent 2 (типичное разведение составляет от 1:400 до 1:10<sup>6</sup>). Затем в планшеты добавляли 100 мкл приготовленной сыворотки с последующим инкубированием в течение 2 часов. Объединенную кроличью сыворотку до иммунизации использовали в качестве отрицательного контроля, а лунки без кроличьей сыворотки использовали в качестве фонового контроля. Планшеты промывали 3 раза 100 мкл PBS + 0,05% Tween 20, как и ранее. Затем планшеты инкубировали с 100 мкл HRP-конъюгированного вторичного антитела козы против кроличьего IgG (H+L) (разбавленного 1:4000 в 1x Reagent Diluent 2) в течение 2 часов. Затем планшеты промывали 3 раза 100 мкл PBS + 0,05% Tween 20, как и ранее. Субстрат ТМВ готовили в соответствии с инструкциями производителя и добавляли равные объемы реагента А и реагента В при комнатной температуре. Вносили по 100 мкл приготовленного субстрата ТМВ на лунку и планшеты инкубировали в защищенном от света месте в течение не более 30 мин. Добавляли по 50 мкл 2N серной кислоты на лунку для остановки реакции. Планшеты ELISA считывали при 450 нм и 540 нм, вычитая значения при 540 нм из значений при 450 нм для коррекции на фон. Титры определяли на основе отсечки: значение поглощения фоновых контролей + 3 \* стандартное отклонение фоновых контролей.

Как показано на фигуре 2, иммунизация ADI (SEQ ID NO: 38), SLO (SEQ ID NO: 32), C5a (SEQ ID NO: 30), SpyCEP, Sib35, SpyAD (SEQ ID NO: 33) и конъюгатами SpyAD-PS (конъюгаты pAMF-замещенных SEQ ID NO: 34) вызывала сильную выработку антител по сравнению с контрольными образцами, полученными до иммунизации. Sfb1 также тестировали, но наблюдалась слабая выработка титров антител. Каждый индивидуальный идентификатор антигена в разных панелях представляет разного кролика в эксперименте.

#### **Пример 7. Вызванное GAS-антигеном связывание антитела с серотипами GAS**

Были проведены эксперименты для оценки способности антител, выработка которых была индуцирована GAS-антигеном, связываться с различными серотипами GAS. Вкратце, кроликов иммунизировали 20 мкг конъюгата SpyAD-PS или 50 мкг C5a

пептидазы на 0, 14 и 28 дни. У животных отбирали кровь до иммунизации (предиммунная сыворотка), и на 7, 21 и 35 дни после иммунизации (иммунная сыворотка). Из каждого образца крови собирали сыворотку.

Все образцы сыворотки инактивировали нагреванием при 55°C в течение 30 минут. GAS различных серотипов выращивали до  $OD_{600}=0,4$ , промывали и замораживали при  $2 \times 10^8$  КОЕ/мл. Замороженный сток GAS оттаивали, добавляли 10% козьей сыворотки и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Для анализа связывания 100 мкл заблокированного GAS (вместе с козьей сывороткой) добавляли в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. В каждую пробирку добавляли по 2 мкл преиммунной или иммунной сыворотки. Образцы хорошо перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Образцы центрифугировали при 3500 G в течение 5 минут и промывали 1 раз 500 мкл PBS. Затем образцы инкубировали с флуоресцентным вторичным антикроличьим вторичным антителом. Затем образцы переносили в пробирки FACS с 500 мкл PBS. Интенсивность флуоресцентного сигнала измеряли с помощью проточной цитометрии и рассчитывали с использованием программного обеспечения FlowJo, сравнивая интенсивность сигнала иммунной и преиммунной сыворотки.

На фигуре 3А показано IgG-связывание сыворотки после иммунизации SpyAD-конъюгатом (конъюгат SEQ ID NO: 34) по сравнению с IgG-связыванием преиммунной сыворотки со штаммами M1 (1-21). На фигуре 3В показано IgG-связывание сыворотки после иммунизации C5a пептидазой (SEQ ID NO: 30) по сравнению с IgG-связыванием преиммунной сыворотки с различными штаммами M1 (1-21). Степень IgG-связывания конъюгата SpyAD и C5a пептидазы со всеми клинически значимыми штаммами GAS показана на фигуре 3С, причем оба демонстрируют сильное связывание с > 95% клинически значимых GAS.

*Дополнительная оценка вакцинных антигенов GAS на иммуногенность:* В соответствии с приведенными выше протоколами животных иммунизировали 5 мкг SLO, C5a пептидазы или конъюгата SpyAD-GAC в 240 мкл общего объема сукцинатного буфера, дополненного Adju-phos (Invivogen). Определение титров иммуноглобулина g (IgG), вызванных вакцинацией, и оценку кроличьей антисыворотки терминального отбора крови (день 35) проводили с помощью ELISA. Для всех трех белковых антигенов (SpyAD, C5a пептидаза и SLO) группа кроликов, иммунизированных рекомбинантным белком, показала значительно повышенные (в  $3-4 \log_{10}$  раз) титры антител против антигена-мишени по сравнению с любой

объединенной сывороткой кроликов до иммунизация («преиммунная (объединенная)») или другими группами иммунизированных кроликов (фигура 3D, каждая точка представляет сыворотку, полученную от одного животного, в опыте с 2-3 животными на группу), подтверждая специфичность ответа на каждый соответствующий антиген. Титр анти-SpyAD белка, генерируемый конъюгатом SpyAD-GAS, не уступал титру взятого в отдельности рекомбинантного белка SpyAD, что свидетельствует о том, что сайты рAMF не влияют на ключевые В-клеточные эпитопы. Проточную цитометрию использовали для оценки аффинности связывания кроличьего IgG с поверхностью восьми живых штаммов GAS дикого типа различных серотипов белка M (m1-6, M12, M28). Для большинства штаммов соответствующая иммунизированная сыворотка дала увеличение связывания на 1000-400% по сравнению с исходным уровнем связывания IgG преиммунной сыворотки (фигура 3E, числа в правом верхнем углу каждой гистограммы показывают средний процент повышенного сигнала иммунизированной кроличьей сыворотки по сравнению с сигналом преиммунизированной сыворотки). Для шести из восьми штаммов поверхностное связывание с GAS антисыворотки, индуцированной против конъюгата SpyAD-GAS, примерно вдвое превышало уровень связывания IgG, наблюдаемый при использовании антисыворотки, индуцированной против только SpyAD. На фигуре 3F показано связывание IgG кролика с GAS, нокаутным по SpyAD, подтверждая связывание с нативным GAS.

### **Пример 8: Анализ уничтожения нейтрофилами**

Были проведены эксперименты для определения способности иммунных сывороток от кроликов, иммунизированных антигенами и конъюгатом, вызывать уничтожение нейтрофилами штаммов M1, M3 и M3 GAS. Кроликов иммунизировали указанными антигенами согласно протоколу, описанному в примере 7. Для взятых в отдельности антигенов кроликов иммунизировали 50 мкг антигена. Для конъюгированных антигенов кроликов иммунизировали 20 мкг конъюгата.

*Выделение нейтрофилов:* 25 мл крови отбирали у здоровых добровольцев, используя иглы-бабочки 21 G, в пробирки с гепарином Vacutainer. Нейтрофилы выделяли из свежей крови с использованием Polymorphprep в соответствии с протоколом производителя. Всю сыворотку, включая преиммунную сыворотку, иммунную сыворотку, и FBS, нагревали при 65°C в течение 30 минут с периодическим перемешиванием перед использованием в анализе.

*Протокол анализа уничтожения нейтрофилами:* Ночные культуры штаммов GAS инокулировали в бульоне Тодда Хьюита (ТНВ) в соотношении 1:10. Когда культура достигала  $OD_{600}=0,4$ , культуру центрифугировали и повторно суспендировали в HBSS с 10% преиммунной или иммунной сывороткой до  $5 \times 10^5$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Штаммы GAS выдерживали в среде RPMI + сыворотка в течение 30 минут при комнатной температуре. Подготовленные нейтрофилы повторно суспендировали в HBSS + 4% FBS + 4% комплемента Baby Rabbit (BRC) при концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл. 100 мкл нейтрофилов ( $5 \times 10^5$  клеток) высевали в 96-луночный планшет с плоским дном, при этом каждое условие повторяли в трех повторностях. В каждую лунку с нейтрофилами добавляли по 100 мкл приготовленных бактерий ( $5 \times 10^4$  КОЕ/лунка). Инокулированные бактерии высевали на чашки с кровяным агаром в серийных разведениях для последующего подсчета инокулята КОЕ. 96-луночный планшет центрифугировали при 500 G в течение 5 минут, а затем инкубировали при  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$  в течение 30 минут. После 30 минут инкубации образцы хорошо перемешивали, высевали на чашки с кровяным агаром в последовательных разведениях и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение ночи. Подсчитывали колонии GAS и рассчитывали процентное соотношение КОЕ инокулята к извлеченным КОЕ как % выживаемость. Увеличение % уничтожения по сравнению с группой преиммунной сыворотки рассчитывали сначала путем вычисления % уничтожения ( $100 - \% \text{ выживаемость}$ ) в группах преиммунной и иммунной сыворотки. Затем рассчитывали % увеличения уничтожения в группе иммунной сыворотки по сравнению с % уничтожения в группе преиммунной сыворотки.

На фигуре 4 показана способность сыворотки, полученной в результате иммунизации антигенами ADI 1625 (SEQ ID NO: 36), мутантом 1807 конъюгата ADI (конъюгат рAMF-замещенной SEQ ID NO: 38), мутантом 1809 конъюгата ADI (конъюгат SEQ ID NO: 38), SLO 1627 (SEQ ID NO: 32), C5a пептидазой 1630 (SEQ ID NO: 30), SpyAD 1642 (SEQ ID NO: 33), SpyAD-конъюгатом 1644, 1630+1627+1644, 1630+1627+1809, 1630+1627, и M1 увеличивать уничтожение серотипов M1, M2 и M3 GAS по сравнению с преиммунной сывороткой. рAMF-замещенные конъюгаты SpyAD получали с использованием пептида SEQ ID NO: 12, а конъюгаты ADI получали с использованием пептида SEQ ID NO: 20.

**Пример 9. Антигены и конъюгаты GAS вызывают активные иммунные ответы, которые увеличивают выживаемость после заражения GAS**

Мышей активно иммунизировали до заражения путем подкожной и внутрибрюшинной (IP) инъекции.

**Таблица 5: Хронология эксперимента по активной иммунизации – подкожные и IP заражения**

<b>Подкожное заражение - Стадии</b>	<b>IP заражение - Стадии</b>
День 1: 1 <sup>-я</sup> иммунизация	День 1: 1 <sup>-я</sup> иммунизация
День 14: 2 <sup>-я</sup> иммунизация	День 14: 2 <sup>-я</sup> иммунизация
День 28: 3 <sup>-я</sup> иммунизация	День 28: 3 <sup>-я</sup> иммунизация
День 42: заражение инфекцией	День 41: бритье мыши
День 49: завершающий эксперимент	День 42: заражение инфекцией
	День 45: умерщвление мыши и сбор очагов поражения

*1<sup>-я</sup>, 2<sup>-я</sup> и 3<sup>-я</sup> иммунизации – подкожное и IP заражения:* Смеси антиген/адъювант готовили путем объединения 50 мкл квасцов (Alhydrogel) с 10 мкг антигена(ов) или 5 мкг конъюгата и тщательного перемешивания для обеспечения адсорбции антигенов на квасцы. Каждую смесь антиген/адъювант набирали в шприцы на 1 мл, снабженные иглами калибра 26 1/2. Каждую мышь анестезировали ингаляционным изофлураном и вводили 100 мкл приготовленной вакцины в мышцу задней ноги.

*Подготовка мышей к заражению – подкожное заражение:* мышей анестезировали изофлураном. Спины мышей выбривали электрической бритвой, стараясь не порезать кожу. Крем для депиляции волос наносили на выбритые спины и оставляли на несколько минут, прежде чем тщательно вытереть их влажными бумажными полотенцами. Мышей вытирали насухо и оставляли восстанавливаться после обработки изофлураном.

*Подготовка материалов для заражения – подкожное и IP заражения:* Штамм M1 89155 GAS выращивали до среднелогарифмической фазы. Концентрацию клеток

регулировали стерильным фосфатно-солевым буфером, серийно разбавляя и высевая бактерии на агар для подтверждения бактериальной дозы. Для подкожного заражения целевое значение КОЕ на 10 мкл на мышь составляло  $1 \times 10^6$ , и бактерии набирали в шприцы Hamilton объемом 500 мкл, снабженные иглами калибра 26  $\frac{1}{2}$ . Для IP заражения на 35-й день целевое значение КОЕ на 100 мкл на мышь составило  $1 \times 10^7$ , и бактерии набирали в шприцы на 1 мл, оснащенные иглами калибра 26  $\frac{1}{2}$ . Мышей анестезировали ингаляционным изофлураном, а затем вводили 200 мкл бактерий M1 89155 в брюшную полость. Мышам давали восстановиться от анестезии на обычном воздухе. Выживание мышей отслеживали в течение 1 недели, проверяя несколько раз в день.

*Подкожное заражение и сбор очагов поражения.* Для подкожных заражений на 35-й день мышей анестезировали ингаляционным изофлураном, а затем инъецировали 10 мкл бактерий 89155 M1 в выбритые спины с использованием повторного дозатора для шприца Hamilton. Размеры поражений отслеживали ежедневно в течение 3 дней путем фотографирования мышей, анестезированных изофлураном, рядом с линейкой. Перед сбором поражений на 3-й день для каждого поражения кожи были приготовлены стерильные пробирки с завинчивающимися крышками объемом 2 мл с шариками диоксида кремния диаметром 1,0 мм и 1 мл PBS. Регистрировали массу каждой пробирки. На 3-й день, когда поражения полностью развились, мышей подвергли эвтаназии с помощью CO<sub>2</sub> и смещения шейных позвонков. Используя чистые хирургические инструменты, каждый участок кожи вырезали и помещали в предварительно взвешенные пробирки. Массу пробирок записывали для расчета массы ткани. Пробирки помещали в прибор для гомогенизации MagnaLyser и гомогенизировали при 6000 об/мин в течение 60 сек. Затем пробирки помещали на лед для охлаждения на 60 сек перед повторением цикла гомогенизации. Образцы серийно разбавляли, и лизат помещали на агар для количественного определения бактериальной нагрузки.

Были проведены два параллельных эксперимента, в которых в одной группе животных на протяжении всего эксперимента отбирали кровь для определения титров антиген-специфических антител после вакцинации. В другой группе у мышей не отбирали кровь в ходе эксперимента. Обе группы животных подвергались одинаковому заражению в конце для выполнения анализа размера поражения и КОЕ/мг. На фигуре 5А показаны результаты экспериментов по активной иммунизации группы, у которой отбирали кровь, оцененных по размеру поражения и КОЕ/мг поражения,

демонстрирующие, что конъюгаты по настоящему изобретению действуют лучше, чем взятые в отдельности полисахариды. Аналогично, на фигуре 5B показаны результаты экспериментов по активной иммунизации группы, у которой не отбирали кровь, оцененные по размеру поражения и КОЕ/мг поражения, где GAC-конъюгаты SpyAD (конъюгаты рAMF-замещенной SEQ ID NO: 34) и ADI (конъюгаты ADImut2 используют рAMF-замещенную SEQ ID NO: 27, и конъюгаты ADImut5 используют рAMF-замещенную SEQ ID NO: 38) обеспечили лучшую защиту, чем соответствующий взятый в отдельности белок. Наилучшую защиту обеспечивала C5a пептидаза (SEQ ID NO: 4). На фигуре 5C показаны титры первого, второго и третьего антитела после каждой иммунизации. На фигуре 5D показаны данные по выживаемости мышей, которые подверглись активной иммунизации и впоследствии подверглись IP заражению. Единственной группой, показавшей некоторую защиту, была группа, которой вводили комбинацию из 6 антигенов с 30 мкг общего белка.

*Активная иммунизация антигеном или комбинациями конъюгатов с антигенами:* Как указано выше, мышей активно иммунизировали одним или несколькими антигенами или конъюгатом с антигеном до заражения IP инъекцией.

**Таблица 6: Хронология эксперимента по активной иммунизации – подкожные и IP заражения**

<b>IP заражение - Стадии</b>
День 1: 1 <sup>-я</sup> иммунизация
День 14: 2 <sup>-я</sup> иммунизация
День 28: 3 <sup>-я</sup> иммунизация
День 42: IP заражение

Мышей (n=10 на группу) иммунизировали одним из 8 способов: ложная иммунизация (PBS + квасцы); 5 мкг конъюгата SpyAD-GAC (конъюгат рAMF-замещенной SEQ ID NO: 34); 5 мкг конъюгата ADImut5-GAC (конъюгат рAMF-замещенной SEQ ID NO: 38); 10 мкг C5a пептидазы (SEQ ID NO: 30); 10 мкг стрептолизина O (SEQ ID NO: 32); комбинация 10 мкг C5a пептидазы (SEQ ID NO: 30) и 10 мкг стрептолизина O (SEQ ID NO: 32); комбинация 10 мкг C5a пептидазы (SEQ ID NO: 30), 10 мкг стрептолизина O (SEQ ID NO: 32) и 5 мкг конъюгата SpyAD-GAC (конъюгат рAMF-замещенной SEQ ID NO: 34); или комбинация 10 мкг C5a пептидазы

(SEQ ID NO: 30), 10 мкг стрептолизина O (SEQ ID NO: 32) и 5 мкг конъюгата ADImut5-GAC (конъюгат рAMF-замещенной SEQ ID NO: 38). Конъюгаты SpyAD получали с использованием пептида с последовательностью SEQ ID NO: 12, и конъюгаты ADImut5 получали с использованием пептида с последовательностью SEQ ID NO: 20.

На фигуре 5E показана выживаемость мышей, активно иммунизированных взятыми в отдельности антигенами/конъюгатами с антигенами или двумя антигенами/конъюгатами с антигенами (комбинацией) после IP заражения. Мыши, иммунизированные взятым в отдельности SLO имели наибольшую выживаемость, но ни одна индивидуальная или двойная комбинация антигенов не обеспечивала 100% защиту через шесть дней после заражения. Примечательно, что когда мышей активно иммунизировали тройными комбинациями перед IP заражением, через 6 дней наблюдали 100-процентную выживаемость. Эти данные показаны на фигуре 5F.

#### **Пример 10. Антигены и конъюгаты GAS вызывают пассивные иммунные ответы, которые увеличивают выживаемость после заражения GAS**

Мышей пассивно иммунизировали до заражения путем IP инъекции.

Были проведены эксперименты для оценки защиты, обеспечиваемой антисыворотками, выделенными от мышей, иммунизированных антигеном GAS и конъюгатом GAS, при переносе на мышей, которые впоследствии были заражены GAS. Вкратце, кроликов вакцинировали 5 мкг антигена ADI (SEQ ID NO: 36), антигена C5a (SEQ ID NO: 30), антигена Sfb1 (SEQ ID NO: 28), антигена SpyAD (SEQ ID NO: 33), конъюгатов ADI:GAC (конъюгаты рAMF-замещенной SEQ ID NO: 38) или конъюгатов SpyAD:GAC (конъюгаты рAMF-замещенной SEQ ID NO: 34) на 0, 3 и 6 неделе. Сыворотку собирали у каждого животного на 8 неделе.

*Пассивная иммунизация – IP заражение:* Оттаявшую кроличью сыворотку (приблизительно 200 мкл на мышшь), перенесенную на лед, набирали в шприцы на 1 мл, оснащенные иглами 30 калибра. Штамм M1 89155 GAS, выращенный до середины логарифмической фазы роста, разводили стерильным фосфатно-солевым буфером для регулирования концентрации клеток. Целевое количество КОЕ на 100 мкл на мышшь составляло  $1 \times 10^7$ , и бактерии набирали в шприцы на 1 мл, снабженные иглами калибра 26 ½. Сыворотку кролика нагревали в шприцах до комнатной температуры, и мышей анестезировали ингаляционным изофлураном. 200 мкл кроличьей сыворотки ретроорбитально переносили в каждую анестезированную мышшь. Через пять минут после переноса сыворотки в брюшную полость вводили 200 мкл бактерий M1 81955, и

мышам давали возможность восстановиться после введения изофлурана на обычном воздухе. Выживаемость мышей отслеживали в течение 1 недели, проверяя несколько раз в день.

Выживаемость мышей, которые прошли пассивную иммунизацию и были подвергнуты последующему заражению GAS, показана на фигуре 6А и фигуре 6В. Все группы, обработанные антигенами и антигенными конъюгатами (конъюгаты рAMF) SLO 1627, ADI-конъюгат Mut5 1809, SpyAD конъюгат 1644, C5a пептидаза 1630, SLO+C5a пептидаза, SLO+C5a+ADI-конъюгат и SLO+C5a+SpyAD-конъюгат, показали лучшую выживаемость по сравнению с преимуно иммунизированной когортой.

### **Пример 11. Антигены и конъюгаты GAS вызывают пассивные иммунные ответы, которые увеличивают выживаемость после заражения GAS**

Мышей пассивно иммунизировали до заражения путем подкожной инъекции.

**Таблица 7: Хронология эксперимента по пассивной иммунизации – подкожное заражение**

<b>Подкожное заражение - Стадии</b>
День -1: подготовка мышей
День 0: подготовка материалов, перенос сыворотки и заражение
День 3: сбор очагов поражения

*Подготовка мышей к заражению – подкожное заражение:* Мышей анестезировали изофлураном. Спины мышей выбривали электрической бритвой, стараясь не порезать кожу. Крем для депиляции волос наносили на выбритые спины и оставляли на несколько минут, прежде чем тщательно вытереть их влажными бумажными полотенцами. Мышей вытирали насухо и оставляли восстанавливаться после обработки изофлураном.

*Подготовка материалов, перенос сыворотки и заражение – подкожное заражение:* Штамм M1 89155 GAS выращивали до среднелогарифмической фазы роста. Концентрацию клеток регулировали стерильным фосфатно-солевым буфером, серийно разбавляя и высевая бактерии на агар для подтверждения бактериальной дозы. Для подкожного заражения целевое количество КОЕ на 10 мкл на мышью составляло  $1 \times 10^6$ , и бактерии набирали в шприцы Hamilton объемом 500 мкл, снабженные иглами

калибра 26 ½. Сыворотку кролика оттаивали и переносили на лед, а затем набирали в шприцы на 1 мл, снабженные иглами 30 калибра. Сыворотку кролика нагревали в шприцах до комнатной температуры, а мышей анестезировали ингаляционным изофлураном. Каждой анестезированной мыши ретроорбитально переносили 200 мкл кроличьей сыворотки. Через пять минут после переноса сыворотки 10 мкл бактерий M1 81955 вводили в выбритые спины мышей с помощью автоматического диспенсера, и мышам давали возможность восстановиться после изофлурана на обычном воздухе. Размеры поражений отслеживали ежедневно в течение 3 дней путем фотографирования мышей, анестезированных изофлураном, рядом с линейкой.

*Сбор очагов поражения для анализа бактериальной нагрузки.* Перед сбором очагов поражения на 3-й день готовили стерильные пробирки на 2 мл с завинчивающимися крышками с 1,0-миллиметровыми шариками диоксида кремния и 1 мл PBS для каждого очага поражения кожи. Вес каждой пробирки регистрировали. На 3-й день, когда поражения полностью развились, мышей подвергали эвтаназии с помощью CO<sub>2</sub> и смещения шейных позвонков. Используя чистые хирургические инструменты, каждый участок кожи вырезали и помещали в предварительно взвешенные пробирки. Вес пробирки регистрировали для расчета массы ткани. Пробирки помещали в гомогенизатор MagnaLyser и гомогенизировали при 6000 об/мин в течение 60 сек. Затем пробирки помещали на лед для охлаждения на 60 сек перед повторением цикла гомогенизации. Образцы серийно разводили, и лизат помещали на агар для количественного определения бактериальной нагрузки.

Данные о размере поражения и бактериальной нагрузке у мышей, которые прошли пассивную иммунизацию и подверглись подкожному заражению GAS, показаны на фигуре 7. Мыши (n=10, обработанные антигенами и антигенными конъюгатами ADI (SEQ ID NO: 36), ADI-конъюгатом (SEQ ID NO: 38), SLO (SEQ ID NO: 32), C5a пептидазой (SEQ ID NO: 30), sfb1 (SEQ ID NO: 28), SpyAD (SEQ ID NO: 33), SpyAD-конъюгатом (конъюгат pAMF-замещенной SEQ ID NO: 34) демонстрировали уменьшенный размер поражения через 48 часов по сравнению с когортой до иммунизации, и бактериальная нагрузка в большинстве групп была значительно ниже через 72 часа, при этом конъюгат SpyAD лучше всего снижал бактериальную нагрузку.

**Пример 12: Дизайн клинических испытаний фазы I и фазы IIА на людях**

Начальная фаза I клинических исследований будет представлять собой рандомизированное плацебо-контролируемое исследование с возрастающей дозой у здоровых взрослых людей в возрасте 18-29 лет (N=96) (таблица 3). Целями этого начального клинического исследования будет являться безопасность, зависимость доза-ответ и иммуногенность (антитело IgG). Поскольку многие люди в этом возрастном диапазоне ранее подвергались воздействию и имеют иммунитет к GAS, будет полностью оценен исходный иммунитет, чтобы понять влияние ранее существовавшего иммунитета на реакцию на вакцину. Будет оценен ответ IgG на каждый компонент вакцины и титр антител ОРК против разнообразной панели современных изолятов GAS различных серотипов M.

**Таблица 8: Группы клинического испытания фазы I**

<b>Дизайн клинического испытания фазы I</b>				
<b>Группа</b>	<b>N</b>	<b>Обработка</b>	<b>Доза</b>	<b>Расписание</b>
1A	24	GAS-вакцина	Низкая	День 0, 28
1B	8	Плацебо		День 0, 28
2A	24	GAS-вакцина	Средняя	День 0, 28
2B	8	Плацебо		День 0, 28
3A	24	GAS-вакцина	Высокая	День 0, 28
3B	8	Плацебо		День 0, 28

Клиническое исследование фазы 2A будет представлять собой рандомизированное, плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование для оценки вакцины в последовательных когортах лиц в возрасте от 10 до 17 лет, за которыми следуют дети в возрасте от 5 до 9 лет (N=96). (таблица 4). Целями этого исследования будут являться безопасность, иммуногенность (ответ IgG-антител и опсонофагоцитарная активность сыворотки) и оценка предварительной эффективности (частота фарингита, вызванного GAS). За каждым пациентом будет вестись наблюдение на протяжении 12 месяцев для определения частоты стрептококкового фарингита в группах лечения.

Таблица 9: Группы клинического исследования фазы IIА

Дизайн клинического исследования фазы IIА				
N	Возраст (лет)	Обработка	Доза	Расписание
36	10-17	GAS-вакцина	Определяется PI	День 0, 28
12	10-17	Плацебо		День 0, 28
36	5-9	GAS-вакцина	Средняя	День 0, 28
12	5-9	Плацебо		День 0, 28

**Пример 13. Конъюгаты GAS индуцируют образование антисыворотки, которая связывается с OPS *S. flexneri 2a* в эксперименте по перекрестной реактивности**

Были проведены эксперименты для оценки связывания антисывороток, продуцируемых очищенными конъюгатами GAS, с полисахаридом, называемым О-антигеном (OPS), *S. flexneri 2a*.

*Очистка OPS:* OPS собирали непосредственно из липополисахарида (LPS) в биомассе клеток *Shigella*, трансформированных плазмидой pSEC10-wzzB для сверхэкспрессии wzzB, что привело к увеличению длины цепи OPS и к кондиционированной ростовой среде ферментации (с добавлением аминокислот), или встряхивали культуры в колбах (STm D65), путем снижения pH культуры до 3,5-3,7 с помощью ледяной уксусной кислоты и инкубации при 100°C в течение 4 ч в стеклянных склянках, погруженных в кипящую водяную баню. Супернатанты после гидролиза отделяли от нерастворимого материала центрифугированием при 10k x g при 4°C в течение 30 минут с использованием GS3 Rotor в охлаждаемой центрифуге Sorvall RC5. Фракцию супернатанта доводили до 1M NaCl и фильтровали с помощью микрофльтрации с тангенциальным потоком через фильтр с полыми волокнами 0,2 мкм при трансмембранном давлении 4,5 psi (TMP), пропуская через него весь объем с последующей промывкой эквивалентным объемом 1M NaCl. Очищенный 0,2 мкм пермеат 1M NaCl затем концентрировали в 10 раз на мембране Hydrosart TFF 30 кДа при TMP 14 psi и подвергали диафльтрации против 35 диаобъемов 1M NaCl, а затем 10 диаобъемов 50 mM Tris, pH 7.

Фракцию ретентата в 20 mM Tris, pH 7, 50 mM NaCl затем пропускали через 3 x 3 мл анионообменные мембраны Sartobind NanoQ, соединенных последовательно, с

использованием АКТА Purifier со скоростью 10 мл/мин в 20 mM Tris, pH 7, 50 mM NaCl. Проточную фракцию доводили до 25% (об./об.) сульфата аммония и инкубировали в течение ночи при 4°C. Осажденный материал удаляли центрифугированием при 10k x g / 4°C в течение 30 минут с использованием ротора GS3 в охлаждаемой центрифуге Sorvall RC5 с последующей фильтрацией через вакуумный фильтр Stericup 0,45 мкм (Millipore, MA). Затем фильтраты концентрировали в 10 раз с помощью TFF на устройстве Slice 200 TFF с использованием мембраны Hydrosart 10 кДа при 7,5 psi TMP и подвергали диафильтрации против 10 диаобъемов деионизированной воды. Ретентаты TFF лиофилизировали и хранили при -20°C до использования.

*Иммунизация.* Вкратце, кроликов иммунизировали внутримышечно конъюгатами ADI-mut2, ADI-mut5 и SpyAD в соответствии с протоколами по примеру 6.

*ELISA сывороточного IgG:* Сыворотку собирали из каждого терминального отбора крови, и титры сывороточных IgG-антител против *S. flexneri 2a* OPS оценивали с помощью ELISA. Рабочий раствор антигена 2a OPS готовили следующим образом: 5,0 мкг/мл очищенного 2a OPS разводили в карбонатном покрывающем буфере, pH 9,6. Затем микротитровальные планшеты с «U» дном Immulon 2HB (Thermo Labsystems # 3655) покрывали путем внесения в каждую лунку планшета 100 мкл рабочего раствора. Затем планшеты инкубировали при 37°C в течение 3 ч. После этой инкубации планшеты шесть раз промывали PBS-Tween (0,05%) с двухминутным периодом смачивания между промывками. Затем планшеты блокировали в течение ночи при 4°C с помощью 1X PBS, содержащего 10% обезжиренного сухого молока (NFDM) в количестве 250 мкл/лунку. После блокировки планшеты снова промывали, как указано выше.

Исследуемые образцы (сыворотки кроликов) и контроли перед отбором крови разводили в PBS-Tween 10% NFDM и добавляли в планшеты. Образцы и контроли тестировали в двух повторностях в сериях разведений, выполняемых на каждом планшете. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C, а затем промывали PBS-Tween, как описано выше. Затем меченный пероксидазой хрена (HRP) антикроличий IgG (Invitrogen #65-6120) разбавляли до 1:2000 в 10% обезжиренном сухом молоке PBS-Tween (NFDM). Во все лунки добавляли по 100 мкл раствора соответствующего антитела и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты снова промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата TMB Microwell

Peroxidase Substrate (SeraCare #5120-0047). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте при перемешивании. Колориметрическую реакцию останавливали, добавляя во все лунки по 100 мкл 1М фосфорной кислоты. Значения поглощения при 450 нм немедленно измеряли с помощью микропланшетного ридера Multiskan FC™.

На фигуре 8 показан результат анализа на определение титра. Примечательно, что сыворотки, полученные из всех трех конъюгатов GAS, ADI-mut2 (конъюгаты рAMF-замещенной SEQ ID NO: 27), ADI-mut5 (конъюгаты рAMF-замещенной SEQ ID NO: 38) и SpyAD (конъюгаты рAMF-замещенной SEQ ID NO: 34), продемонстрировали примерно 60-кратное увеличение связывания с OPS *S. flexneri* 2a при разведении 1:10 по сравнению с контролем перед отбором крови.

#### **Пример 14. Конъюгаты GAS демонстрируют бактерицидную активность в отношении штаммов *S. flexneri* в бактерицидном анализе сыворотки (SBA)**

Были проведены эксперименты для определения способности иммунных сывороток кроликов, иммунизированных конъюгатом GAS, вызывать уничтожение нейтрофилами штаммов *S. flexneri*. Кроликов иммунизировали указанными конъюгатами в соответствии с протоколом, описанным в примере 7, перед проведением бактерицидного анализа. Вкратце, бактерицидный анализ сыворотки (SBA) и анализ цифровых изображений колоний выполняли в соответствии с ранее описанными способами ((Nahm, et al. mSphere, 2018, 2018 June 13;3(3), pii: e00146-18, и SBA Protocol, связанный с ними).

В таблице 9 показана бактерицидная способность сывороток, полученных в результате иммунизации конъюгатом SpyAD 1645 (конъюгатом рAMF-замещенной SEQ ID NO: 34) и мутантными конъюгатами ADI 1807, 1808, 1809 и 1810 (конъюгатами рAMF-замещенной SEQ ID NO: 38) против *S. flexneri* 2a, 3a и 6. Показанные значения представляют собой титры SBA (сывороточная бактерицидная активность), и все пять конъюгатов продемонстрировали бактерицидную активность по сравнению с преиммунным контролем. Гибели *S. sonnei* не наблюдалось, и поэтому титры в этой группе представлены как половина самого низкого протестированного разведения. PnQC19, контрольную сыворотку человека, использовали для нормализации титров Shigella SBA, как описано ранее (Nahm, et al. mSphere, 2018, 2018 June 13;3(3), pii: e00146-18). Показанные титры для *S. flexneri* 6 представляют собой средние исходные титры (2 эксперимента). Для *S. flexneri* 6 не установлено значение PnQC19.

**Таблица 10. Бактерицидная активность кроличьих антител к GAS в сыворотке крови**

<b>Конъюгат</b>	<i>S. flexneri 2a</i>	<i>S. flexneri 3a</i>	<i>S. flexneri 6</i>	<i>S. sonnei</i>
<b>Преиммунная сыворотка</b>	nd	nd	233	nd
<b>1645</b>	1301	1333	980	30
<b>1807</b>	384	2496	553	30
<b>1808</b>	671	703	394	30
<b>1809</b>	487	1325	1401	30
<b>1810</b>	1654	652	532	30
<b>PnQC19</b>	28000	19000	6915	1100

**Пример 15: Иммунизация SpyAD-GAC не вызывает определяемых уровней антител, перекрестно реагирующих с эпитопами сердца человека**

Различное количество лизата нормальной ткани сердца взрослого человека (Novus Biologicals, номер по каталогу NB820-59217) с SDS-содержащим денатурирующим красителем разделяли с помощью SDS-PAGE с использованием 4-12% Bis-Tris гелей перед переносом на мембрану PVDF с использованием протокола производителя на iBlot (Thermo Fisher). В заключение, блот блокировали при температуре окружающей среды в течение 1 ч с последующим зондированием кроличьей антисывороткой, полученной против каждого из антигенов GAS (разбавленной 1:1000). После трех 30-минутных промывок добавляли HRP-конъюгированное вторичное анти-кроличье антитело (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., номер по каталогу 211-035-109) (разбавленное 1:10000) и регистрировали хемилюминесценцию на сканере изображений Syngene G-Box F3 после инкубации блота с субстратом Pico (Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу 34580). Все блокирование блотов, промывки и разведения антител/сыворотки выполняли в TBS + 5% BSA.

Осуществляли вестерн-блот-анализ SLO, C5a пептидазы и кроличьей иммунной сыворотки SpyAD-GAC на нормальных лизатах сердца человека, разделенных электрофорезом в полиакриламидном геле. В качестве контроля служили антисыворотки против интактного M1-белка GAS с использованием того же протокола

иммунизации кроликов. Как показано на фигуре 11, в то время как анти-M1 антисыворотка реагировала с компонентами лизата с очень высокой молекулярной массой, не наблюдалось перекрестной реактивности с тканью сердца человека для SLO (SEQ ID NO: 8), C5a пептидазы (SEQ ID NO: 4) и SpyAD-GAC (конъюгат рAMF-замещенной SEQ ID NO: 12) антисыворотки, хотя они распознавали соответствующий родственный белок GAS (или белок-носитель в случае SpyAD-GAC). Этот анализ согласуется с (а) отсутствием гомологии последовательностей SLO, C5a пептидазы или SpyAD с белками человека, и (b) знанием того, что GAC состоит исключительно из повторяющейся рамнозы, сахара, отсутствующего у людей, после генетической делеции его боковой цепи GlcNAc, которая представляет обычный сахарный эпитоп млекопитающих.

**Пример 16. Усеченные пептиды SLO экспрессировали и оценивали на предмет их иммуногенности в кроличьих и мышинных моделях**

Усеченные варианты SLO экспрессировали, например, в соответствии с вышеуказанными способами. На фигуре 15 показано графическое представление 10 таких вариантных последовательностей ( $\Delta$ C11,  $\Delta$ C21,  $\Delta$ C31,  $\Delta$ C41,  $\Delta$ C51,  $\Delta$ C61,  $\Delta$ C71,  $\Delta$ C81,  $\Delta$ C91 и  $\Delta$ C101), соответствующих SEQ ID NO: 44 - SEQ ID NO: 53 (после TEV расщепления). На фигуре 16 показана экспрессия этих вариантов, как по общему, так и по растворимому белку с соответствующими гелями. Стоит отметить дифференциальные паттерны усечения, наблюдаемые для каждого варианта. Некоторые варианты, такие как  $\Delta$ C41 и  $\Delta$ C51, имеют несколько близко элюируемых полос около 50 кДа, тогда как варианты, такие как  $\Delta$ C31 или  $\Delta$ C81, не показывают каких-либо различимых полос, соответствующих их молекулярным массам.

На фигуре 17 показано сравнение экспрессии нескольких пептидов, включая усеченные варианты SLO, после первоначальной очистки с помощью хроматографии HisTrap. Варианты  $\Delta$ C91 и  $\Delta$ C101 экспрессировались в виде отдельных отчетливых полос, соответствующих правильной молекулярной массе белка, наряду с некоторыми более мелкими усеченными фрагментами. На фигурах 18 и 19 показано сравнение SLO и вариантов  $\Delta$ C91 и  $\Delta$ C101 во время стадий расщепления TEV и дополнительной очистки с помощью HisTrap (фигура 18) и эксклюзионной хроматографии (фигура 19).

*Получение сыворотки иммунизированного кролика:* Кроликов внутримышечно иммунизировали квасцами + 50 мкг SLO, SLO  $\Delta$ C91 или SLO  $\Delta$ C101 по протоколам, аналогичным описанным выше. У животных отбирали кровь и определяли титр ELISA

против каждого соответствующего антигена для сыворотки на дни 0, 7, 21 и 35. На фигуре 20 показан титр ELISA для каждого из трех вариантов SLO.

*Иммунизация поливалентной гликоконъюгированной вакциной обеспечивает значительную защиту от системного и внутрикожного заражения GAS:* Мышей CD-1 активно иммунизировали путем внутримышечных инъекций антигенов на дни 0, 14 и 28 для изучения вклада усиленного бактериального клиренса в сильную защитную эффективность состава SpyAD-GAC + SLO( $\Delta$ C101) + C5a пептидаза, состоящего из 3 компонентов/4 антигенов GAS. Мышинные сыворотки собирали у 9 иммунизированных (и 10 ложноиммунизированных) животных на 42-й день после заражения, и эффективность этих антисывороток тестировали в отношении стимуляции *ex vivo* ОРК-уничтожения M1 GAS свежевыделенными нейтрофилами человека (фигура 21). Когда GAS опсонизировали постиммунной мышью антисывороткой SpyAD-GACPR290 + SLO( $\Delta$ C101) + C5a пептидаза, ~20% исходного инокулята M1 GAS было извлечено после воздействия нейтрофилов, по сравнению с извлечением ~60% КОЕ в контрольных исследованиях в 292, GAS которых опсонизировали ложноиммунизированной мышью сывороткой (фигура 21,  $P < 0,01$ ). Кроме того, мышей, иммунизированных SpyAD-GACPR + SLO( $\Delta$ C101) + C5a пептидаза, или ложноиммунизированных (только PBS и адьювант) заражали путем внутрикожного инфицирования M1 GAS. Размер некротических поражений, генерированных результирующей острой воспалительной реакцией, существенно не различался между двумя группами (фигура 22A и 22B), но извлеченное количество бактериальных КОЕ/г было снижено более чем в два раза в удаленной омертвевшей ткани в участке инфекции в группе, иммунизированной SpyAD-GACPR + SLO( $\Delta$ C101) + C5a пептидаза (фигура 22C,  $P = 0,0012$ ).

*Анализ гемолиза эритроцитов для оценки присутствия функциональных антител против вариантов SLO:* Антисыворотки против усеченных вариантов SLO тестировали на их способность блокировать гемолитическую активность соответствующего SLO при добавлении к эритроцитам. На фигуре 23 показаны результаты при добавлении 0,1 мкг/мл рекомбинантного SLO в лунки с эритроцитами и антисыворотками. Полноразмерные антисыворотки SLO и SLO( $\Delta$ C101) блокировали лизис клеток, в то время как антисыворотки SLO( $\Delta$ C91) не блокировали лизис.

*Оценка вакцинных антисывороток в отношении опсонофагоцитарного уничтожения GAS и блокирования активности SLO:* Способность кроличьей антисыворотки, выработанной против вакцинных антигенов GAS (SLO, C5a пептидаза,

SpyAD и SpyAD-GAC), стимулировать опсонофагоцитарное уничтожение (ОПК) нейтрофилами человека оценивали с использованием штаммов GAS пяти различных серотипов М-белка (M1-M5). Этот анализ выполняли с 30-минутной предварительной опсонизацией соответствующей инактивированной нагреванием антисывороткой или контрольной преиммунной сывороткой, затем 30-минутным воздействием свежeweделенных нейтрофилов человека при множественности инфекции (MOI) = 0,1 бактерия на нейтрофил в присутствии 2% комплемента Baby Rabbit. Все антисыворотки индуцировали статистически значимое увеличение кратковременного ОПК GAS (фигура 24А). В анализе использовали в 100-1000 раз больше инокулята GAS, чем в опубликованных анализах ОПК, использующих клеточную линию промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 при MOI = 0,00140 или MOI = 0,000141, чтобы более точно резюмировать цель иммунизации, состоящую в поддержании первичной функции клеток врожденного иммунитета человека. Аналогично действовали антисыворотки против белка SpyAD и SpyAD-GAC. Более того, комбинированная антисыворотка, состоящая из одной трети каждой антисыворотки, выработанной против SLO, C5a пептидазы и SpyAD-GAC для поддержания постоянной общей концентрации сыворотки, показала такие же или лучшие результаты, чем отдельные компоненты, что указывает на отсутствие перекрестного 253 вмешательства в их ОПК функции. Поскольку SLO является секретлируемым цитотоксином, не прикрепленным к поверхности GAS, его вклад в усиленное уничтожение нейтрофилами происходит не за счет увеличения фагоцитарного поглощения, а скорее за счет уменьшения SLO-опосредованного повреждения мембраны и нарушения антимикробных функций нейтрофилов. Анти-SLO кроличья иммунная сыворотка, вызванная антигенами SLO или SLO( $\Delta$ C101), значительно ингибировала гемолитическую активность очищенного SLO против эритроцитов человека вплоть до разведения 1:2048 (фигура 24В). Кроме того, анти-SLO или анти-SLO( $\Delta$ C101) иммунная сыворотка в равной степени сохраняла функцию окислительного взрыва нейтрофилов (образование супероксида) против супрессии, опосредованной супернатантом GAS (SLO) (фигура 24С).

Дополнительные серотипы тестировали в анализе связывания IgG, проводимом аналогично описанным выше способам. Мышиные сыворотки собирали у 9 иммунизированных (и 10 ложноиммунизированных) животных на 42-й день после иммунизации тремя дозами (внутримышечные инъекции антигенов на дни 0, 14 и 28), и эффективность этих антисывороток тестировали на связывание IgG с живыми

штаммами GAS с помощью проточной цитометрии. Сыворотку собирали у самок мышей CD-1, которые были иммунизированы 3 дозами ложной антисывороткой или комбинацией SpyAD-GACP R + SLO( $\Delta$ C101) + C5a пептидаза. На фигурах 25A и 25B показана интенсивность флуоресценции мышинового IgG из ложной антисыворотки (светлые гистограммы) или мультивалентной комбинированной антисыворотки (темные гистограммы), связанного с поверхностными антигенами GAS нескольких серотипов, по данным количественного определения с помощью проточной цитометрии. Средние значения интенсивности флуоресценции суммированы на диаграммах рассеивания в столбцах, где каждая точка представляет сыворотку отдельной мыши (кружки обозначают ложно-обработанных мышей, а квадраты обозначают мышей из группы лечения). Метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* USA300 был добавлен в качестве контроля для демонстрации GAS-специфичности связывания IgG.

#### **Пример 17. Усеченные полипептиды SLO( $\Delta$ C101) с 3 или 4 ppAA экспрессировали и конъюгировали**

Усеченные варианты SLO( $\Delta$ C101), содержащие ppAA, экспрессировали, например, в соответствии с вышеуказанными способами. Варианты содержат 3 или 4 остатка pAMF, соответствующие SEQ ID NO: 55 - SEQ ID NO: 64. SEQ ID NO: 54 содержит все ppAA-содержащие остатки. На фигуре 26 показаны уровни экспрессии этих 10 вариантов, как по концентрации общего белка, так и по концентрации растворимого белка, с соответствующими гелями. Очистку проводили, как описано ранее. Вкратце, CFPS собирали, центрифугировали и фильтровали перед нанесением на предварительно уравновешенную колонку hisTRAP excel объемом 1 мл при 0,75 мл/мин и элюировали в одну стадию 250 мМ имидазолом в конечном объеме 6 мл. 5 мкл фракции каждой стадии анализировали с помощью SDS-PAGE. На фигуре 27A показаны гели вариантов после первоначальной очистки с помощью hisTRAP. Затем элюированные фракции hisTRAP разбавляли в 3 раза 50 мМ Tris, pH 8, для доведения конечной концентрации соли до 50 мМ NaCl перед нанесением на колонку AEX. Фракции FT и элюции анализировали с использованием анализа SDS-PAGE для обнаружения присутствия каждого из вариантов. На фигуре 27B показаны гели вариантов после второй стадии очистки. В таблице 11 показана конечная концентрация экспрессированных вариантов после извлечения из 2-2,5 мл раствора.

**Таблица 11: Окончательные концентрации вариантов после очистки**

Название белка	Концентрация (мг/мл)
SLO( $\Delta$ C101)-var1	0.8
SLO( $\Delta$ C101)-var2	1.0
SLO( $\Delta$ C101)-var3	0.6
SLO( $\Delta$ C101)-var4	1.0
SLO( $\Delta$ C101)-var5	1.2
SLO( $\Delta$ C101)-var6	2.7
SLO( $\Delta$ C101)-var7	2.3
SLO( $\Delta$ C101)-var8	1.0
SLO( $\Delta$ C101)-var9	2.2
SLO( $\Delta$ C101)-var10	1.6

Варианты SLO ( $\Delta$ C101) конъюгировали с DBCO-derivatизированным GAC, как описано выше. На фигуре 28 показаны конкретные условия конъюгирования для каждого варианта. Реакции конъюгирования анализировали с помощью SDS page, как показано на фигуре 29. На первой дорожке каждого геля показано предварительное конъюгирование белка. Окончательные размеры конъюгатов определяли методом SEC-MALS, результаты которого показаны на фигуре 30.

**Пример 18. Усеченные полипептиды SLO( $\Delta$ C101) с 3 или 4 ппАА оценивали на их иммуногенность в мышинных моделях и на их гемолитический титр**

Варианты 3- и 4-рAMF SLO( $\Delta$ C101) и их полисахаридные конъюгаты из примера 17 оценивали в мышинных моделях способами, описанными выше в примере 9. Мышей иммунизировали на дни 0, 7 и 14 с последующим терминальным отбором крови на 21 день после умерщвления.

Для иммунизации мышей использовали 5 мкг каждого из полисахаридных конъюгатов рAMF-замещенного SLO( $\Delta$ C101)-var1, SLO( $\Delta$ C101)-var5, SLO( $\Delta$ C101)-var6 и SLO( $\Delta$ C101)-var10 из примера 17 (соответствуют SEQ ID NO: 55, 59, 60 и 64). На фигуре 31А показаны титры антител против SLO( $\Delta$ C101), измеренные после терминального отбора крови. Те же самые варианты и их GAC-конъюгаты также оценивали в анализе гемолиза в соответствии с протоколами из примера 16. Результаты

показаны на фигуре 31В. На фигуре 31С также показаны титры антител, измеренные после терминального отбора крови, однако в этом ELISA в качестве покрывающего антигена использовали длинный полисахарид (полученный с помощью способов из примера 19), а не SLO( $\Delta$ C101). В совокупности эти данные показывают, что конъюгаты рAMF-замещенных вариантов SLO( $\Delta$ C101)-var1, SLO( $\Delta$ C101)-var5, SLO( $\Delta$ C101)-var6 и SLO( $\Delta$ C101)-var10 индивидуально продуцируют антитела как против PS, так и против пептидных компонентов.

### **Пример 19: Экспрессия, очистка и конъюгирование высокомолекулярных (длинных) полисахаридов**

Проводили эксперименты по экстракции и очистке полисахаридов GAS из бактериальных культур GAS.

*Щелочной гидролиз:* Приготовленный клеточный осадок GAS ресуспендировали в 50 мМ растворе NaCl. С помощью серологической пипетки добавляли 50 мл NaCl и встряхивали для ресуспендирования. Добавляли 10N гидроксид натрия и 1M боргидрид натрия для достижения конечной концентрации 4N NaOH и 25 мМ NaBH<sub>4</sub>. Ресуспендированный клеточный осадок распределяли по центрифужным колбам с конечным целевым объемом 160 мл на 1 л объема ферментации. При распределении раствора использовали постоянное завихрение для обеспечения однородности. Колбы помещали на шейкер в предварительно прогретый инкубатор при 65°C на 2 часа. После инкубации раствор для гидролиза центрифугировали в течение 30 минут при 14000 g при 25°C для осаждения любого клеточного дебриса, убедившись, что образец гидролиза остыл до комнатной температуры перед центрифугированием. Надосадочную жидкость собирали после прекращения центрифугирования, чтобы не повредить осадок, и надосадочную жидкость нейтрализовали до pH 6,5 ± 0,3. При нейтрализации колбу помещали на баню со льдом при 4°C, используя 37% HCl для регулирования pH, а при необходимости для дальнейшего регулирования использовали 1M NaOH. Затем образец инкубировали при 4°C в течение ночи.

*Фильтрация:* После инкубации происходило образование белого осадка. Раствор центрифугировали в течение 30 мин при 10000×g. Происходило образование объемного белого клеточного осадка, содержащего белки клетки-хозяина (HCP). Прозрачный супернатант собирали. Значение pH регулировали до 3,0, используя 37% HCl, и раствор инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Образец фильтровали, используя фильтр Clarisolve Filter  $\mu$ Pod-40MS. Например: при скорости потока насоса 23 мл/мин вода промывалась через фильтр до заполнения, а затем клапан

открывался и промывался объемом 120 мл и уравнивался с помощью 15 mM NaCl до объема 120 мл. Экстракт пропускали через фильтр при той же скорости потока насоса 23 мл/мин и собирали прозрачный пермеат, выходящий из фильтра. Фильтр промывали 60 мл 15 mM NaCl и промывали трубки и содержимое фильтра. Фильтр выбрасывали. Значение pH образца повторно регулировали до  $6,5 \pm 0,3$ . Затем проводили тангенциальную проточную фильтрацию (TFF-10k) для удаления солей, концентрировали (ультрафильтровали), затем заменяли буфер (диафильтровали) в 10 mM NaCl.

*Обработка мутанолизином.* Раствор для обработки мутанолизином готовили путем добавления 1M MgCl<sub>2</sub> до достижения конечной концентрации 1 mM MgCl<sub>2</sub> и 200 mM фосфата натрия (10x) для достижения конечной концентрации 20 mM фосфата натрия при pH 6,8. Раствор мутанолизина (5000 ME/мл) до достижения 120 ME/мл. Образец инкубировали при 37°C в течение ночи при встряхивании.

*Обработка протеиназой-К.* Затем образец обрабатывали протеиназой-К путем добавления раствора протеиназы-К до достижения конечной концентрации 40 ME/мл (протеиназа-К при 45 ед/мг). Смесь инкубировали при 50°C в течение ночи при осторожном перемешивании.

*Осаждение и фильтрация.* Для осаждения ферментов, нуклеиновых кислот и НСР в образце добавляли СТАВ в 20 mM фосфатно-натриевом буфере при pH 6,8 и встряхивали в течение 1 часа при 30°C. Все используемые растворы предварительно нагревали: образец PS, исходный 5% раствор СТАВ и 200 mM раствор фосфата натрия, pH 6,8. Раствор PS перемешивали (магнитная мешалка) при нагревании, а в нагретую мешалку устанавливали внутренний термометр для постоянного контроля температуры в растворе. К раствору PS добавляли 200 mM раствор фосфата натрия (pH 6,8) для получения конечной концентрации 20 mM фосфата натрия. К раствору PS добавляли 5% СТАВ до достижения концентрации СТАВ 1%. Раствор оставляли перемешиваться в течение 1 часа. С помощью фильтра 40MS проводили глубинную фильтрацию осаждаемого раствора. Например, систему промывали 200 мл MilliQ H<sub>2</sub>O при скорости потока насоса 23 мл/мин, и как только вода начала выходить из вентиляционного отверстия, его закрывали, заставляя раствор вытекать из выпускного отверстия (заполнение). Затем систему промывали 75 мл раствора 20 mM фосфата натрия (pH 6,8) и 15 mM NaCl. Образец фильтровали со скоростью 23 мл/мин и промывали 60 мл 20 mM фосфата натрия (pH 6,8) и 15 mM раствора NaCl со скоростью 20 мл/мин. Пермеат

собирали до тех пор, пока не будут элюированы пузырьки воздуха. Фильтр выбрасывали.

Раствор PS и 274 мМ KI нагревали до 30°C. К перемешиваемому раствору PS добавляли 274 мМ KI в количестве, достаточном для достижения конечной концентрации 27,4 мМ KI. Смесь инкубировали при 30°C при перемешивании в течение 1 часа. Раствор центрифугировали после инкубации при 30°C, 10000×g в течение 30 минут. Супернатант собирали, и клеточный осадок отбрасывали, соблюдая осторожность, так как клеточный осадок легко распадается. Затем супернатант фильтровали в вакууме через фильтр 0,45 мкм.

Образец сначала концентрировали с помощью TFF-10k, затем подвергали диафильтрации с 9 DV 350 мМ NaCl и, наконец, 2 DV с MilliQ водой. Например, объем системы TFF составляет около 35 мл, скорость насоса установлена на 200 мл/мин, а диафильтрация проводится с 9 DV (50 мл) буфера TMP: 7-8 psi.

Затем раствор полисахарида очищали хроматографией гидрофобного взаимодействия с использованием HiPrep™ Butyl Fast Flow 16/10, предварительно уравновешенного 3М хлоридом натрия и 50 мМ фосфатом натрия, pH 6,8. К раствору полисахарида добавляли хлорид натрия и фосфатный буфер для достижения 3М хлорида натрия и 50 мМ фосфата калия (pH 6,8). Раствор полисахарида пропускали через HIC-смола и работали в проточном режиме. Смола промывали тем же уравновешивающим буфером, и как элюат, так и промывку собирали для дальнейшей обработки.

Окончательную TFF 10 кДа/ 3 кДа проводили для удаления высокого содержания NaCl в образце PS путем диафильтрации против 9DV 15 мМ NaCl или WFI. Очищенный раствор PS затем фильтровали через фильтр 0,22 мкм.

На фигуре 36А, фигуре 36В и фигуре 36С показан ЯМР-анализ очищенного полисахарида, полученного в примере 1 синтеза, происходящего из бактериального штамма GAS, экспрессирующего PS, лишенный GlcNAc (см. PCT/US2012/049604). ЯМР подтверждает присутствие полирамнозы и отсутствие GlcNAc. Для подготовки образца раствор очищенного полисахарида лиофилизировали и заменяли на D<sub>2</sub>O с добавлением TSP в качестве внутреннего стандарта. Спектр протонного ЯМР получали при 50°C на приборе с частотой 400 МГц с усреднением сигнала по 40 сканированиям. Использованное уширение спектральной линии составляло 0,2 Гц. Протокол очистки также позволил получить очищенный полисахарид, свободный от М-белка, о чем свидетельствует вестерн-блоттинг на фигуре 37.

*Дериватизация и конъюгация длинных полисахаридов:* Высокомолекулярные (длинные) полисахариды дериватизировали DBCO-PEG, как описано ранее в приведенных выше способах (пример 4). DBCO-дериватизированный PS затем конъюгировали с белками-носителями, описанными в настоящем документе, в соответствии со способами в примере 4. Например, SpyAD[4pAMF] (SEQ ID NO: 34) конъюгировали с длинным полисахаридом и анализировали через 3,5 часа и после диализа. На фигуре 32 показан анализ этих конъюгатов методом SEC-MALS. Через 3,5 часа наблюдались конъюгаты более 1 МДа. После диализа распределение выделенного конъюгата по размерам показало пик приблизительно 186 кДа.

**Пример 20. Усеченные полипептиды SLO( $\Delta$ C101) с 5, 6, 7 или 8 ппАА экспрессировали, очищали и конъюгировали**

Усеченные варианты SLO( $\Delta$ C101), содержащие ппАА, экспрессировали, например, в соответствии с вышеуказанными способами. Варианты содержат 5, 6, 7 или 8 остатков pAMF, соответствующих SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76. На фигуре 33А показаны уровни экспрессии этих 12 вариантов pAMF (5pAMF-8pAMF), а также вариантов из примера 17, как по концентрации общего, так и растворимого белка. На фигуре 33В показаны соответствующие гели для экспрессии (SEQ ID NO: 65-76 соответствуют var1-var12). Очистку проводили, как описано ранее. Вкратце, CFPS собирали, центрифугировали и фильтровали перед нанесением на предварительно уравновешенную колонку hisTRAP Excel объемом 1 мл при 0,75 мл/мин, и элюировали в одну стадию 250 мМ имидазолом в конечном объеме 6 мл. 5 мкл фракции каждой стадии анализировали с использованием окрашивания реагентом Safe Blue геля SDS-PAGE. После этого элюированные фракции разбавляли в 3 раза, наносили на колонку CaptoQ для окончательной очистки, и анализировали путем окрашивания Safe Blue и мечения DBCO TAMRA. Фракции FT концентрировали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в аликвотах по 200 мкл.

*Конъюгация полипептидов SLO( $\Delta$ C101) с 5, 6, 7 или 8 ппАА:* Полипептиды, содержащие 5, 6, 7 или 8 ппАА, конъюгировали с полисахаридами GAS с использованием способов, описанных выше, в том числе в примере 4. Таким образом, pAMF-содержащие варианты SLO ( $\Delta$ C101) SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69 были конъюгированы с длинным DBCO-дериватизированным

GAC. Реакции конъюгации анализировали с помощью SDS page, как показано на фигуре 34. Первая дорожка для каждого варианта показывает преконъюгацию белка. Окончательные размеры конъюгатов определяли методом SEC-MALS, результаты которого показаны на фигуре 35.

Описание идентификатора последовательности

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
1	C5a [фрагмент 90-1035] WT без лидера	MHHHHHHSNGENLYFQGKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLOE KAGKGAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAK KEHGITYGEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGN APSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRD AVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTS AGNDSSFGGKTRLPLADHPDYGVVGTAAAADSTLTVASYSYSPDKQ LTETATVKTADKQDKEMPVLSNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDD FKDVKGKIALIERGDIDFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFP IELPNVDQMPAAAFISRKDGLLLKDNPKKTIITFNATPKVLPATASG TKLSRFSSWGLTADGNIKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTS MSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPDMPSERLDLAKKVLMSATAL YDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKDNTSSKVHLN NVSDTFEVTVTVHNKSDKPQELYQATVQTDKVDGKHFALAPKA LYETSWQKITIPANSSKQVTVPIDASRFKDLLAQMKNGYFLEG FVRFKQDPTKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSY YHEANSDAKDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKE GVENIEDIESSEITETIFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAA ISPNGDGNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLKKEGNVVTSEVTE QVVKNYNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVR YTPISSGAKEQHTDFDVIDNNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASK PKTSQPVYRERIAAYTYMDEDLPTTEYISPNEEDGTFTLPEEAETM EGATVPLKMSDFTYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
2	C5a [фрагмент 90-1035] WT без лидера	KTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGTVVAVIDAGF DKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKWAY YHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPE AQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAA LAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFGGKTRLPLAD HPDYGVVGTAAAADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKEM PVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDID FKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAAFISRK DGLLLKDNPKKTIITFNATPKVLPASGKLSRFSWGLTADGNI KPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQY ETQYPMTPSERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQQGAG AVDAKKASAATMYVTDKDNNTSSKVHLNNSDTEFVTVTVHNKSD KPQELYYYQATVQTDKVDGKHFALAPKALYETSWQKITIPANSSK QVTVPIDASRFSKDLAQMKNQYFLEGFVRFKQDPTKEELMSIP YIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDGL QFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITETI FAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGT FLRNAKNLVAEVLKKEGNVVTSEVTEQVVKNYNNDLASTLGST RFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDV IVDNTPPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPVYRERIAAYTYM DEDLPTTEYISPNEGDTFTLPPEEAETMEGATVPLKMSDFTYVVE DMAGNITYTPVTKLLEGHSNK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
3	C5a [фрагмент 90-1035] D131A/S513A без лидера	MHHHHHHGSGENLYFQGKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQE KAGKGAGTVVAVIAAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAK KEHGITYGEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGN APSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRD AVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTS AGNDSSFGGKTRLPLADHPDYGVVGTAAAADSTLTVASYSYSPDKQ LTETATVKTADKQDKEMPVLS TNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDD FKDVKGKIALIERGDIDFKDKIANAKKAGAVGVLIIYDNQDKGFP IELPNVDQMPAAFI SRKDGLLLKDNPKKTIITFNATPKVLPTASG TKLSRFSSWGLTADGNIKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTA MSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPMTPSERLDLAKKVLMS SATAL YDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKDNTSSKVHLN NVSDTFEVTVTVHNKSDKPQELYQATVQTDKVDGKHFALAPKA LYETSWQKITIPANSSKQVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEG FVRFKQDPTKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSY YHEANSDAKDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKE GVENIEDIESSEITETIFAGTFAKQDDDSHYYIHRHANGKPYAA ISPNGDGNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLKKEGNVVTSEVTE QVVKNYNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVR YTPISSGAKEQHTDFDVIDNNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASK PKTSQPVYRERIAAYTYMDEDLPTTEYISPNEGDGFTLPEEAETM EGATVPLKMSDFTYVVEDMAGNIITYTPVTKLLEGHSNK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
4	C5a [фрагмент 90-1035] D131A/S513A без лидера	KTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGTVVAVIAAGF DKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKWAY YHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPE AQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAA LAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFGGKTRLPLAD HPDYGVVGTAAAADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKEM PVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDID FKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAAFISRK DGLLLKDNPKKTIITFNATPKVLPASGKLSRFSSWGLTADGNI KPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTAMSAPLVAGIMGLLQKQY ETQYPMTPSERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQQGAG AVDAKKASAATMYVTDKDNNTSSKVHLNNVSDTFEVTVTVHNKSD KPQELYYYQATVQTDKVDGKHFALAPKALYETSWQKITIPANSSK QVTVPIDASRFSKDLAQMKNQYFLEGFVRFKQDPTKEELMSIP YIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDGL QFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITETI FAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGT FLRNAKNLVAEVLKDKGNVVTSEVTEQVVKNYNNDLASTLGST RFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDV IVDNTPPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPVYRERIAAYTYM DEDLPTTEYISPNEGDTFTLPPEEAETMEGATVPLKMSDFTYVVE DMAGNITYTPVTKLLEGHSENK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
5	SLO [фрагмент 79-571] WT без His tag и TEV последовательности	MHHHHHHGSGENLYFQGAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDH TEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVI ERKKKNINTTPVDISIIIDSVTDRTYPAALQLANKGF TENKPD AV VTKRNPQKIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWH DNYSGGNTL PARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGID FKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPN NPADVFDKSVTFKEL QRKGVSN EAPPLFVSNVAYGR TVFVKLETSSKSN DVEAAFS AAL KGT DVKTNGKYSDILENSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIR NVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTS TEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDN NWYSKTS PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAWEWWRKVIDER DVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK
6	SLO [фрагмент 79-571] WT без лидера	APKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNELE VLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISII DSVTDRTYPAALQLANKGF TENKPD AVVTKRNPQKIHIDLPGMG DKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTL PARTQYTE SMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYK QIFYTVSANLPN NPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSNV AYGR TVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGT DVKTNGKYSDILEN SSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYP ISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTS TEYTS GKINLSHQGAYV AQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDN NWYSKTS PFSTVIPLGA NSRNIRIMARECTGLAWEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTL SPYGSITYK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
7	SLO [фрагмент 79-571] W535A без лидера	MHHHHHHGSGENLYFQGAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDH TEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVI ERKKKNINTTPVDISIIIDSVTDRTYPAALQLANKGF TENKPD AV VTKRNPQKIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVST AIDNLVNQWH DNYSGGNTL PARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGID FKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKEL QRKGVSN EAPPLFVSNVAYGR TVFVKLETSSKSN DVEAAFS AAL KGT DVKTNGKYSDILENSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIR NVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTS TEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDN NWYSKTS PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAAEWWRKVIDER DVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK
8	SLO [фрагмент 79-571] W535A без лидера	APKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNELE VLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISII DSVTDRTYPAALQLANKGF TENKPD AVVTKRNPQKIHIDLPGMG DKATVEVNDPTYANVST AIDNLVNQWHDNYSGGNTL PARTQYTE SMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYK QIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSNV AYGR TVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGT DVKTNGKYSDILEN SSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYP ISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTS TEYTS GKINLSHQGAYV AQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDN NWYSKTS PFSTVIPLGA NSRNIRIMARECTGLAAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTL SPYGSITYK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
9	SpyAD [фрагмент 33-849] WT без лидера	MHHHHHHGSGENLYFQGQVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPET IQEAKATIDAVEKTLSSQQAELTELATALTKTTAEINHLKEQQD NEQKALTSAQEIYTNTLASSEETLLAQGAEHQRELTATETELHN AQADQHSKETALSEQKASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLN AMISNPDAITKAAQTANDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQ LTEELAAQKAALAEKEAELSRKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQG YPLEELKKLEASGYIGSASYNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQY QDIPADRNRFVDPDNLTPVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPV TVTAGSQEFARLLSTSYKKTHGNTRPSFVYQPGVSGHYGVGPH DKTIIEDSAGASGLIRNDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDS IKYMLFTDHLHGNTYGHAINFLRVDKHNPNAPVYLGFTSNVGS LNEHFVMFPESNIANHQRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTI AAIKGKVSSLENRLSAIHQEADIMAAQAKVSQLOGKLASTLKQS DSLNLQVRQLNDTKGSLRTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLAS LKAALHQTEALAEQAAARVTALVAKKAHLQYLRDFKLNPNRLQV IRERIDNTKQDLAKTTSSLLNAQEALAAALQAKQSSLEATIATTE HQLTLLKTLANEKEYRHLDEDIATVPDLQVAPPLTGVKPLSYSK IDTTPLVQEMVKETKQLLEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMV ASNAIVSKITSSITQPSSKTSYSGSGSSTSNLISDVDESTQR

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
10	SpyAD [фрагмент 33-849] WT без лидера	QVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPETIQEAKATIDAVEKTLISQ QKAELTELATALTKTTAEINHLKEQQDNEQKAL TSAQEIYTNTL ASSEETLLAQGAEHQRELTATE TELHNAQADQHSKETALSEQKA SISAETTRAQDLVEQVKTSEQNI AKLNAMISNPDAITKAAQTAN DNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEKEA ELSR LKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELKKLEASGYIGS ASYN NYK EHADQIIAKASPGNQLN QYQDIPADRNR FVDPDNL T PEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTSY KKTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIRN DDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYGH AINFLRVDKHNP NAPVYLG FSTSNVGS LNEHFVMFPESNI ANHQ RFNKTP IKA VGSTKD YAQRVGT VSDTIAAIK GKVSSLENRLSAI HQEADIMAAQAKVSQ LQGKLASTLKQSDSLNLQVRQLNDTKGSL RTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAAA RVTALVAKKAHLQYLRDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTTS SLLNAQEALALQAKQSSLEAT IATTEHQ L TLLKTLANEKEYRH LDEDIATVPDLQVAPPLTGVKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETKQL LEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMVASNAIVSKITSSITQPS SKTSYSGSGSSTTSNLI SDVDESTQR

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
11	<p>SpyAD [фрагмент 33-849] mAA (напр., pAMF) мутант без лидера</p> <p>X = mAA (напр., pAMF) положения K64/K287/K386/K657 – пронумерованы в соответствии с полноразмерной последовательностью</p>	<p>MHHHHHHGSGENLYFQGQVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPET  IQEA<u>X</u>ATIDAVEKTLSSQQAELTELATALTKTTAEINHLKEQQD  NEQKALTSAQEIYTNTLASSEETLLAQGAEHQRELTATETELHN  AQADQHSKETALSEQKASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLN  AMISNPDAITKAAQTANDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQ  LTEELAAQKAALAEKEAELSRKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQG  YPLEELK<u>X</u>LEASGYIGSASYNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQY  QDIPADRNRVDPDNLTPREVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPV  TVTAGSQEFARLLSTS<u>X</u>THGNTRPSFVYGPVSGHYGVGPH  DKTIIEDSAGASGLIRNDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDS  IKYMLFTDHLHGNTYGHAINFLRVDKHNPNAPVYLGFTSNVGS  LNEHFVMFPESNIANHQRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTI  AAIKGKVSSLENRLSAIHQEADIMAAQAKVSQLOGKLASTLKQS  DSLNLQVRQLNDTKGSLRTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLAS  LKAALHQTEALAEQAAARVTALVAK<u>X</u>AHLQYLRDFKLNPNRLQV  IRERIDNTKQDLAKTTSSLLNAQEALAAALQAKQSSLEATIATTE  HQLTLLKTLANEKEYRHLDEDIATVPDLQVAPPLTGVKPLSYSK  IDTTPLVQEMVKETKQLLEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMV  ASNAIVSKITSSITQPSSKTSYGGSSSTSNLISDVDESTQR</p>

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
12	SpyAD [фрагмент 33-849] mAA (напр., pAMF) мутант без лидера  X = mAA (напр., pAMF) K64/K287/K386/K657 –  пронумеровано в соответствии с полноразмерной последовательностью	QVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPETIQEAXATIDAVEKTLISQ QKAELTELATALTKTTAEINHLKEQQDNEQKAL TSAQEIYTNTL ASSEETLLAQGAEHQRELTATE TELHNAQADQHSKETALSEQKA SISAETTRAQDLVEQVKTSEQNI AKLNAMISNPDAITKAAQTAN DNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEKEA ELSRLKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELKXLEASGYIGS ASYNNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADRNR FVDPDNL T PEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTSY KXTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIRN DDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYGH AINFLRVDKHNP NAPVYLG FSTSNVGS LNEHFVMFPESNI ANHQ RFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTIAAIKGVSSLENRLSAI HQEADIMAAQAKVSQ LQGKLASTLKQSDSLNLQVRQLNDTKGSL RTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAAA RVTALVAKX <sup>u</sup> AHLQYL RDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTTS SLLNAQEALALQAKQSSLEAT IATTEHQ LTLKTLANEKEYRH LDEDIATVPDLQVAPPLTG VKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETKQL LEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMVASNAIVSKITSSITQPS SKTSYSGSGSSTTSNLI SDVDESTQR
13	ADI [полной длины] WT без лидера	MHHHHHHGSGENLYFQGT AQTP IHVYSEIGKLK KVL LHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPF AIDMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGKYIFTTHPIYGG GKVPMVYDRNETTRIEGGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKF MHLDTVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEKGD LAELLAANLGVEKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESK GLKLIKIHGSELVGRGGPRC MSMPFEREDI

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
14	ADI [полной длины] WT без лидера	TAQTPIHVYSEIGKLLKVVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDIP FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAFI DEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSEL PEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVSL NHMFSETRNRETLYGKYIFTHHP IYGGGKVPVMVYDRNETTRIEG GDELVLSKDVAVG I SQRTDAASIEKLLVNI FKQNLGFKKVLAF EFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNEE LHIVEEKGD LAELLAANLGV EKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDG SNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAI LESKGLKLIKIHGSELVRGRG GPRCMSMPFEREDI
15	ADI [полной длины] D277A без лидера	MHHHHHHGSGENLYFQGT AQTP IHVYSEIGKLLKVVLLHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDIP FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHP IYGG GKVPVMVYDRNETTRIEGGDELVLSKDVAVG I SQRTDAASIEKL LVNI FKQNLGFKKVLAF EFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIH PEIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEKGD LAELLAANLGV EKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAI LESK GLKLIKIHGSELVRGRGGPRCMSMPFEREDI
16	ADI [полной длины] D277A без лидера	TAQTPIHVYSEIGKLLKVVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDIP FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAFI DEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSEL PEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVSL NHMFSETRNRETLYGKYIFTHHP IYGGGKVPVMVYDRNETTRIEG GDELVLSKDVAVG I SQRTDAASIEKLLVNI FKQNLGFKKVLAF EFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNEE LHIVEEKGD LAELLAANLGV EKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDG SNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAI LESKGLKLIKIHGSELVRGRG GPRCMSMPFEREDI

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
17	ADI [полной длины] nnAA (напр., pAMF) без лидера  X = nnAA (напр., pAMF) положения – K15, K193, K316	MHHHHHHGSGENLYFQGTAQTP IHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGXYIFTTHPIYGG GKVPMVYDRNETTRIEGGDELVLSKDVAVGISQRTDAASIEKL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEXGDLAELLAANLGVKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESK GLKLIKIHGSELVVRGRGGPRCMSMPFEREDI
18	ADI [полной длины] nnAA (напр., pAMF) мутант без лидера  X = nnAA (напр., pAMF) положения – K15, K193, K316	TAQTP IHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PF FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAFI DEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSEL PEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVSL NHMFSETRNRETLYGXYIFTTHPIYGGGKVPMVYDRNETTRIEG GDELVLSKDVAVGISQRTDAASIEKLLVNIFKQNLGFKKVLAF EFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEE LHIVEEXGDLAELLAANLGVKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDG SNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESKGLKLIKIHGSELVVRGRG GPRCMSMPFEREDI
19	ADI (mut5) [полной длины] D277A nnAA (напр., pAMF) без лидера  X = nnAA (напр., pAMF) положения – K15, K193, K316	MHHHHHHGSGENLYFQGTAQTP IHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGXYIFTTHPIYGG GKVPMVYDRNETTRIEGGDELVLSKDVAVGISQRTDAASIEKL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEXGDLAELLAANLGVKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESK GLKLIKIHGSELVVRGRGGPRCMSMPFEREDI

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
20	ADI (mut5) [полной длины] D277A mAA (напр., pAMF) без лидера  X = mAA (напр., pAMF) положения – K15, K193, K316	TAQTPIHVYSEIGXLKVKLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDIP FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAFI DEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSEL PEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVSL NHMFSETRNRETLYGXYIFTHHP IYGGGKVP MVYDRNETTRIEG GDELVLSKDVLA VGISQRTDAASIEKLLVNI FKQNLGFKKVLAF EFANNRKFMHLATVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNEE LHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDG SNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELVRGRG GPRCMSMPFEREDI
21	hFL [полной длины] WT без лидера	MHHHHHHGSGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLG FYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALF QDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTD PHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLF ERLTLKHD
22	hFL [полной длины] WT без лидера	SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVAL EGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDE WGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETH FLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
23	hFL [полной длины] mAA (напр., pAMF) без лидера  X = mAA (напр., pAMF) position – I5	MHHHHHHGSGSSQXRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLG FYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALF QDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTD PHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLF ERLTLKHD

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
24	hFL [полной длины] nnAA (напр., pAMF) без лидера  X = nnAA (напр., pAMF) положение – I5	SSQ <u>X</u> RQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVAL EGVSHFFRELAAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDE WGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETH FLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
25	eCRM-pAMF6 мутант	MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQ <u>X</u> GIQPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPG LTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGA SRVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQ DAMYEYMAQACAGNRVRNSVGSLSLSCINLDWDVIRD <u>X</u> TKTKIES LKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPELSEL <u>X</u> TVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSIL PGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELV DIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGH <u>X</u> TQPFLHDGYA VSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPG KLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNV HANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNS <u>X</u> L SLFFEIKS
26	ADI (mut2) [полной длины] D277A nnAA (напр., pAMF) без лидера  X = nnAA (напр., pAMF) положения – K123, K247, K316	MHHHHHHGSGENLYFQGTATQTP IHVYSEIGKLLKVL LHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEXTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPYGG GKVPMVYDRNETTRIEGGDELVLSKDVLA VGISQRTDAASIEXL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKFMLLATVFTMVVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEXGDLAELLAANLGVKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESK GLKLIKIHGSELVRGRGGPRC MSPFEREDI

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
27	ADI (mut2) [полной длины] D277A mAA (напр., pAMF) без лидера, с G выступом в результате расщепления  X = mAA (напр., pAMF) положения – K123, K247, K316	GTAQTPPIHVYSEIGKLLKVLHHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEXTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPITYGGKVPVYDRNETTRIE GGDELVLSKDVLAVGISQRTDAASIEXMLLVNIFKQNLGFKKVL FEFANNRKFHMLATVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIRCGDNLVAAGREQWND GSNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILESGLKLIKIHGSELVRGR GGPRCMSMPFEREDI
28	Sfb1 повторяющаяся область с лидером	MHHHHHGGSGVETEDTKEPGVLMGGQSESVEFTKDTQTGMSGQT TPQVETEDTKEPGVLMGGQSESVEFTKDTQTGMSGQTASQVETE DTKEPGVLMGGQSESVEFTKDTQTGMSGQTTTPQVETEDTKEPGV LMGGQSESVEFTKDTQTGMSGFSET

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
29	C5a [фрагмент 90-1035] WT без лидера, с G выступом в результате расщепления	GKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGTVVAVIDAG FDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVA YYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMP EAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDVNLGAKVINMSFGNA ALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFGGKTRLPLA DHPDYGVVGTAAAADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKE MPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDI DFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAFISR KDGLLLKDNPKKTIITFNATPKVLPPTASGTKLSRFSSWGLTADGN IKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQ YETQYPDMTPSERLDLAKKVLMS SATALYDEDEKAYFSPRQQGA GAVDAKKASAATMYVTDKDNTSSKVHLNNSDTFEVTVTVHNKS DKPQELYQATVQTDKVDGKHFALAPKALYETSWQKITIPANSS KQVTVPIDASRFSKDLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPTKEELMSI PYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDG LQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITET IFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQG TFLRNAKNLVAEVL DKEGNVVTSEVTEQVVKNYNNDLASTLGS TRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFD VIVDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPVYRERIAITY MDEDLPTTEYISPNEGTFTLPEEAETMEGATVPLKMSDFTYV EDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
30	C5a [фрагмент 90-1035] D131A/S513A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGTVVAVIAAG FDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVA YYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMP EAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNA ALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFGGKTRLPLA DHPDYGVVGTAAAADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKE MPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDI DFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAFISR KDGLLLKDNPKKTIITFNATPKVLPPTASGTKLSRFSSWGLTADGN IKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTAMSAPLVAGIMGLLQKQ YETQYPDMTPSERLDLAKKVLMS SATALYDEDEKAYFSPRQQGA GAVDAKKASAATMYVTDKDN TSSKVHLN NVSDT FEVTVTVHNKS DKPQELY YQATVQTDKVDGKH FALAPKALYETSWQKITIPANSS KQVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPTKEELMSI PYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANS DAKDQLDGDG LQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITET IFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQG TFLRNAKNLVAEVL DKEGNV VWTSEVTEQVVKNYNNDLASTLGS TRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFD VIVDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPVYRERIAITY MDEDLPTTEYISPNE DGTFTLPEEAETMEGATVPLKMSDFTYV EDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
31	SLO [фрагмент 79-571] WT без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAW EWRKVIDERDVKLSKEINVNISGST LSPYGSITYK
32	SLO [фрагмент 79-571] W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAA EWRKVIDERDVKLSKEINVNISGST LSPYGSITYK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
33	SpyAD [фрагмент 33-849] WT без лидера, с G выступом в результате расщепления	GQVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPETIQEAKATIDAVEKTLS QQAELTELATALTKTTAEINHLKEQQDNEQKALTSAQEIYTNT LASSEETLLAQGAHQRELTATETELHNAQADQHSKETALSEQK ASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLNAMISNPDAITKAAQTA NDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEKE AELSRLKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELKKLEASGYIG SASYNNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADRNRVDPDNL TPEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTS YKKTGHGTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIR NDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYG HAINFLRVDKHNPAPVYLGFSSTSNVGSLSNEHFVMFPESNIANH QRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTIAAIKGVSSLENRLSA IHQEADIMAAQAKVSQIQGKLASTLKQSDSLNLQVRQLNDTKGS LRTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAA ARVTALVAKKAHLQYLRDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTT SSLLNAQEALAAQAKQSSLEATIATTEHQLTLLKTLANEKEYR HLDEDIATVPDLQVAPPLTGKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETKQ LLEASARLAAENTSLVAEALVGQTSSEMVASNAIVSKITSSITQP SSKTSYSGSGSSTTSNLIISDVDESTQR

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
34	SpyAD [фрагмент 33-849] mAA (напр., pAMF) без лидера, с G выступом в результате расщепления  X = mAA (напр., pAMF) положения K64/K287/K386/K657 – пронумерованы	GQVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPETIQEAXATIDAVEKTLS QQKAELTELATALTKTTAEINHLKEQQDNEQKALTSAQEIYTNT LASSEETLLAQGAHQREL TATETELHNAQADQHSKETALSEQK ASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLNAMISNPDAITKAAQTA NDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEKE AELSRLKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELKXLEASGYIG SASYNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADRNR FVDPDNL TPEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTS YKXTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIR NDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYG HAINFLRVDKHNPAPVYLG FSTSNVGS LNEHFVMFPESNIANH QRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTIAAIKGVSSLENRLSA IHQEADIMAAQAKVSQLQGKLASTLKQSDSLNLQVRQLNDTKGS LRTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAA ARVTALVAKXAHLQYLRDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTT SSSLNAQEALAAALQAKQSSLEATIATTEHQLTLLKTLANEKEYR HLDEDIATVPDLQVAPPLTG VKPLSY SKIDTTPLVQEMVKETKQ LLEASARLAAENTSLVAEALVGQ TSEMVASNAIVSKITSSITQP SSKTSYSGSGSSTTSNLISDVDESTQR
35	ADI [полной длины] WT без лидера, с G выступом в результате расщепления	GTAQTPIHVYSEIGKLLKVVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPHYGGKVPVYDRNETTRIE GGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNI FKQNLGFKKVLA FEFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEKGD LAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWND GSNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELVRGR GGPRCMSMPFEREDI

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
36	ADI [полной длины] D277A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GTAQTPIHVYSEIGKLLKVVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPITYGGKVPVYDRNETTRIE GGDELVLSKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNI FKQNLGFKKVLA FEFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEKGDLELLAANLGVEKVDLIRCGDNLVAAGREQWND GSNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILESGLKLIKIHGSELVRGR GGPRCMSMPFEREDI
37	ADI [полной длины] mAA (напр., pAMF) без лидера, с G выступом в результате расщепления  X = mAA (напр., pAMF) положения – K15, K193, K316	GTAQTPIHVYSEIGXLLKVVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGXYIFTHHPITYGGKVPVYDRNETTRIE GGDELVLSKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNI FKQNLGFKKVLA FEFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEXGDLELLAANLGVEKVDLIRCGDNLVAAGREQWND GSNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILESGLKLIKIHGSELVRGR GGPRCMSMPFEREDI

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
38	ADI (mut5) [полной длины] D277A mAA (напр., pAMF) без лидера, с G выступом в результате расщепления  X = mAA (напр., pAMF) положения – K15, K193, K316	GTAQTPPIHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDFAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGXYIFTTHPIYGGGKVPVYDRNETTRIE GGDELVLSKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNI FKQNLGFKKVLA FEFANNRKFHMLATVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWND GSNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILESGLKLIKIHGSELVRGR GGPRCMSMPFEREDI
39	hFL [полной длины] WT без лидера	MHHHHHHGSGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
40	hFL [полной длины] WT без лидера	SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
41	hFL [полной длины] mAA (напр., pAMF) без лидера  X = mAA (напр., pAMF) положение – I5	MHHHHHHGSGSSQXRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
42	hFL [полной длины] ппАА (напр., рАМФ) без лидера  X = ппАА (напр., рАМФ) положение – 15	SSQ <u>X</u> RQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVAL EGVSHFFRELAAEEKREGYERLLKMQNQGRALFQDIKKPAEDE WGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETH FLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
43	eCRM-рАМФ6 мутант	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQ <u>X</u> GIQKPKSGTQG NYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGL TKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGAS RVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQD AMYEYMAQACAGNRVRNSVGSSLSCLNLDWDVIRD <u>X</u> TKTKIESL KEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPELSE <u>LX</u> TVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILP GIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVD IGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGH <u>X</u> TQPFLLHDGYAV SWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGK LDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVH ANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNS <u>X</u> LS LFFEIKS
44	SLO(ΔC11) W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFSALKGTDVKTNGKYSIDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGS

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
45	SLO(ΔC21) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAAEWWRKVIDERDVKLS
46	SLO(ΔC31) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAAEWWRK

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
47	SLO(ΔC41) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PFSTVIPLG ANSRNIRIMAREC
48	SLO(ΔC51) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PFSTVIPLG ANS
49	SLO(ΔC61) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PF

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
50	SLO(ΔC71) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTIVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD
51	SLO(ΔC81) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTIVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKG
52	SLO(ΔC91) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTIVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEIL

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
53	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVI RNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQ
54	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A без лидера, с G выступом в результате расщепления X = mAA (напр., pAMF) или нативная аминокислота (напр.: K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375, K407, K464; или K или R.)	GAPKEMPLESAEKEEKKSED <b>X</b> KKSEEDHTEEIND <b>X</b> IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <b>X</b> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTEN <b>X</b> PDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF <b>X</b> ELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSS <b>X</b> SN DVEAAFS AALKGTDV <b>X</b> TNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <b>X</b> DFDVI RNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G <b>X</b> INLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
55	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 1 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (420995) X = mAA (напр., pAMF) положения – K98, R151, K272, K357	GAPKEMPLESAEKEEKKSED <b>X</b> KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <b>X</b> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTIVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS <b>X</b> SNDVEAAFSALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ
56	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 2 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (420996) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, K189, K323, K375	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEIND <b>X</b> IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTEN <b>X</b> PDAVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTIVSANLPNNPADVFDKSVTF <b>X</b> ELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDVEAAFSALKGTDV <b>X</b> TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
57	SLO(ΔC101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 3 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (420997) X = mAA (напр., pAMF) положения – R151, K272, K357, K407	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <b>X</b> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSS <b>X</b> SNDVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVV <b>T</b> XDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQ
58	SLO(ΔC101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 4 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (420998) X = mAA (напр., pAMF) положения – R151, K272, K375, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <b>X</b> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSNDVEAAFS AALKGTDV <b>X</b> TNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVV <b>T</b> KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G <b>X</b> INLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
59	SLO(ΔC101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF)5 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (420999) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, K272, K357, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDX <sup>1</sup> IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSX <sup>2</sup> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSX <sup>3</sup> SNDVEAAFSALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSGX <sup>4</sup> INLSHQ
60	SLO(ΔC101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 6 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (421000) X = mAA (напр., pAMF) положения – K98, K189, K357	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDX <sup>1</sup> KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENX <sup>2</sup> PDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSX <sup>3</sup> SNDVEAAFSALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSX <sup>4</sup> KINLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
61	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 7 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (421001) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, K189, K323	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDXKKSEEDHTEEINDX <del>I</del> YSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENX <del>P</del> DAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFX <del>E</del> LQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFSALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <del>G</del> KINLSHQ
62	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 8 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (421002) X = mAA (напр., pAMF) положения – K98, R151, K272	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDXKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <del>X</del> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENK <del>P</del> DAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSX <del>I</del> L <del>D</del> GTGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFSALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <del>G</del> KINLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
63	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 9 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (421003) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, K272, K375	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDX <del>I</del> YSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI <del>D</del> NLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSX <del>I</del> L <del>D</del> GTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIF <del>Y</del> TVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN <del>E</del> APPLFVSN VAYGR <del>T</del> VFVKLETSSKSN <del>D</del> VEAAFS <del>A</del> ALKGTDVX <del>T</del> NGKYS <del>D</del> ILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <del>K</del> DFD <del>V</del> IRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <del>G</del> KINLSHQ
64	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (421004) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, K323, K407	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDX <del>I</del> YSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI <del>D</del> NLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSK <del>I</del> L <del>D</del> GTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIF <del>Y</del> TVSANLPNNPADVFDKSVTFX <del>E</del> LQRKGVSN <del>E</del> APPLFVSN VAYGR <del>T</del> VFVKLETSSKSN <del>D</del> VEAAFS <del>A</del> ALKGTDVKTNGKYS <del>D</del> ILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTX <del>D</del> DFD <del>V</del> IRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <del>G</del> KINLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
65	SLO(ΔC101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426507) X = mAA (напр., pAMF) положения – K98, R151, K272, K357, K407	GAPKEMPLESAEKEEKKSED <b>X</b> KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <b>X</b> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSS <b>X</b> SNDVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVV <b>T</b> XDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQ
66	SLO(ΔC101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426508) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, K189, K323, K375, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEIND <b>X</b> IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN <b>X</b> PDVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF <b>X</b> ELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSNDVEAAFS AALKGTDV <b>X</b> TNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G <b>X</b> INLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
67	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA ( <i>напр.</i> , pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426509) X = mAA ( <i>напр.</i> , pAMF) положения – K112, R151, K272, K357, K407	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEIND <b>X</b> IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <b>X</b> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS <b>X</b> SNDVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <b>X</b> DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQ
68	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA ( <i>напр.</i> , pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426510) X = mAA ( <i>напр.</i> , pAMF) положения – K98, R151, K272, K357, K407, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSED <b>X</b> KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <b>X</b> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS <b>X</b> SNDVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <b>X</b> DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <b>G</b> XINLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
69	SLO(ΔC101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426511) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, R151, K189, K323, K375, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDXIIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIEXKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENXPDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSK SQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIF YTVSANLPNNPADVFDKSVTFXELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGR TVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVXTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSGXINLSHQ
70	SLO(ΔC101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426512) X = mAA (напр., pAMF) положения – K98, K112, K189, K323, K375, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDXKKSEEDHTEEINDXIIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRITYPAALQLANKGFTENXPDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSK SQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIF YTVSANLPNNPADVFDKSVTFXELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGR TVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVXTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSGXINLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
71	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426513) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, R151, K189, K272, K357, K407, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDX <del>I</del> YSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <del>X</del> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTEN <del>X</del> PDAVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <del>X</del> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS <del>X</del> SNDVEAAFSALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <del>X</del> DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <del>G</del> INLSHQ
72	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426514) X = mAA (напр., pAMF) положения – K98, R151, K189, K323, K375, K407, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSED <del>X</del> KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <del>X</del> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTEN <del>X</del> PDAVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF <del>X</del> ELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNNDVEAAFSALKGTDV <del>X</del> TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <del>X</del> DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <del>G</del> INLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
73	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426515) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, K189, K272, K357, K375, K407, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDX <del>Y</del> ISLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTENX <del>P</del> DAVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSX <del>I</del> LDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYT <del>V</del> SANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN <del>E</del> APPLFVSN VAYGR <del>T</del> VFVKLETSSX <del>S</del> NDVEAAFS <del>A</del> ALKGTDVX <del>T</del> NGKYS <del>D</del> ILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTX <del>D</del> FDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <del>G</del> XINLSHQ
74	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426516) X = mAA (напр., pAMF) положения – K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375,	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDX <del>K</del> KKSEEDHTEEINDX <del>Y</del> ISLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <del>X</del> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTENX <del>P</del> DAVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSX <del>I</del> LDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYT <del>V</del> SANLPNNPADVFDKSVTF <del>X</del> ELQRKGVSN <del>E</del> APPLFVSN VAYGR <del>T</del> VFVKLETSSX <del>S</del> NDVEAAFS <del>A</del> ALKGTDVX <del>T</del> NGKYS <del>D</del> ILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <del>K</del> DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <del>G</del> KINLSHQ

Посл ID	Наименование/ описание	Аминокислотная последовательность
75	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426510) X = mAA (напр., pAMF) положения – K98, R151, K189, K272, K323, K357, K407, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSED <b>X</b> KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE <b>X</b> KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTEN <b>X</b> PDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF <b>X</b> ELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS <b>X</b> SNDVEAAFSALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <b>X</b> DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <b>G</b> XINLSHQ
76	SLO( $\Delta$ C101) фрагмент W535A – mAA (напр., pAMF) 10 – без лидера, с G выступом в результате расщепления (426515) X = mAA (напр., pAMF) положения – K112, K189, K272, K323, K357, K375, K407, K464	GAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEIND <b>X</b> IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTEN <b>X</b> PDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS <b>X</b> ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF <b>X</b> ELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS <b>X</b> SNDVEAAFSALKGTDV <b>X</b> TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT <b>X</b> DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS <b>G</b> XINLSHQ

### Формула изобретения

1. Иммуногенная композиция, содержащая
  - a. первый полипептидный антиген стрептококка группы А (GAS);
  - b. второй полипептидный антиген GAS; и
  - c. по меньшей мере один конъюгат полипептид-полисахарид, где полипептид конъюгата представляет собой третий полипептидный антиген GAS или не несущий GAS полипептид и содержит по меньшей мере одну не природную аминокислоту, и где полисахарид конъюгата представляет собой полисахарид GAS или его вариант, который лишен иммунодоминантной боковой цепи N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).
  
2. Иммуногенная композиция по п. 1, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS независимо выбраны из C5a пептидазы, стрептолизина О (SLO), Sib35, Sfb1 и SpyAD.
  
3. Иммуногенная композиция по п. 1, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO.
  
4. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, а полипептидный антиген C5a пептидазы содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.
  
5. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-3, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, а полипептидный антиген C5a пептидаза состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.
  
6. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-5, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

7. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-4, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, и полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

8. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-5, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

9. Иммуногенная композиция по п. 3, в которой полипептидный антиген SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

10. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-4, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, а полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

11. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-4, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SLO, а полипептидный антиген SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

12. Иммуногенная композиция по пп. 1 или 4, в которой первый и второй полипептидные антигены GAS представляют собой C5a пептидазу и SpyAD.

13. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-3, 8-9 или 12, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

14. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-3, 8-9 или 12, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

15. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-3, 8-9, 12 или 14, в которой полипептидный антиген C5a пептидаза состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 30.

16. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-15, в которой третий полипептидный антиген GAS или не-GAS полипептидный антиген выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдезимиказы (ADI), SEQ ID NO: 25 и белка D.

17. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-15, в которой третий полипептидный антиген GAS или не-GAS полипептидный антиген выбран из полипептида *Streptococcus pyogenes* Adhesion and Division (SpyAD), аргининдезимиказы (ADI), SEQ ID NO: 25, белка D и SLO.

18. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-17, в которой ппАА содержит реакционноспособную группу, подходящую для клик-химии.

19. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-18, в которой ппАА выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-4-азидобутановой кислоты, 2-азидо-3-фенилпропионовой кислоты, 2-амино-3-азидопропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты и 2-амино-5-азидопентановой кислоты.

20. Иммуногенная композиция по п. 18 или 19, где ппАА представляет собой pAMF.

21. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-20, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий белок GAS, который представляет собой полипептид SpyAD и содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 33.

22. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-21, в которой полипептид SpyAD содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657 SEQ ID NO: 33.

23. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-22, в которой полипептид SpyAD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

24. Иммуногенная композиция по п. 22, в которой полипептид SpyAD состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

25. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-20, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид ADI и содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 35 или SEQ. ID №: 36.

26. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-20 или 25, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

27. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-20 или 25, в которой полипептид ADI состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

28. Иммуногенная композиция по любому из пп. 17-20, в которой полипептид конъюгата представляет собой третий полипептид GAS, который представляет собой полипептид SLO и содержит аминокислотную последовательность,

по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 53.

29. Иммуногенная композиция по п. 28, в которой полипептид SLO содержит 3 или 4 замены на pAMF в положениях, выбранных из K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375, K407 или K464.

30. Иммуногенная композиция по п. 29, в которой полипептид SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64.

31. Иммуногенная композиция по п. 29, в которой полипептид SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64.

32. Иммуногенная композиция по п. 28, в которой полипептид SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76.

33. Иммуногенная композиция по п. 28, в которой полипептид SLO состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76.

34. Иммуногенная композиция по любому из пп. 18-20, в которой полипептид конъюгата представляет собой полипептид ферритин и содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 21.

35. Иммуногенная композиция по п. 34, в которой полипептид ферритин содержит замену на pAMF в положении I5 в SEQ ID NO: 21.

36. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-35, в которой полисахарид конъюгата лишен иммунодоминантной боковой цепи GlcNAc.

37. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-36, в которой полисахарид конъюгата имеет среднюю молекулярную массу от примерно 10 кДа до примерно 45 кДа.

38. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);
- b. полипептидный антиген GAS стрептолизин O (SLO); и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид Streptococcus pyogenes Adhesion and Division (SpyAD) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

39. Иммуногенная композиция по п. 38, в которой белок SpyAD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33 и содержит замену на pAMF в положениях K64, K287, K386 и K657.

40. Иммуногенная композиция по пп. 38 или 39, в которой полипептидный антиген SLO содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

41. Иммуногенная композиция по пп. 1 или 38, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

42. Иммуногенная композиция по пп. 1 или 38, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 52; и конъюгат полипептид-полисахарид,

содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

43. Иммуногенная композиция по пп. 1 или 38, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 30; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 32; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

44. Иммуногенная композиция по пп. 1 или 38, содержащая полипептидный антиген C5a пептидазу с последовательностью SEQ ID NO: 29; полипептидный антиген SLO с последовательностью SEQ ID NO: 53; и конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид SpyAD конъюгата с последовательностью SEQ ID NO: 34 и полисахарид GAS конъюгата.

45. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид аргининдезимиразу (ADI) конъюгата и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

46. Иммуногенная композиция по п. 45, в которой полипептид ADI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36, и содержит замену на pAMF в положениях K15, K193 и K316.

47. Иммуногенная композиция, содержащая

- a. полипептидный антиген C5a пептидазу стрептококка группы A (GAS);
- b. полипептидный антиген стрептолизин O (SLO) GAS; и
- c. конъюгат полипептид-полисахарид, содержащий полипептид ферритин и полисахарид GAS конъюгата или его вариант, в котором отсутствует иммунодоминантная боковая цепь N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

48. Иммуногенная композиция по п. 47, в которой белок ферритин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21 и содержит замену на рAMF в положении I5.

49. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-48, в которой конъюгат полипептид-полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от примерно 10 кДа до примерно 5000 кДа.

50. Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии стрептококка группы А (GAS) у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из пп. 1-49.

51. Способ по п. 50, в котором иммуногенная композиция индуцирует выработку антител у субъекта против бактерии стрептококка группы А (GAS) и не индуцирует выработку антител у субъекта против человеческой ткани.

52. Способ по пп. 50 или 51, в котором иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ против бактерии Shigella у субъекта, при этом бактерия Shigella содержит полисахарид с полириманозным остовом.

53. Способ индукции защитного иммунного ответа против бактерии Shigella у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по любому из пп. 1-49.

54. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 1-49 для индукции защитного иммунного ответа против бактерии Shigella у субъекта.

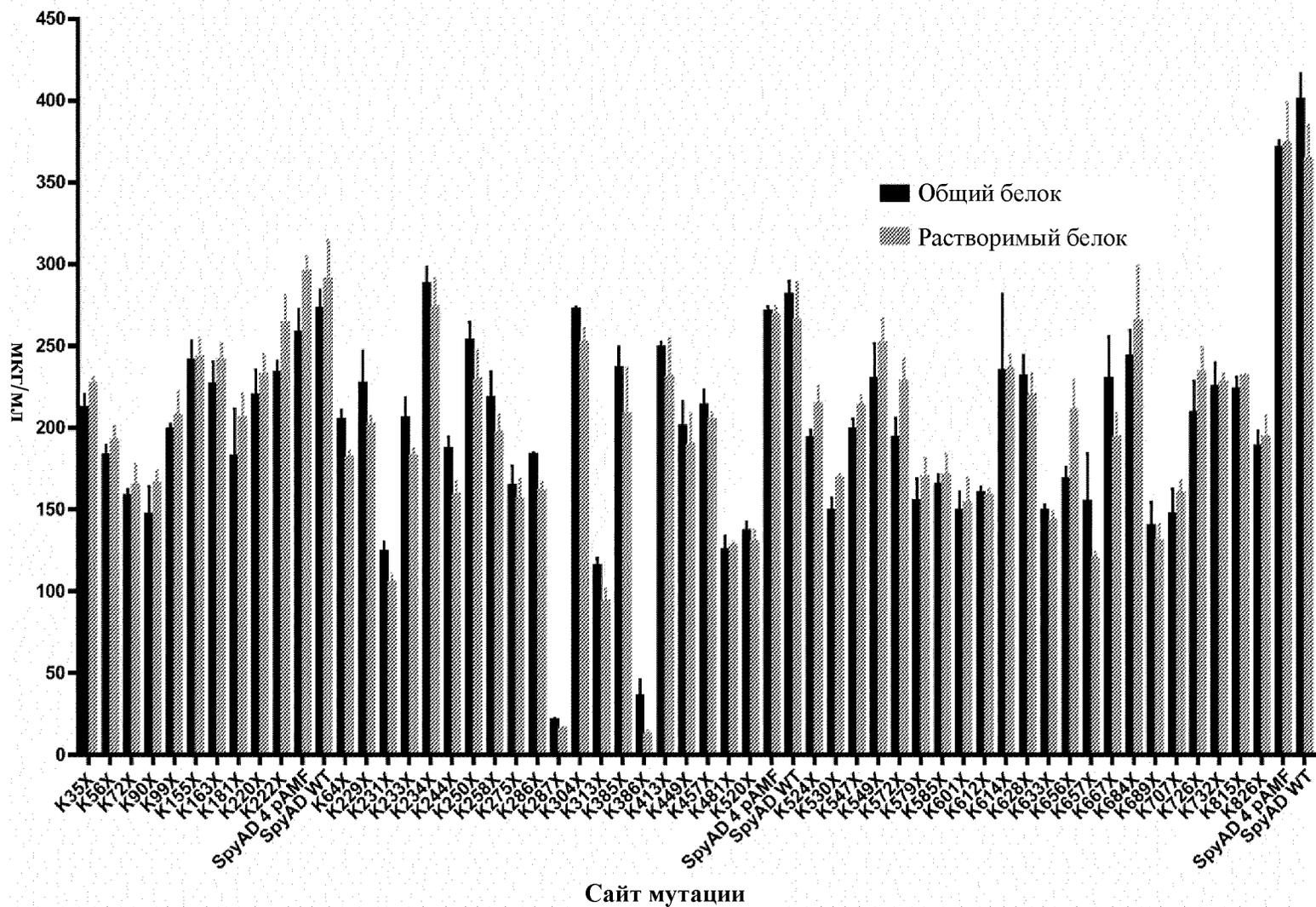
55. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 1-49 в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии Shigella у субъекта.

56. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 1-49 в изготовлении лекарственного средства для индукции защитного иммунного ответа против бактерии GAS у субъекта.

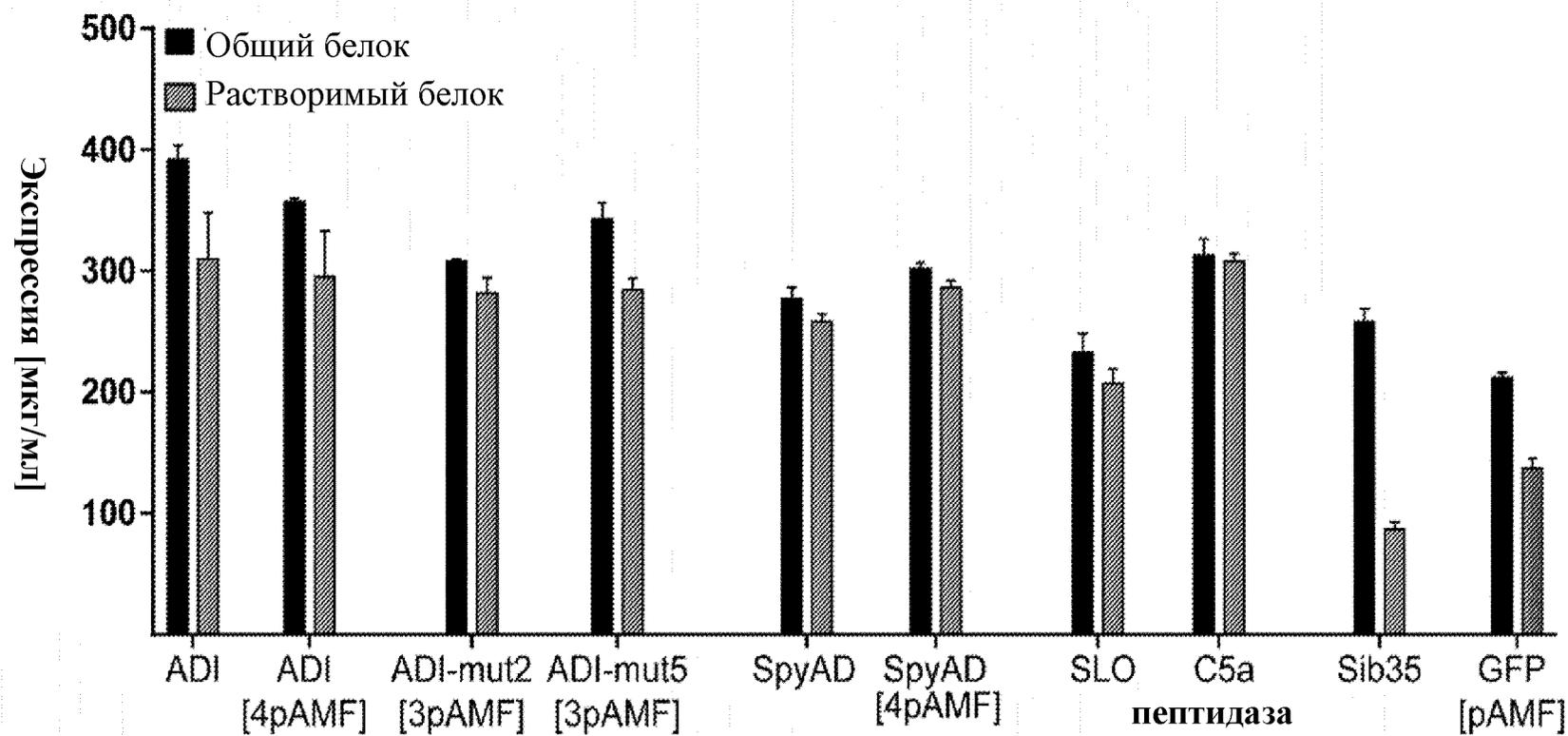
57. Применение иммуногенной композиции по любому из пп. 1-82 для индукции защитного иммунного ответа против бактерии GAS у субъекта.

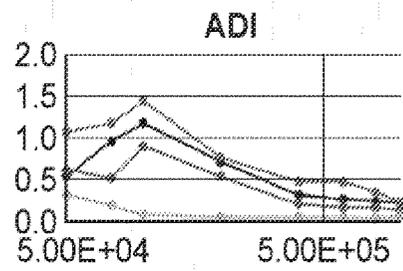
**ФИГ. 1А**

**Анализ экспрессии с заменой в одном участке SpyAD**

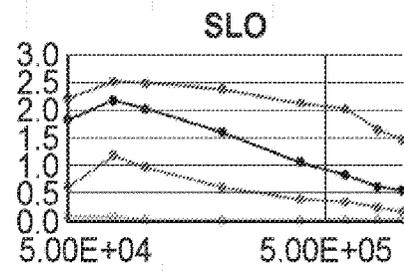


**ФИГ. 1В**

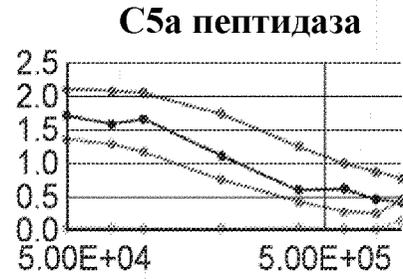




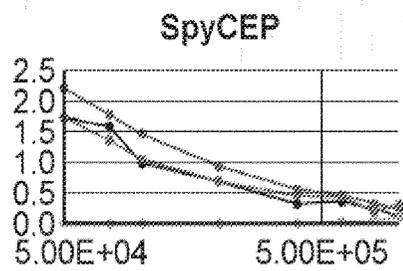
◆ ADI SV1623    ◆ ADI SV1624  
 ◆ ADI SV1625    ◆ До иммунизации



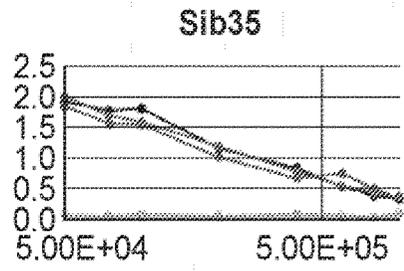
◆ SLO SV1626    ◆ SLO SV1627  
 ◆ SLO SV1628    ◆ До иммунизации



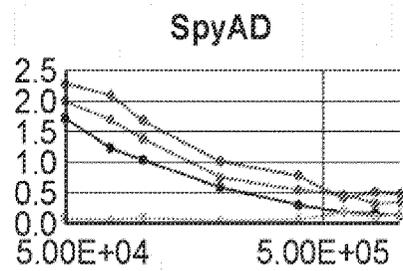
◆ C5a пептидаза SV1629    ◆ C5a пептидаза SV1630  
 ◆ C5a пептидаза SV1631    ◆ До иммунизации



◆ SpyCEP SV1632    ◆ SpyCEP SV1633  
 ◆ SpyCEP SV1634    ◆ До иммунизации



◆ sib35 SV1635    ◆ sib35 SV1636  
 ◆ sib35 SV1637    ◆ До иммунизации



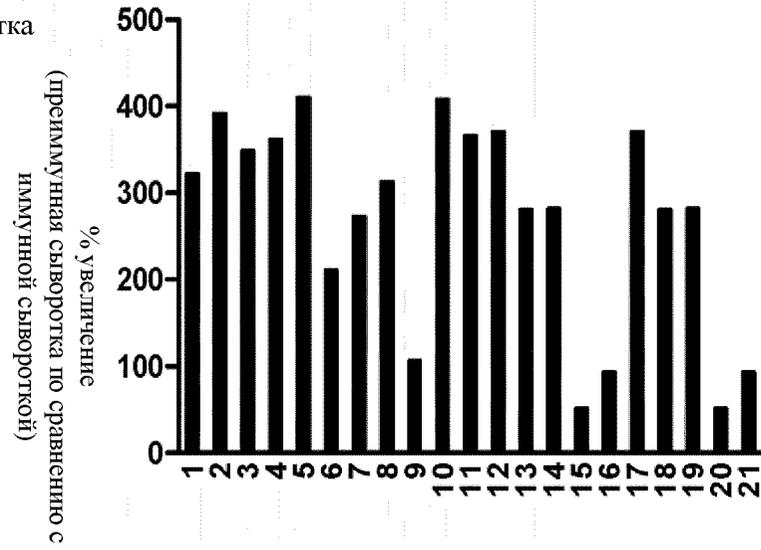
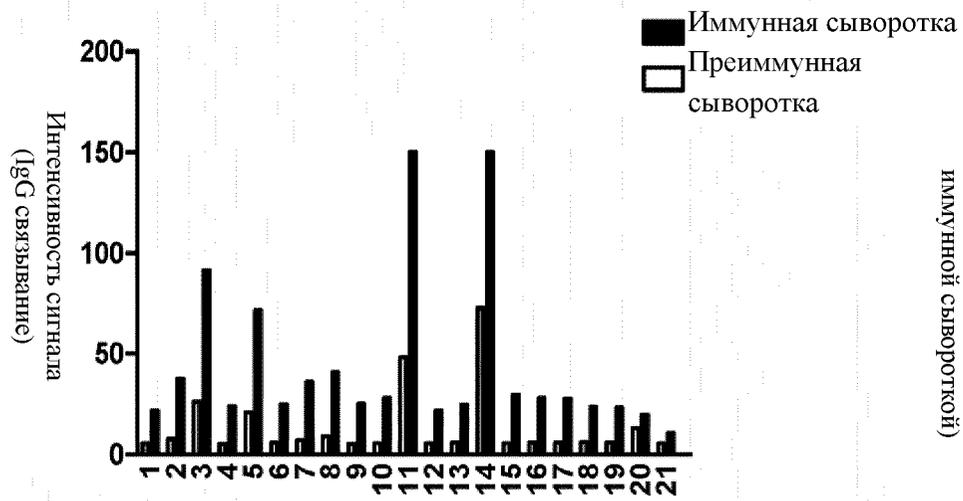
◆ SpyAD SV1641    ◆ SpyAD SV1642  
 ◆ SpyAD SV1643    ◆ До иммунизации



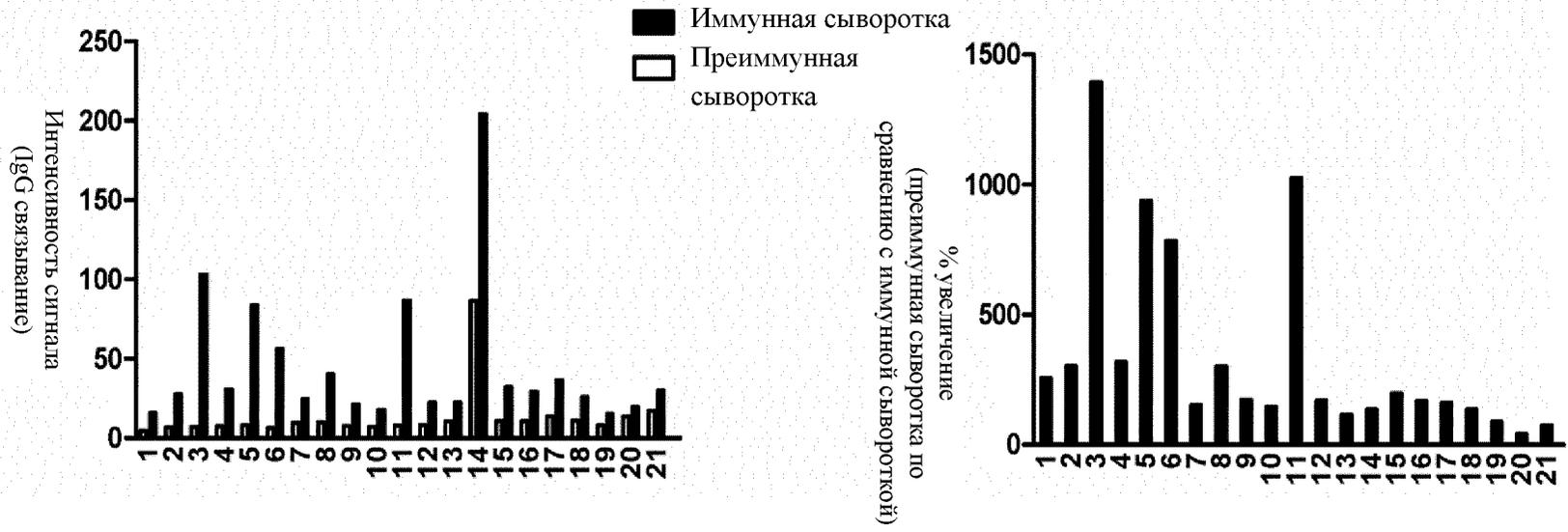
◆ SpyAD конъюгаты SV1644    ◆ SpyAD конъюгаты SV1645  
 ◆ До иммунизации

**ФИГ. 2**

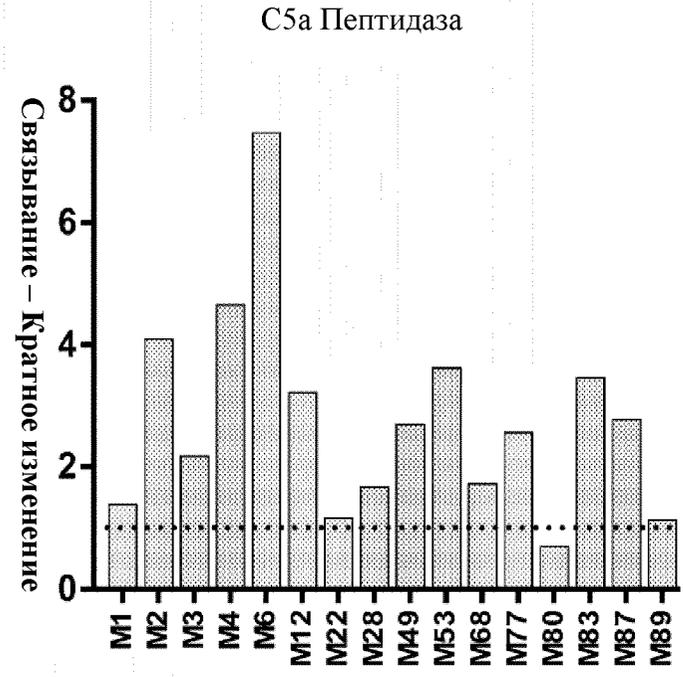
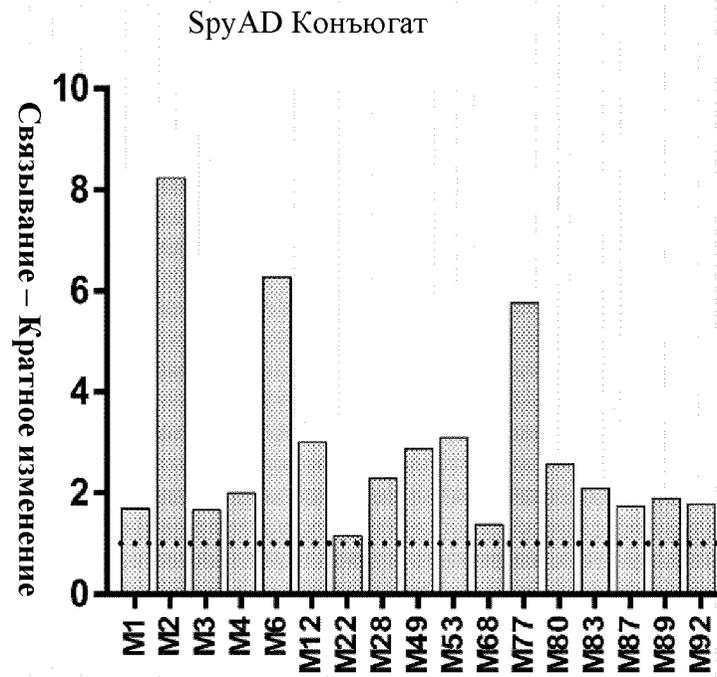
**ФИГ. 3А**

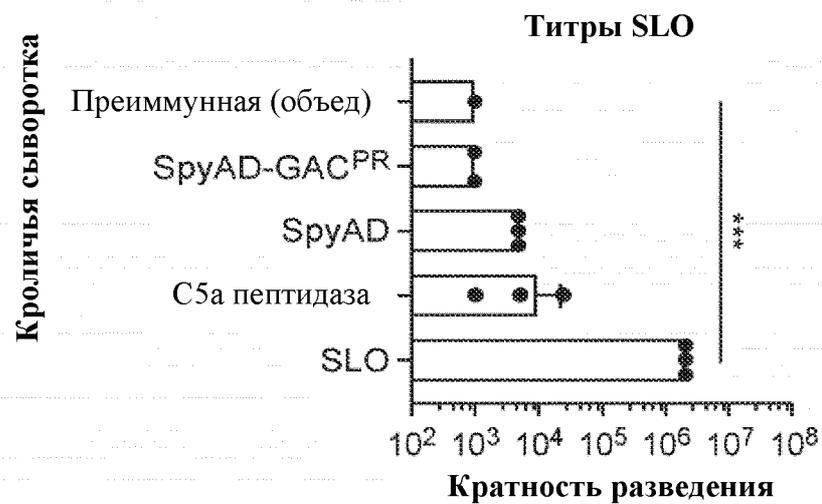
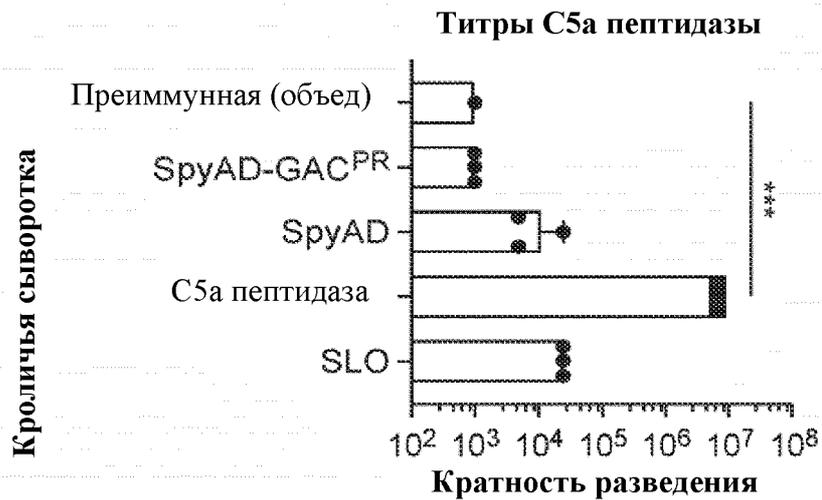
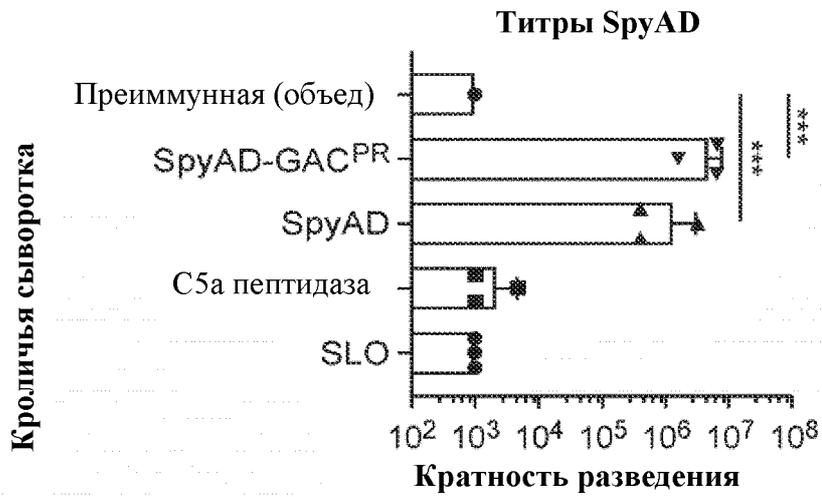


**ФИГ. 3В**



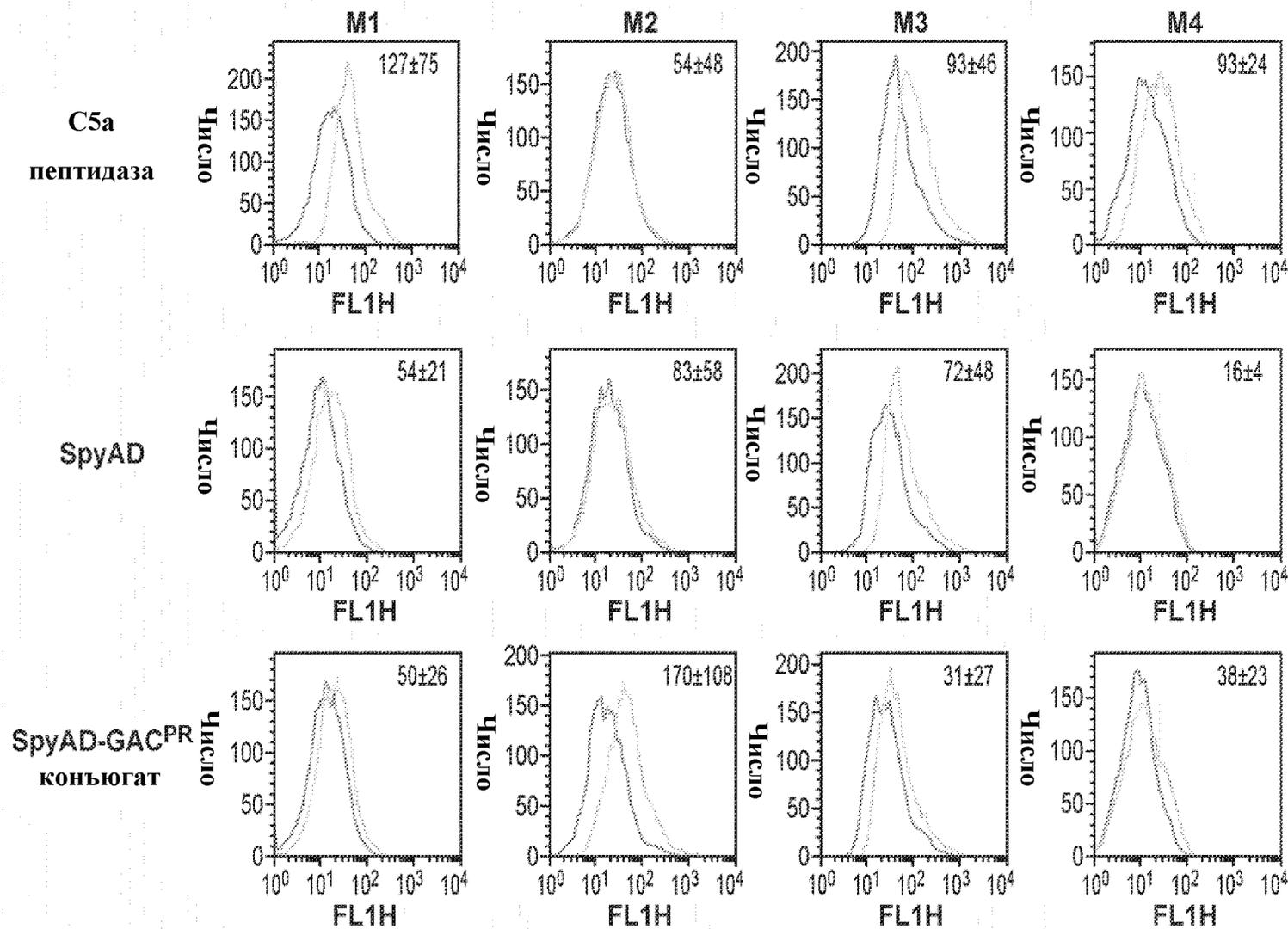
ФИГ. 3С



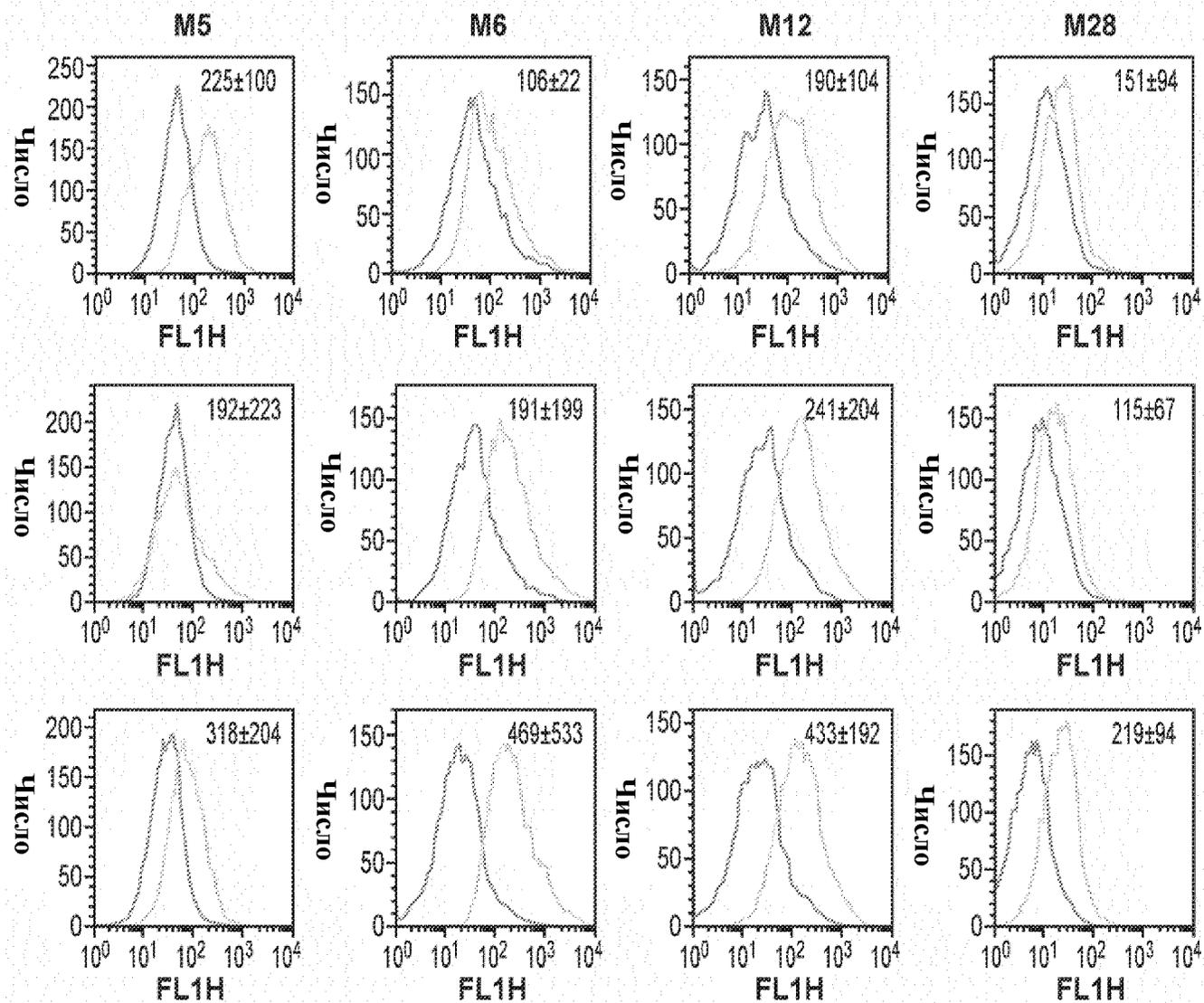


ФИГ. 3D

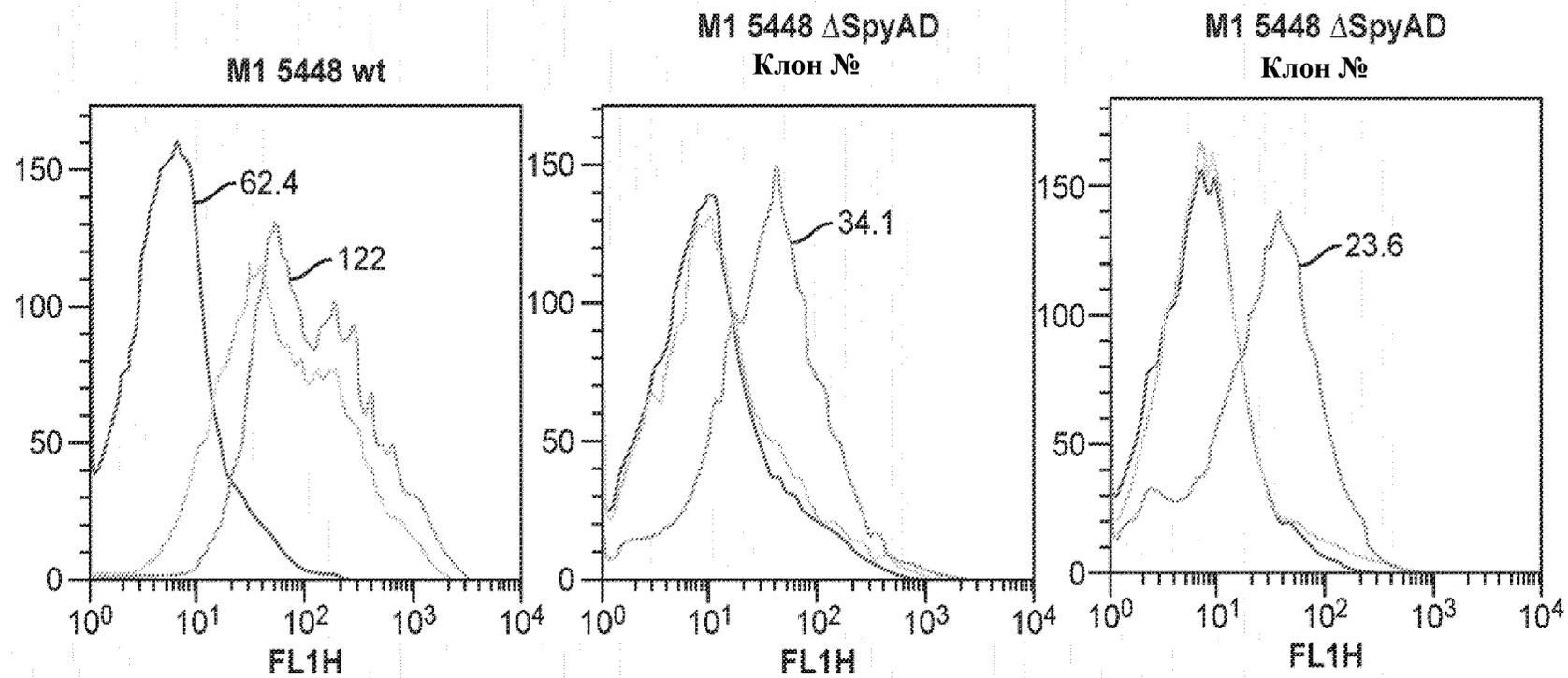
Серотипы штаммов GAS



ФИГ. 3Е



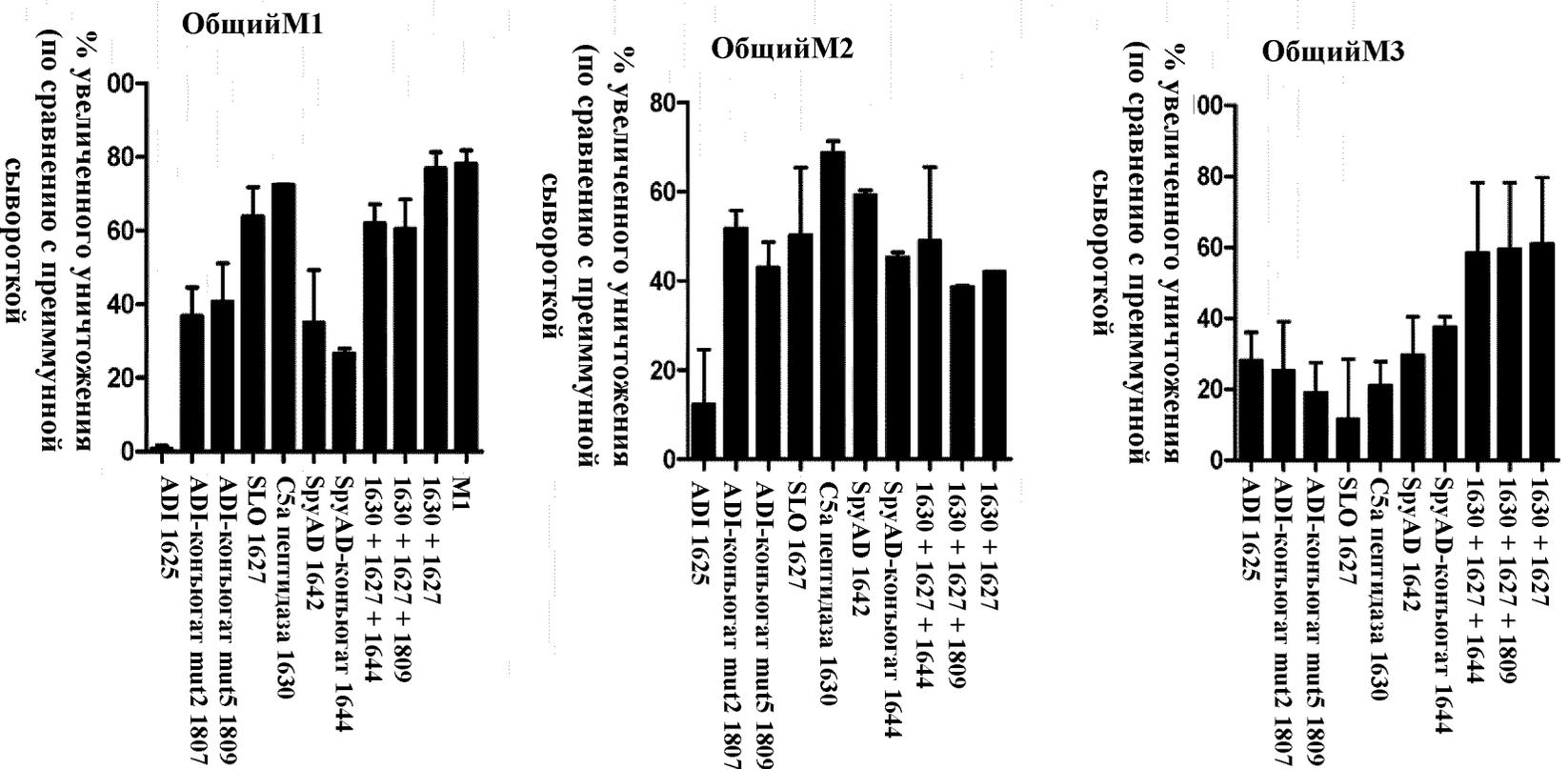
ФИГ. 3Е (продолж.)



-  Сыворотка против конъюгата SpruAD
-  Сыворотка против SpruAD
-  Преиммунная сыворотка

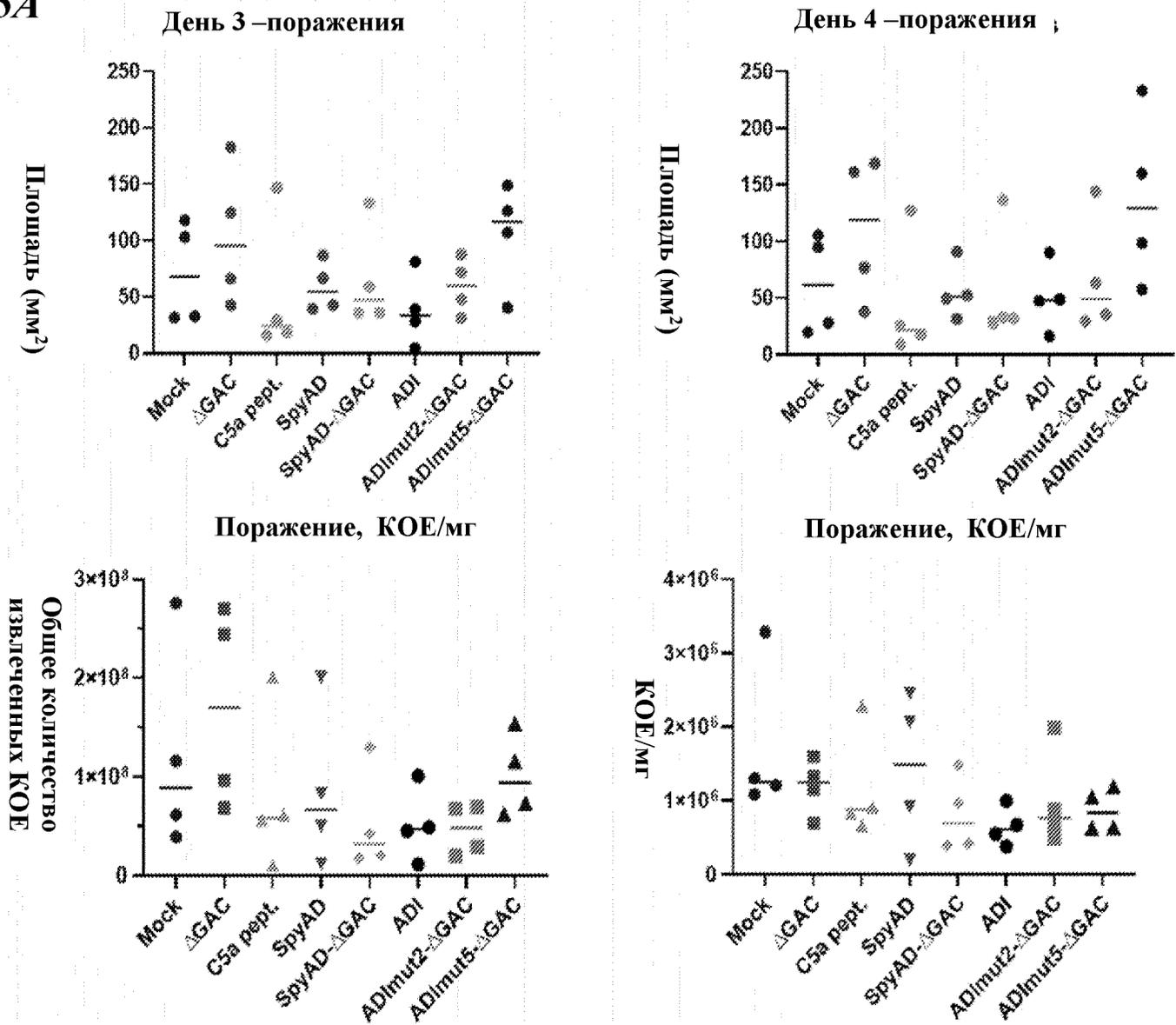
**ФИГ. 3F**

ФИГ. 4



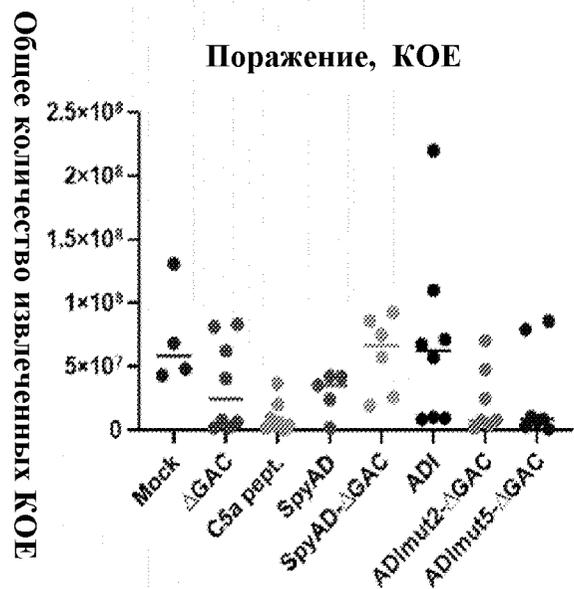
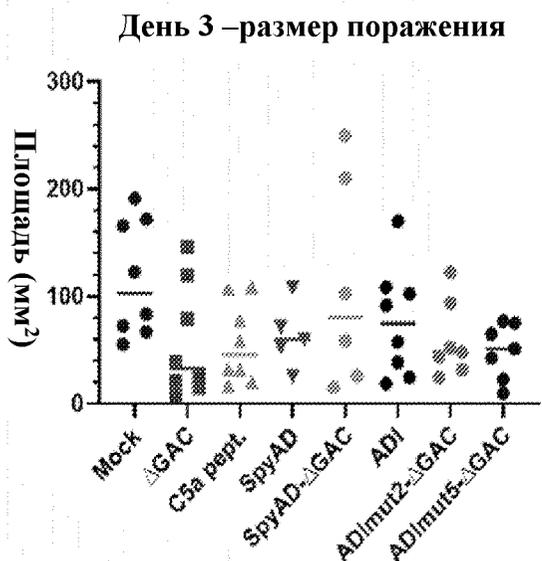
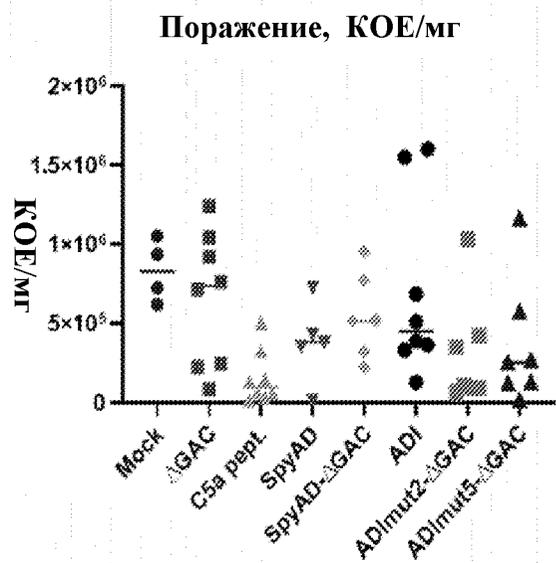
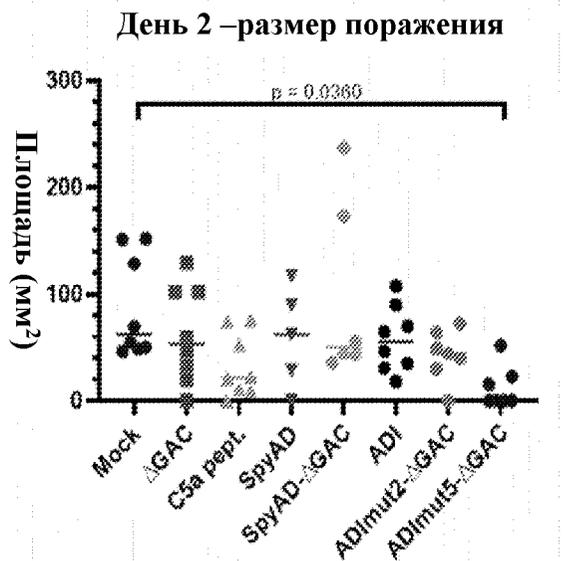
Mock - Ложноиммунизированные  
 C5a pept. – C5a пептидаза

**ФИГ. 5А**

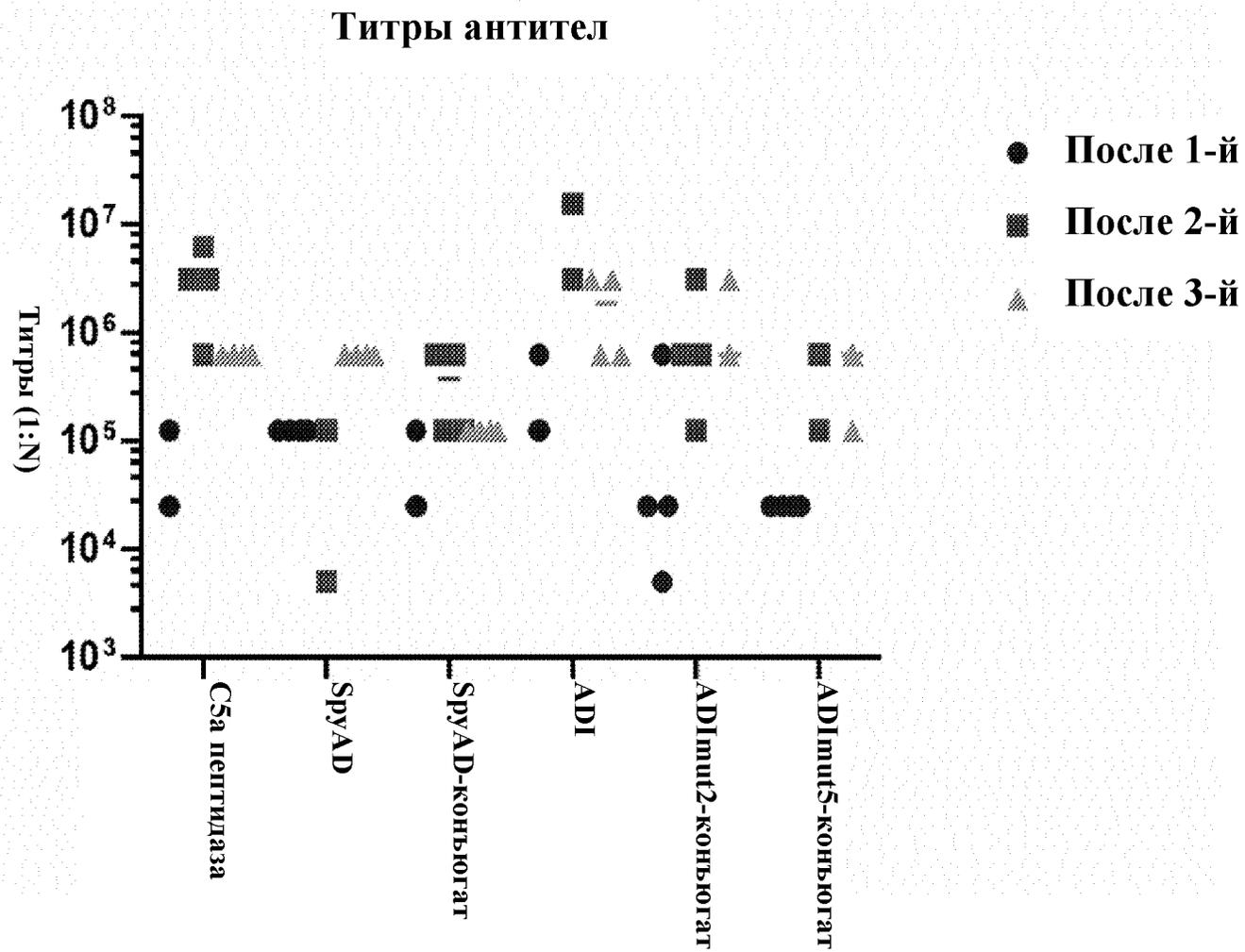


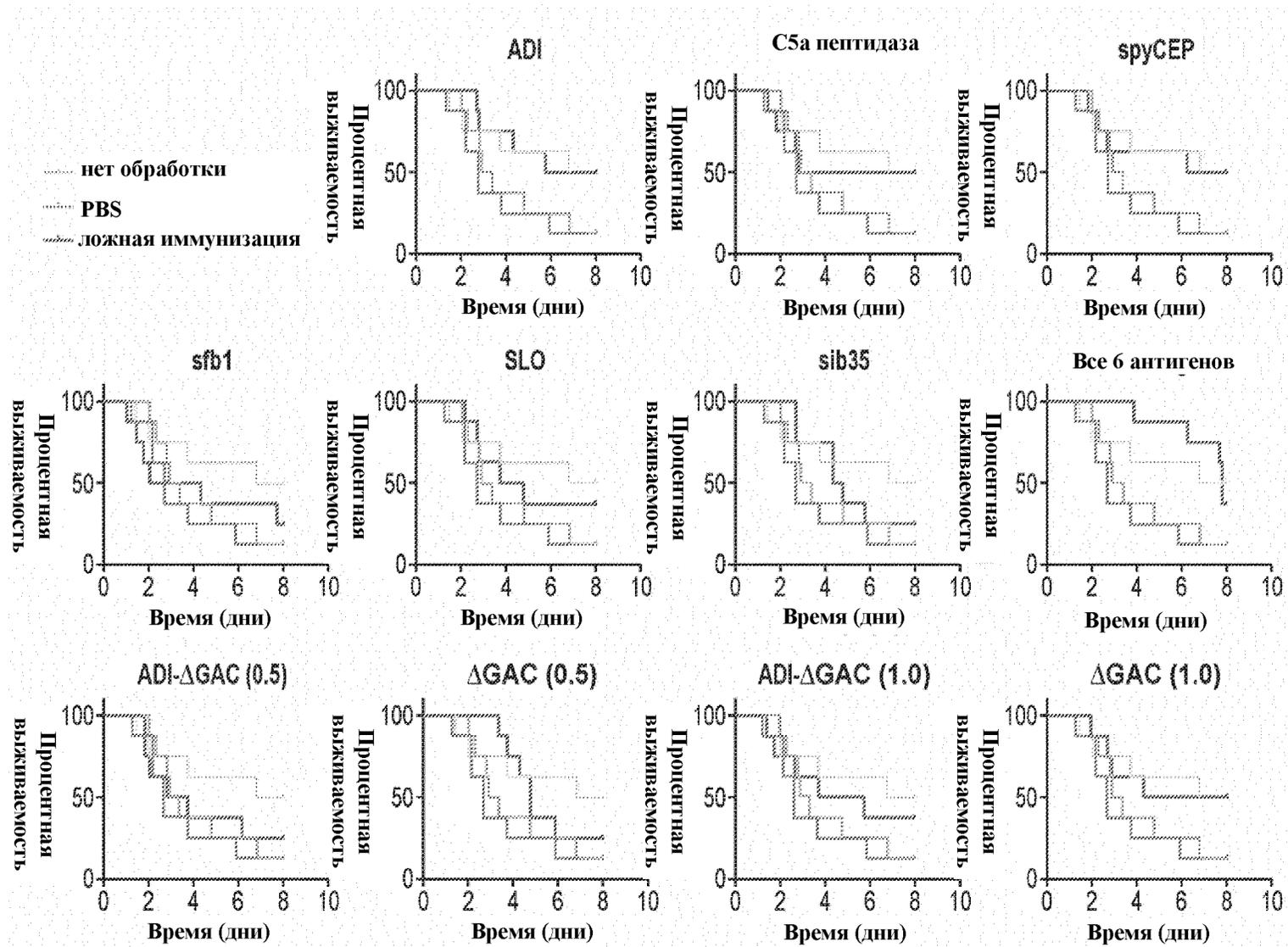
Mock - Ложноиммунизированные  
C5a pept. - C5a пептидаза

**ФИГ. 5В**

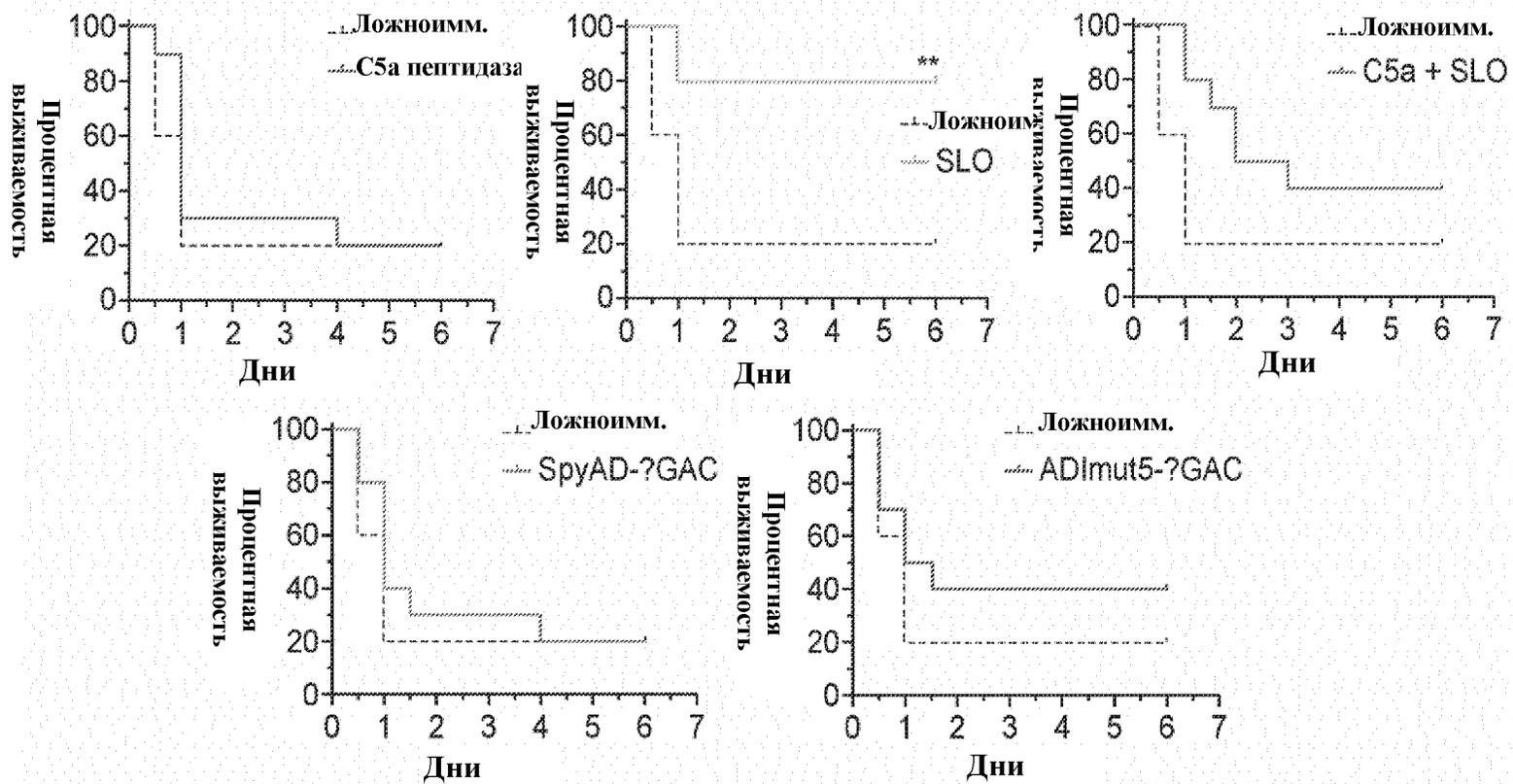


**ФИГ. 5С**

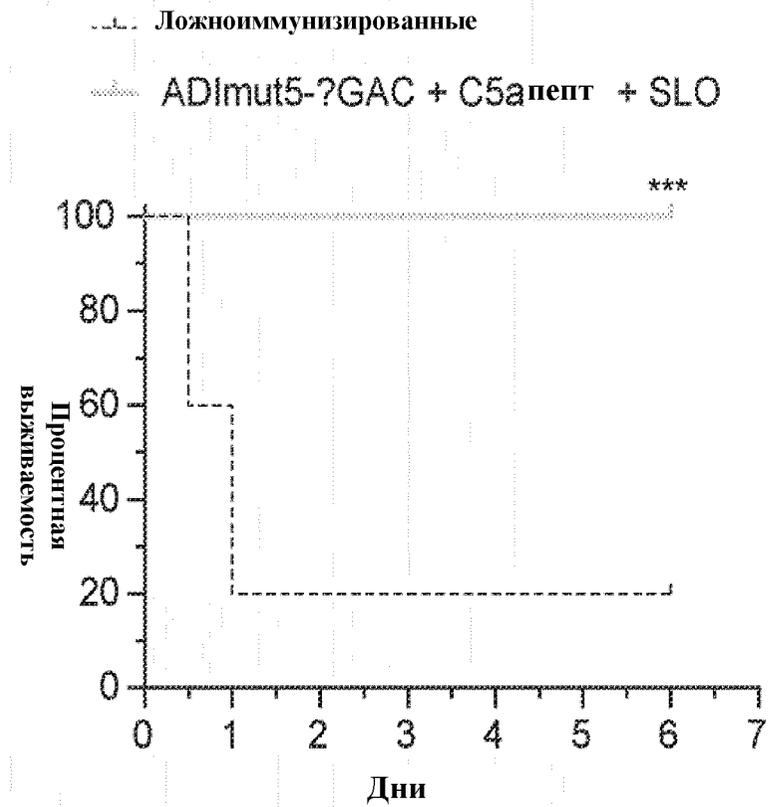
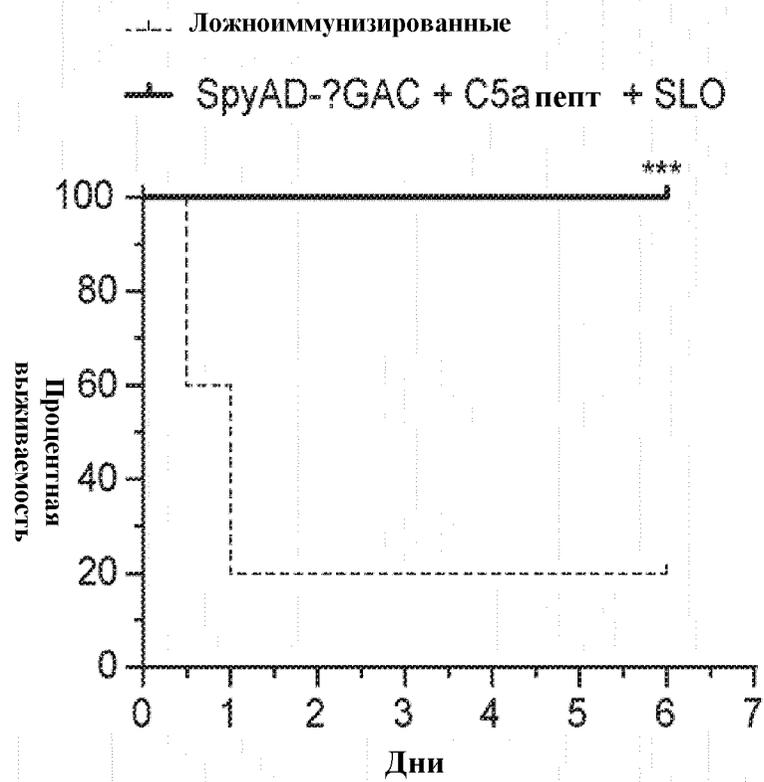




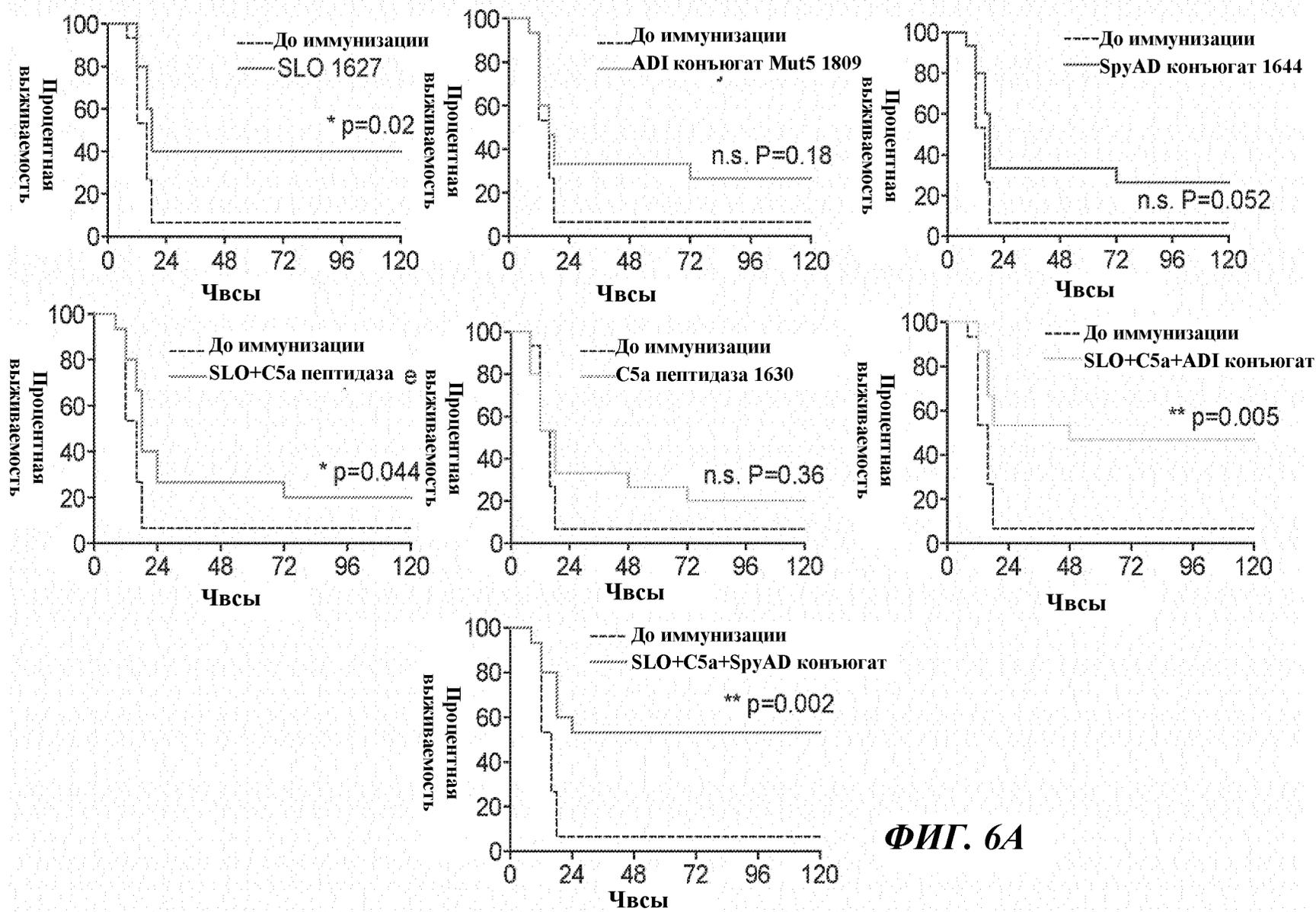
**ФИГ. 5D**



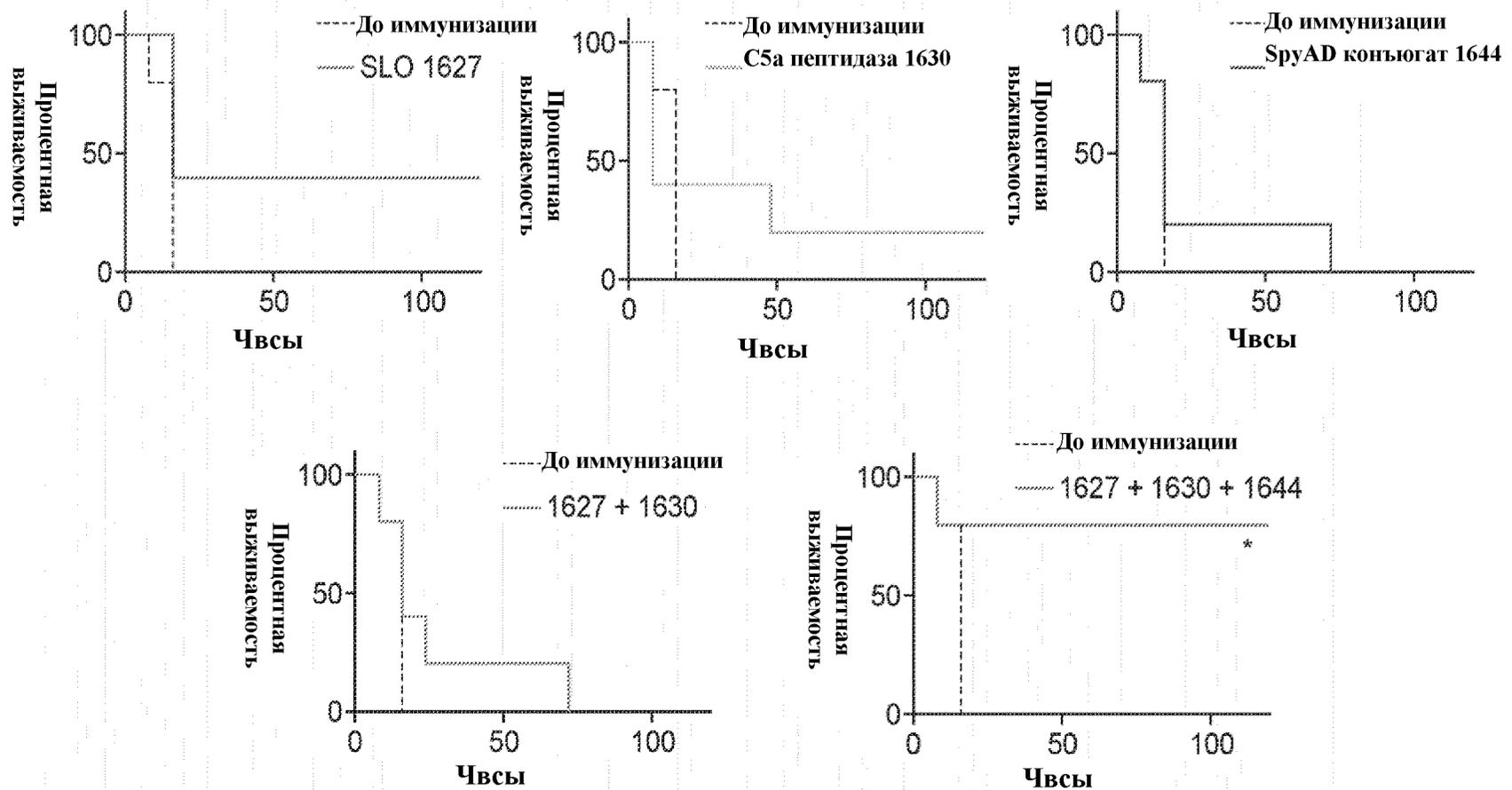
**ФИГ. 5E**



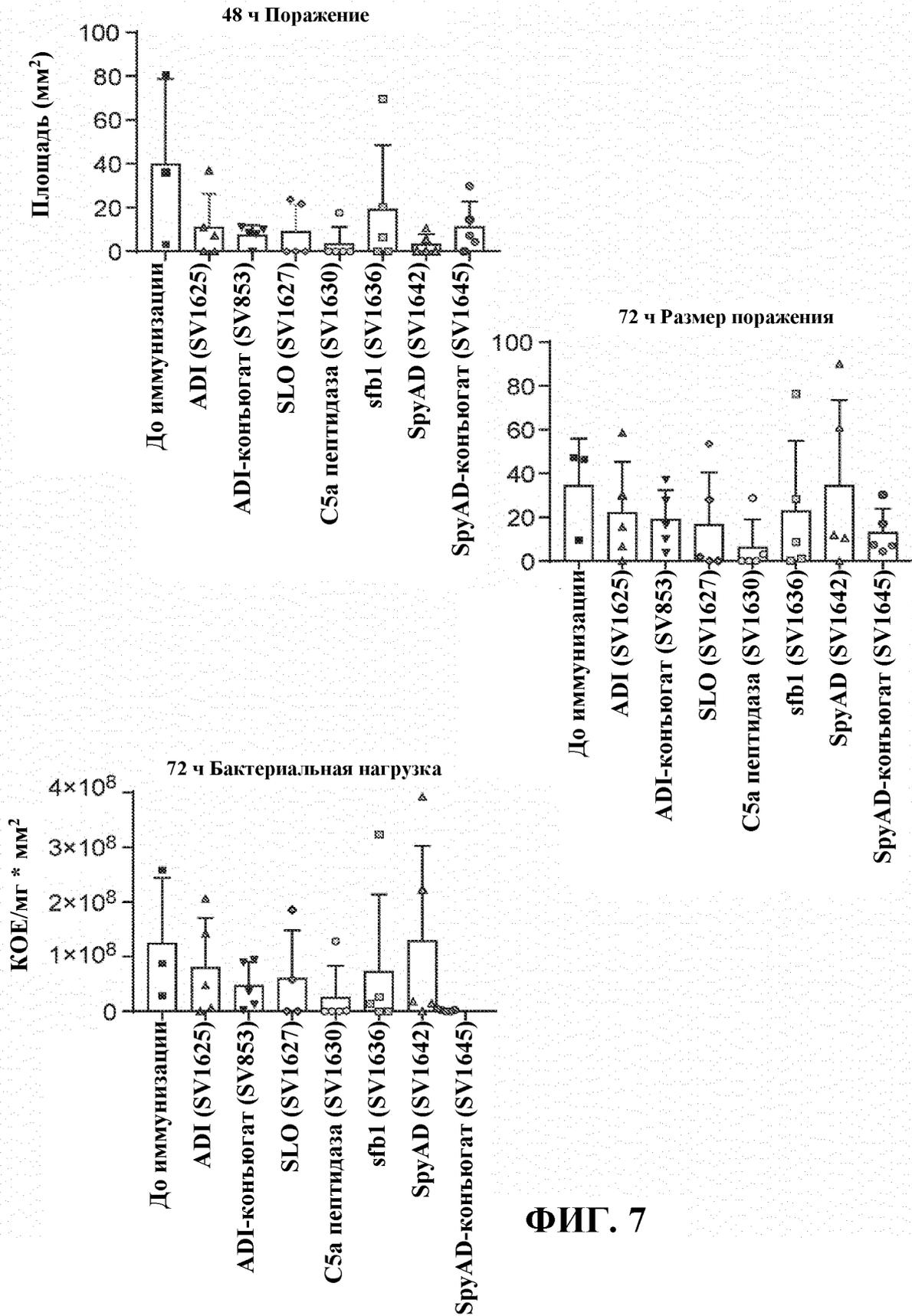
ФИГ. 5F



**ФИГ. 6А**

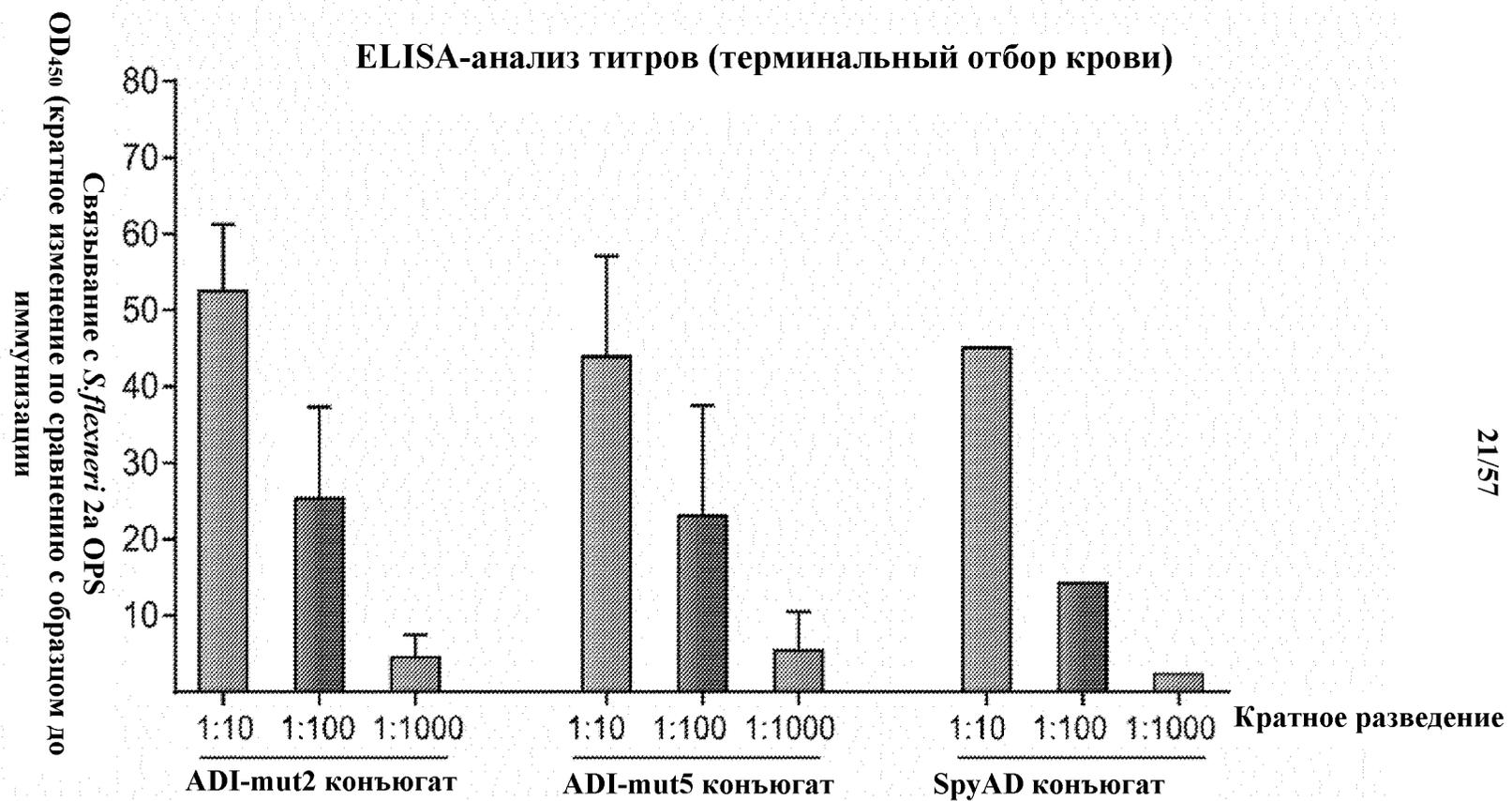


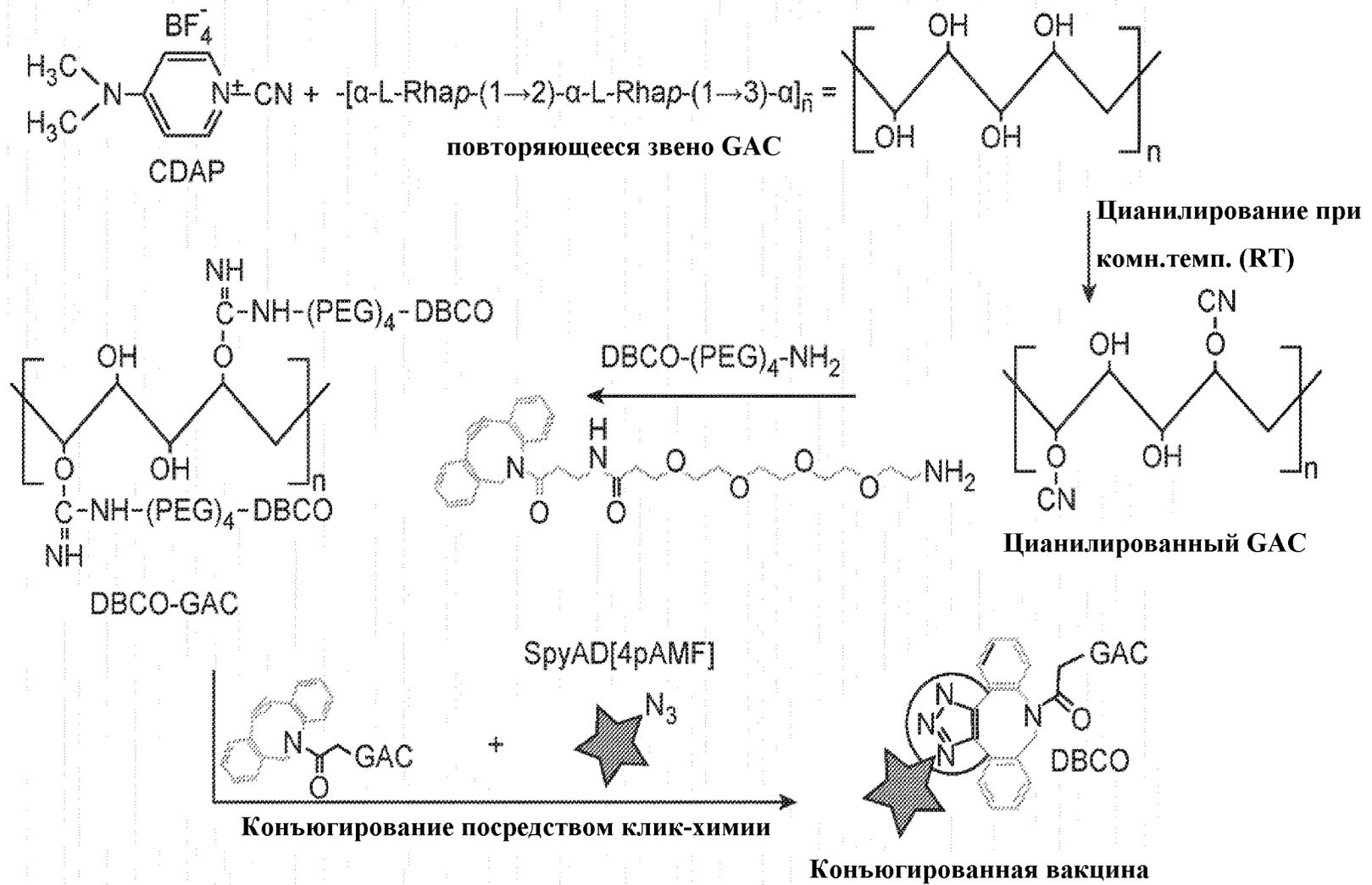
**ФИГ. 6В**



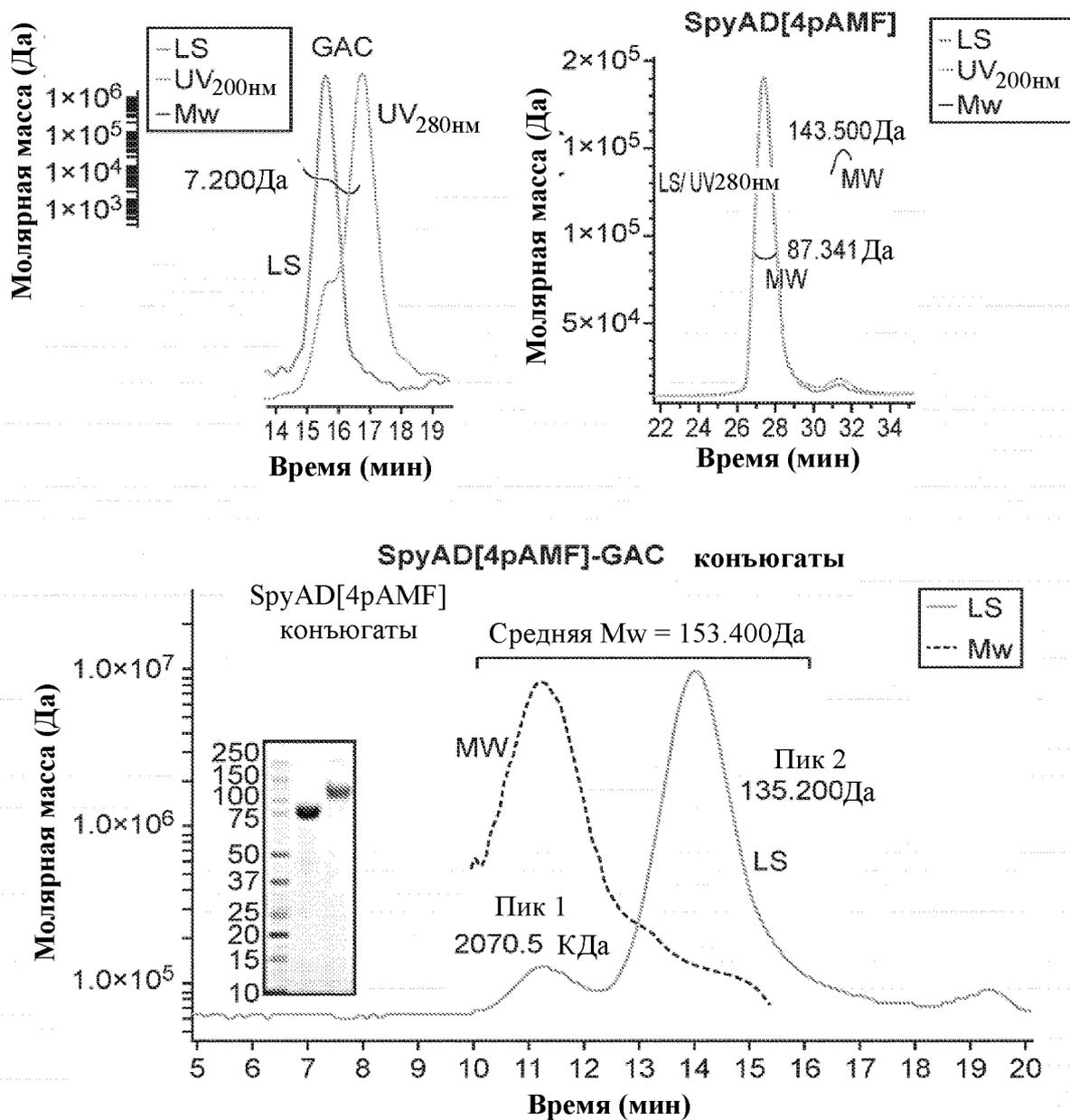
ФИГ. 7

**ФИГ. 8**

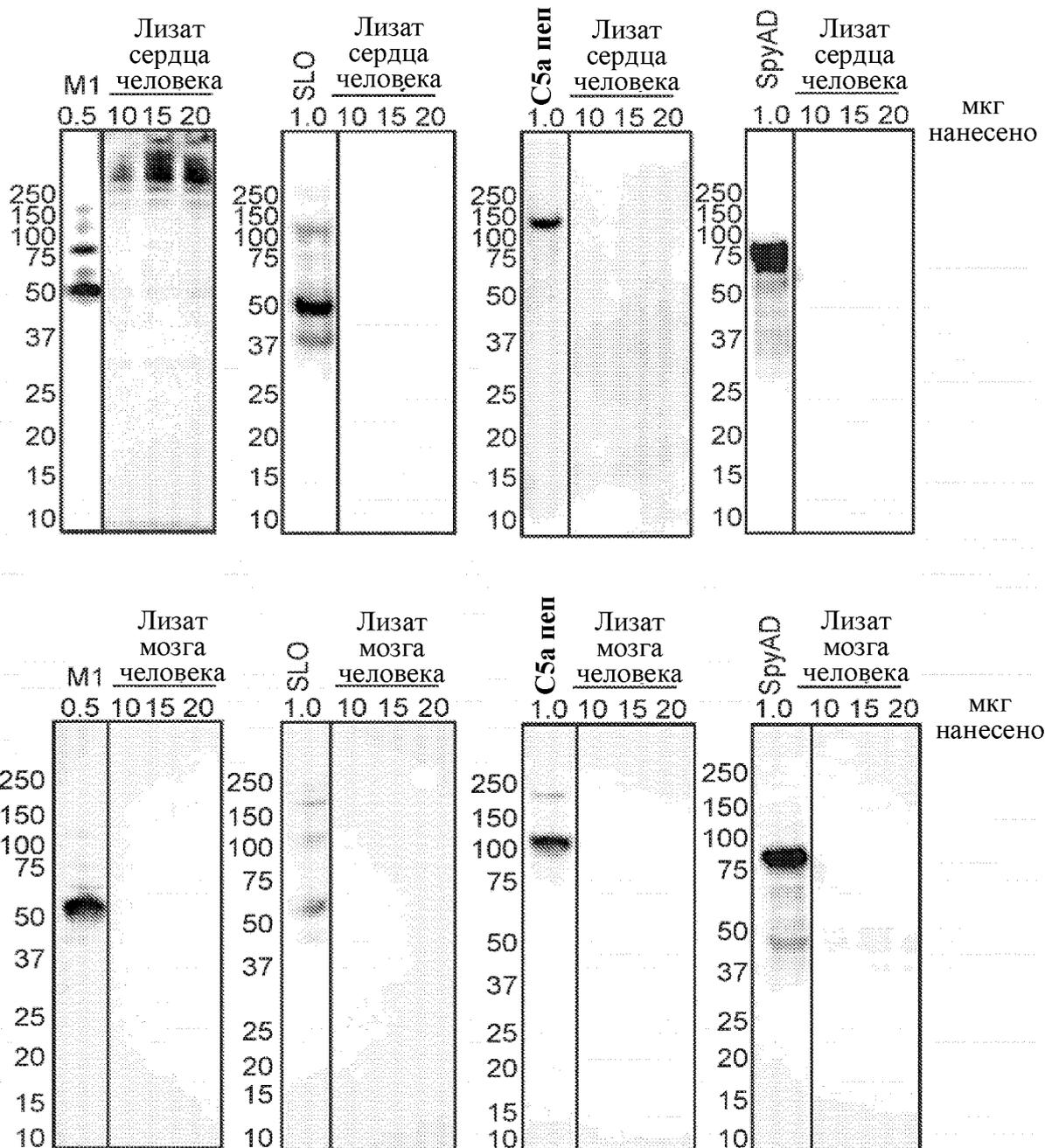




ФИГ. 9

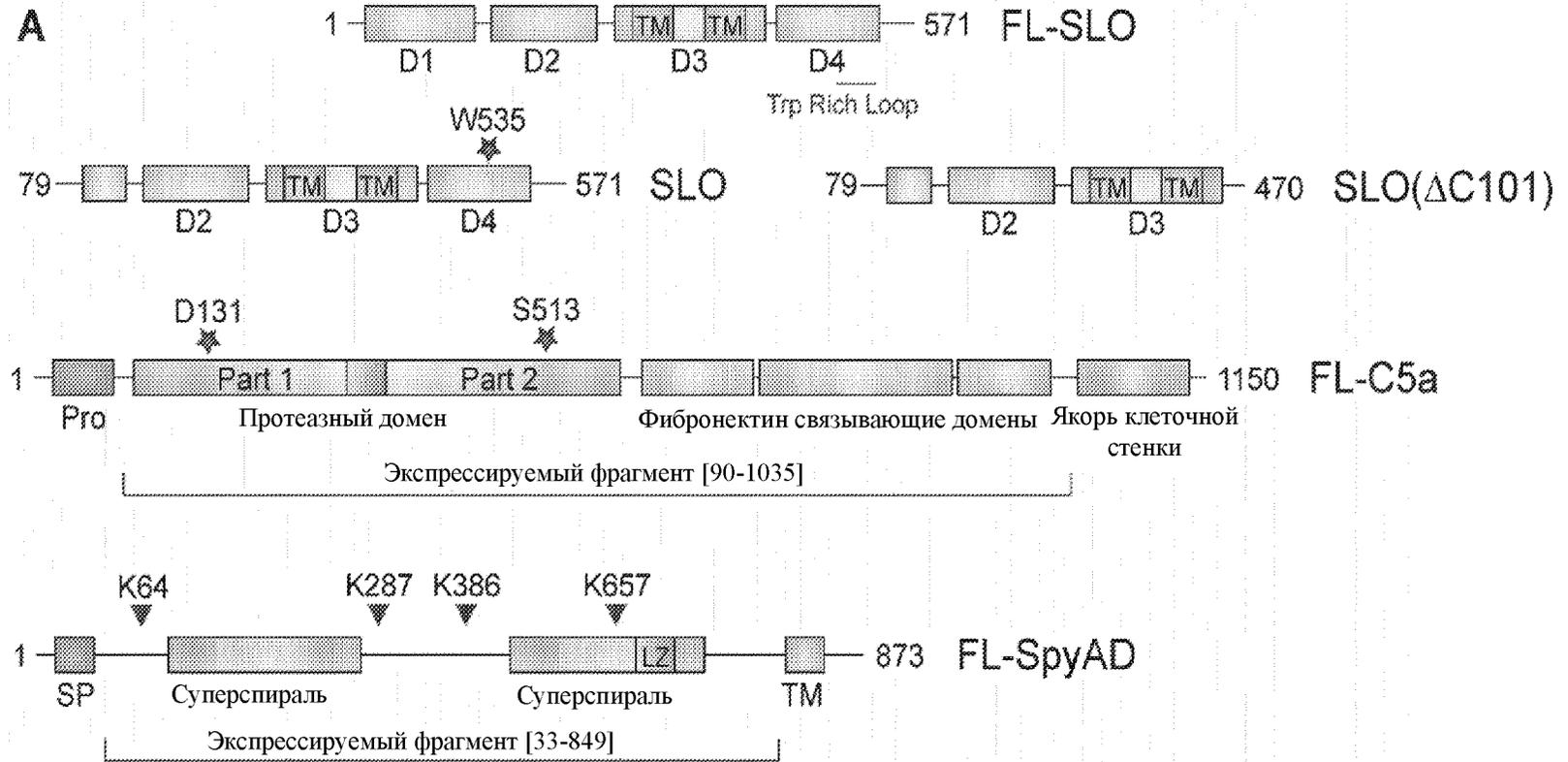


ФИГ. 10

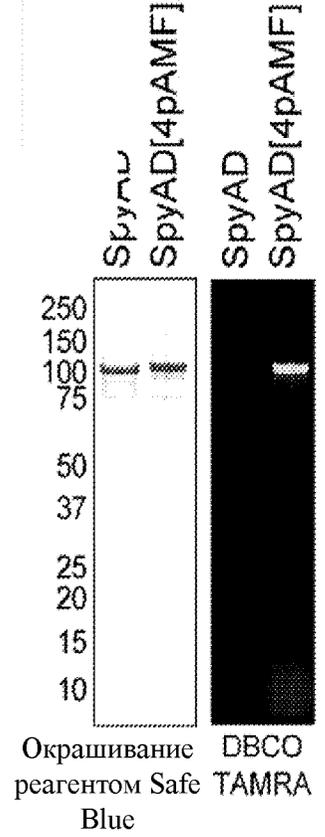
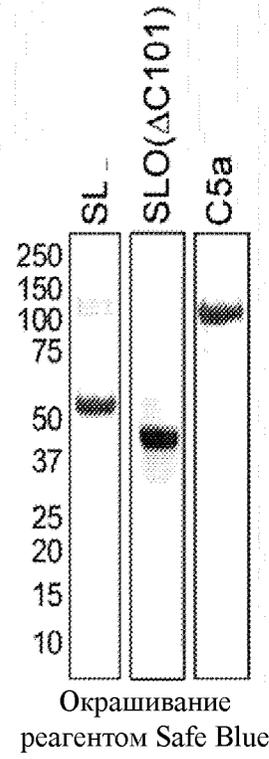
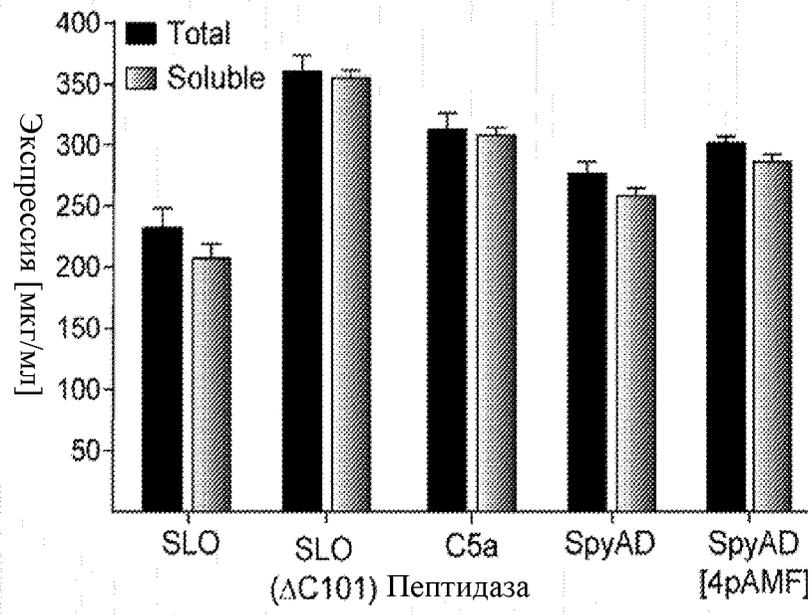


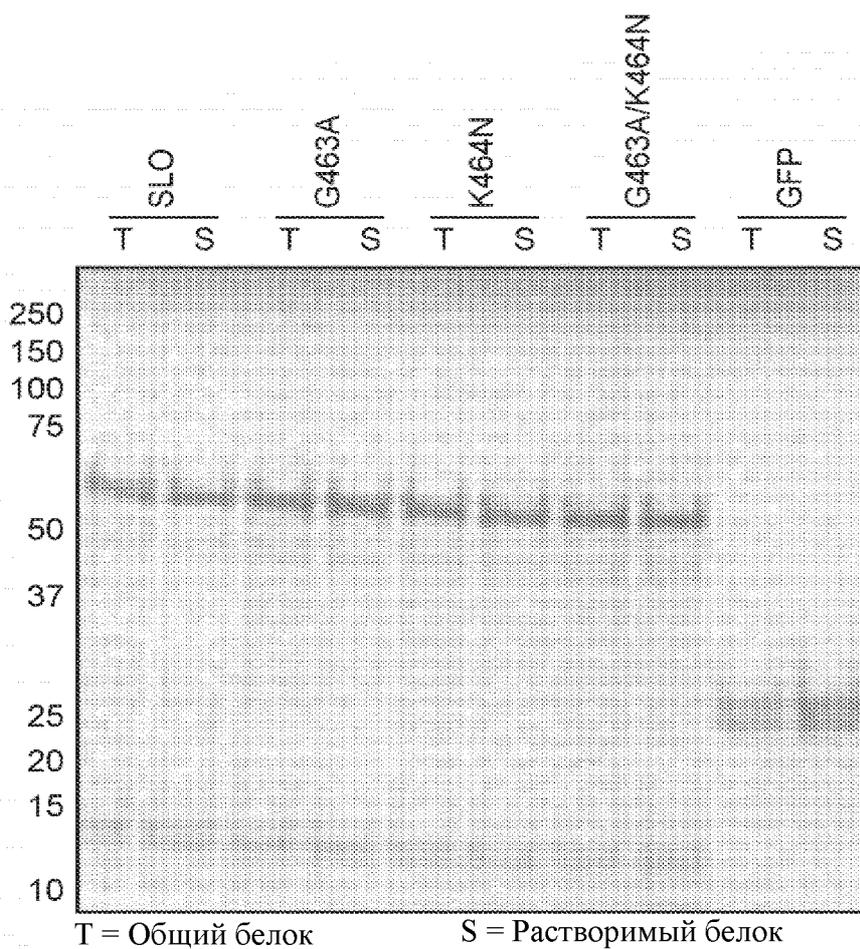
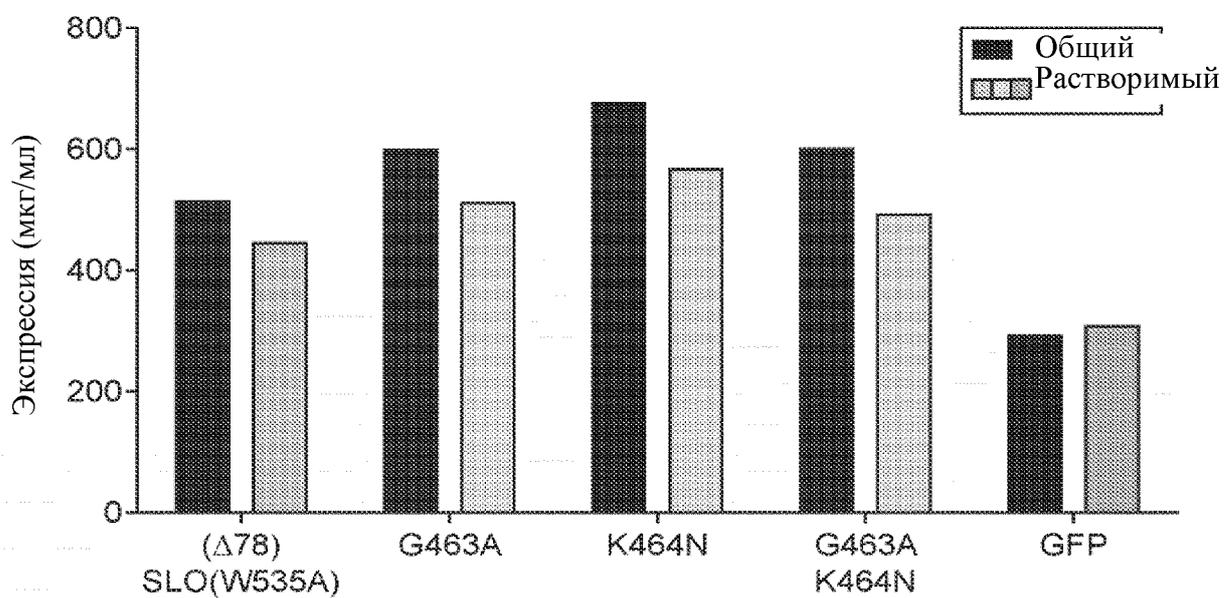
ФИГ. 11

**ФИГ. 12**



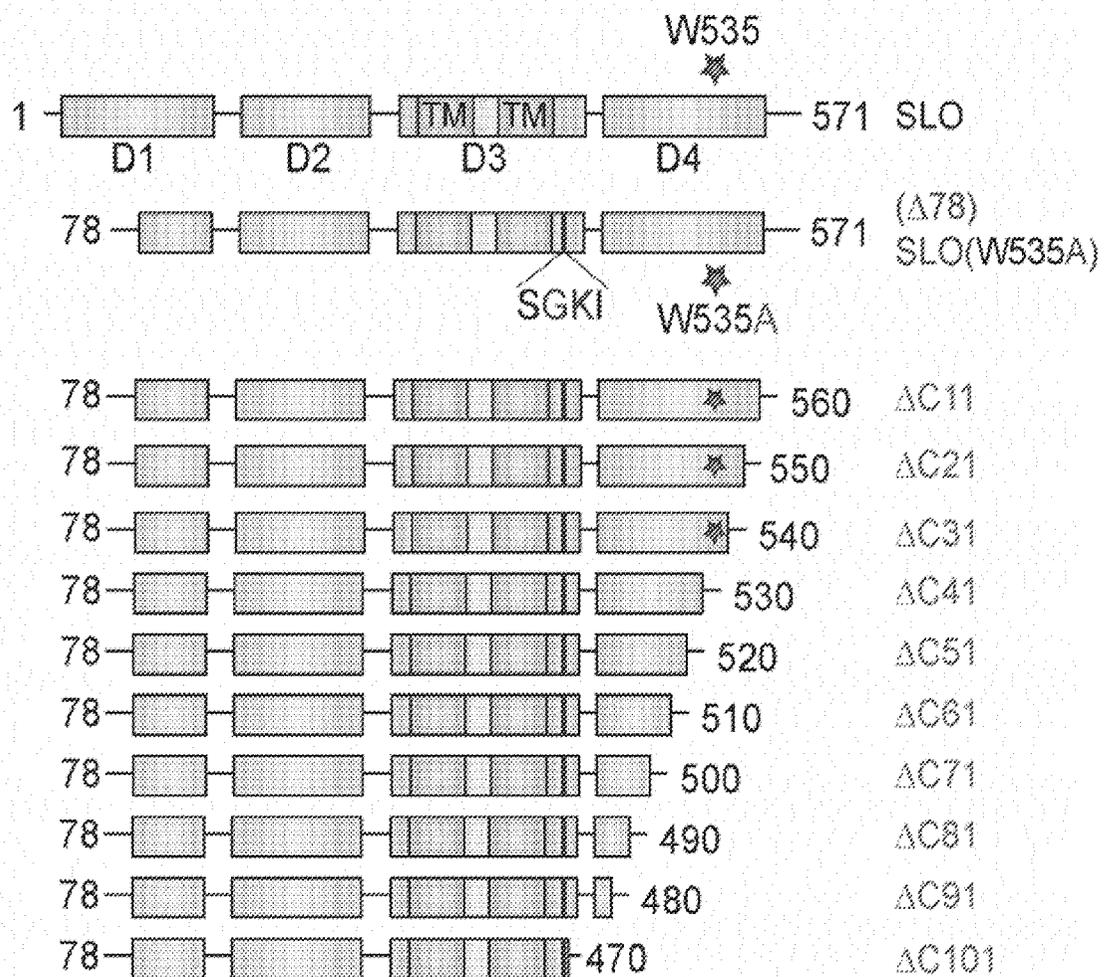
**ФИГ. 13**

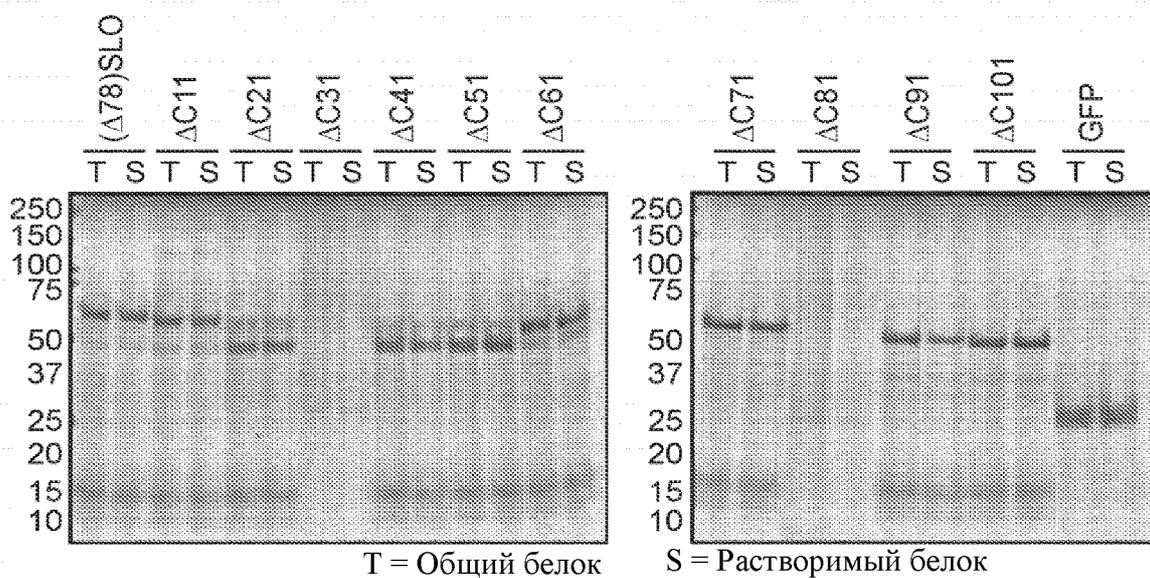
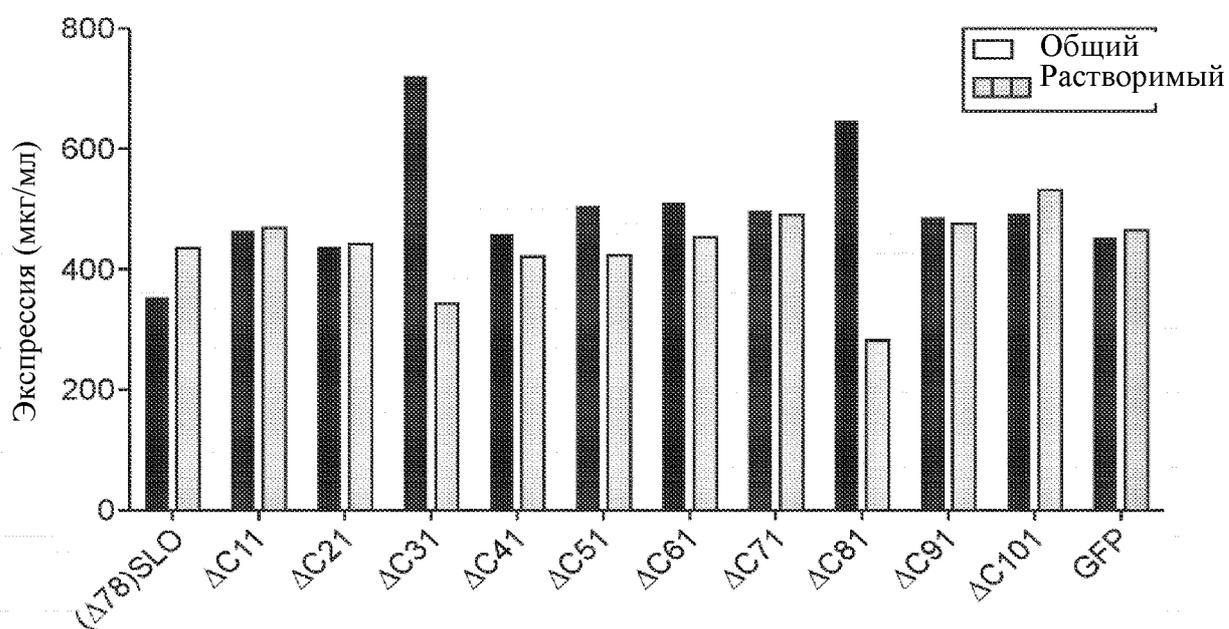




ФИГ. 14

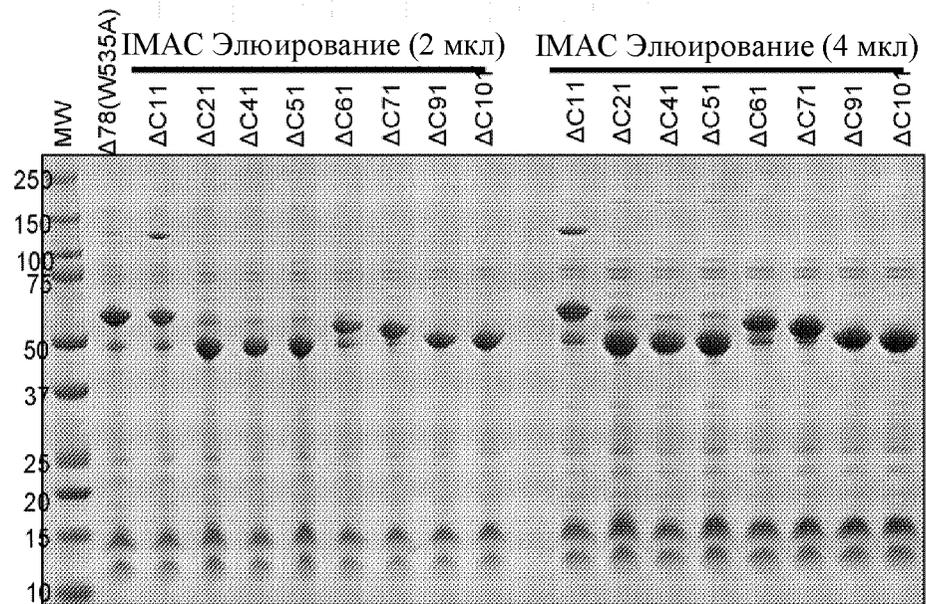
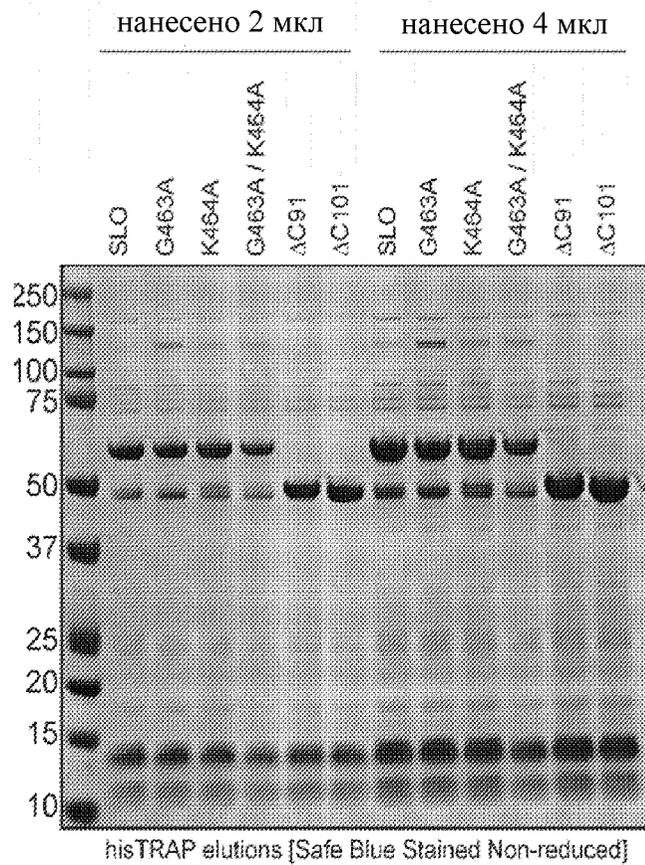
**ФИГ. 15**



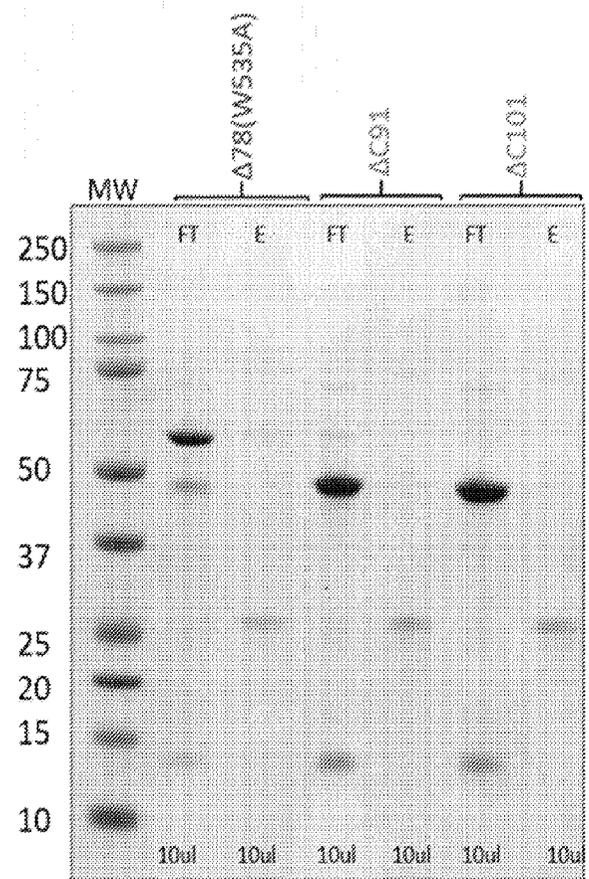


ФИГ. 16

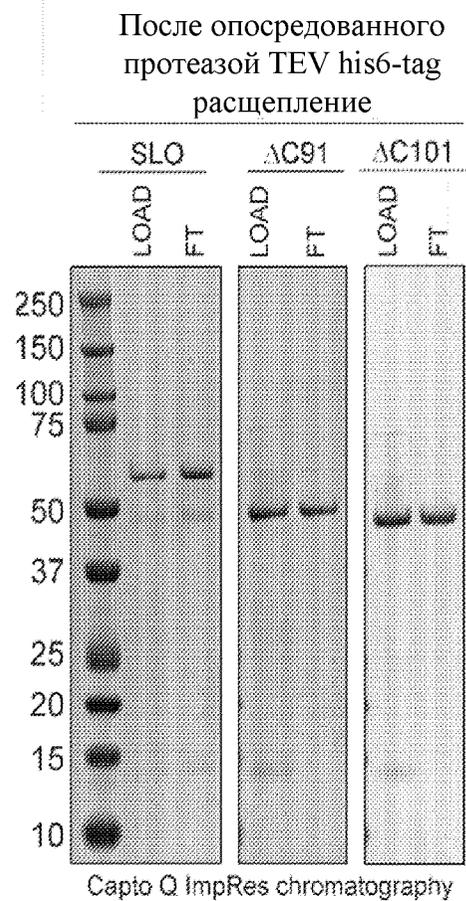
**ФИГ. 17**



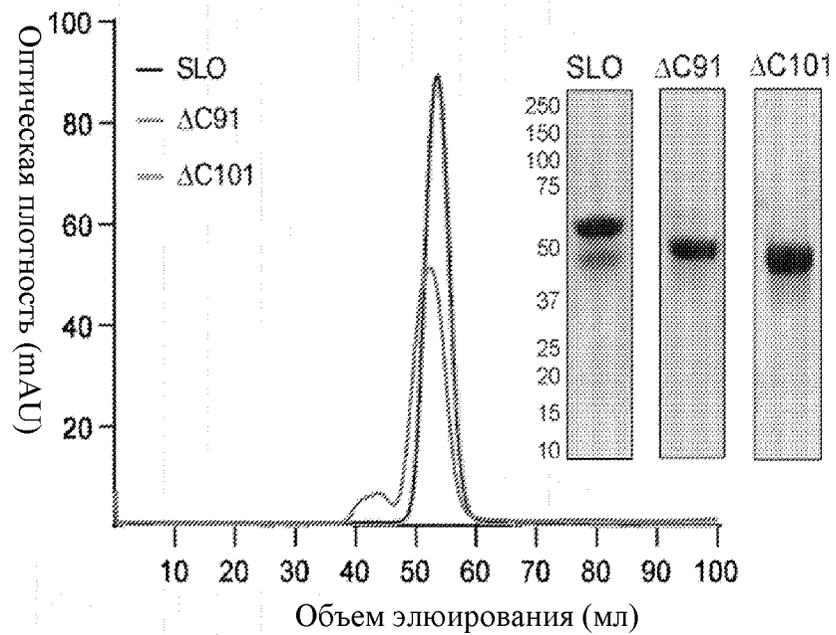
**ФИГ. 18**



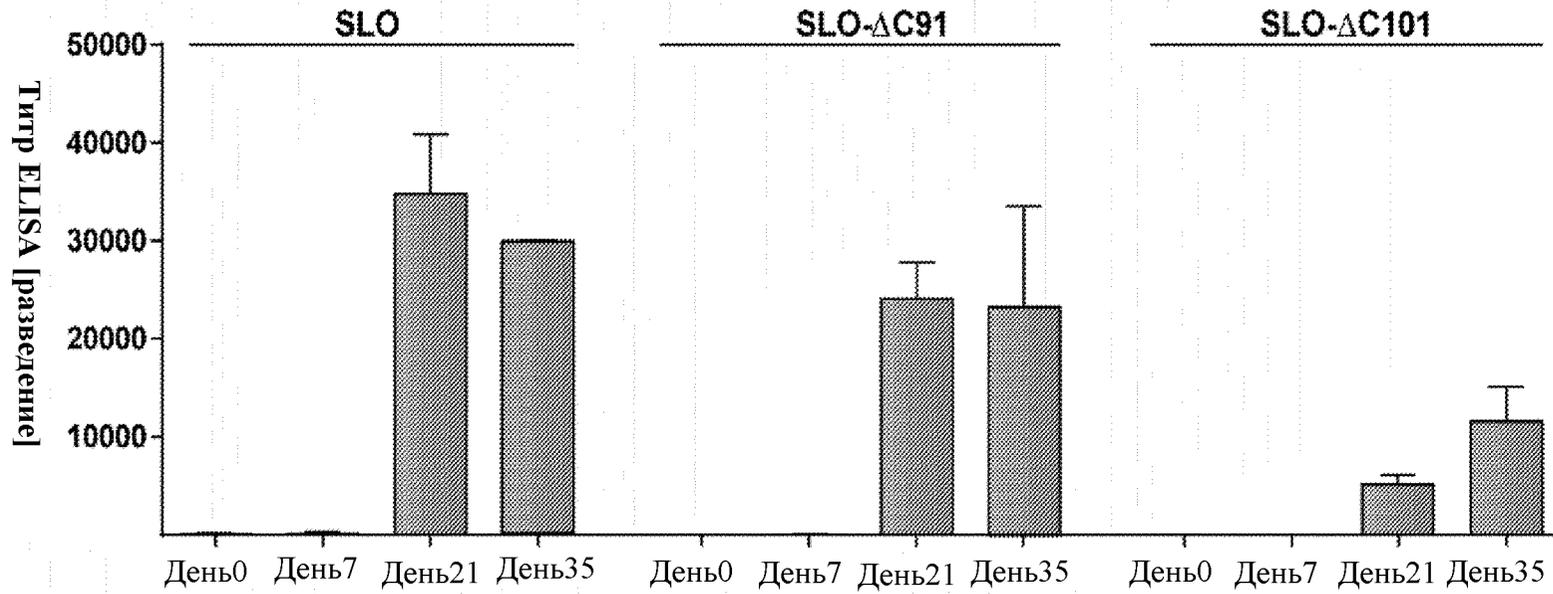
**ФИГ. 19**



Хроматография на колонке Superdex 75 16/60



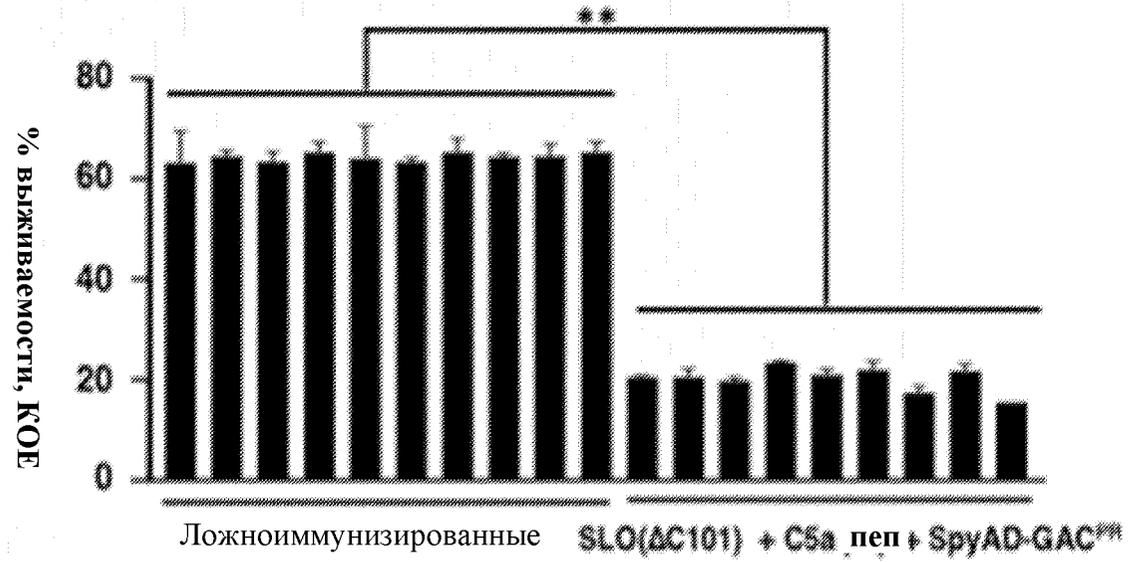
**ФИГ. 20**



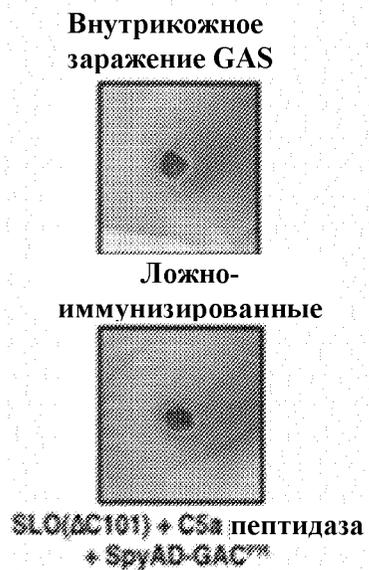
Доза иммунизации: 50 мкг + алюминиевые квасцы /  
внутримышечная (I.M.) инъекция  
ELISA выполняли против соответствующего антигена

**ФИГ. 21**

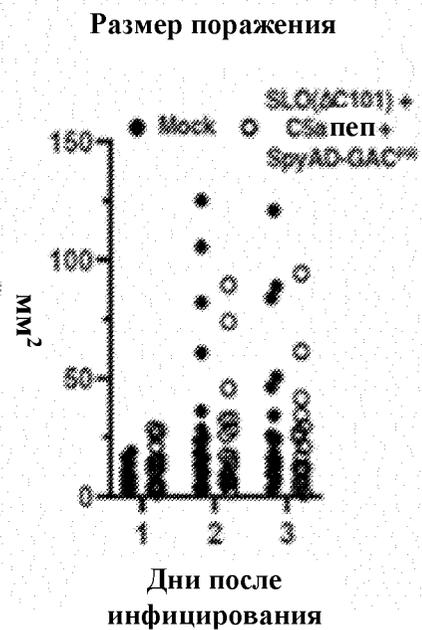
**Уничтожение ОРК человеческими нейтрофилами с помощью индивидуальной мышинной сыворотки**



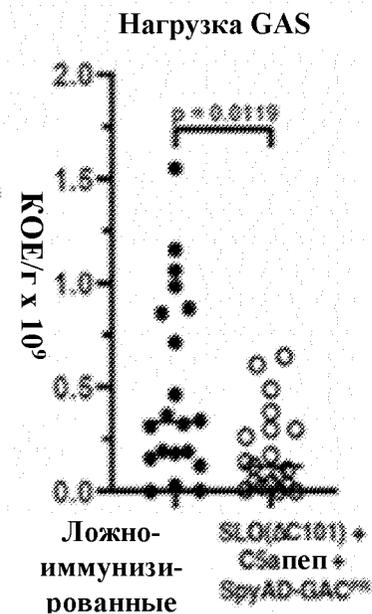
**ФИГ. 22А**



**ФИГ. 22В**

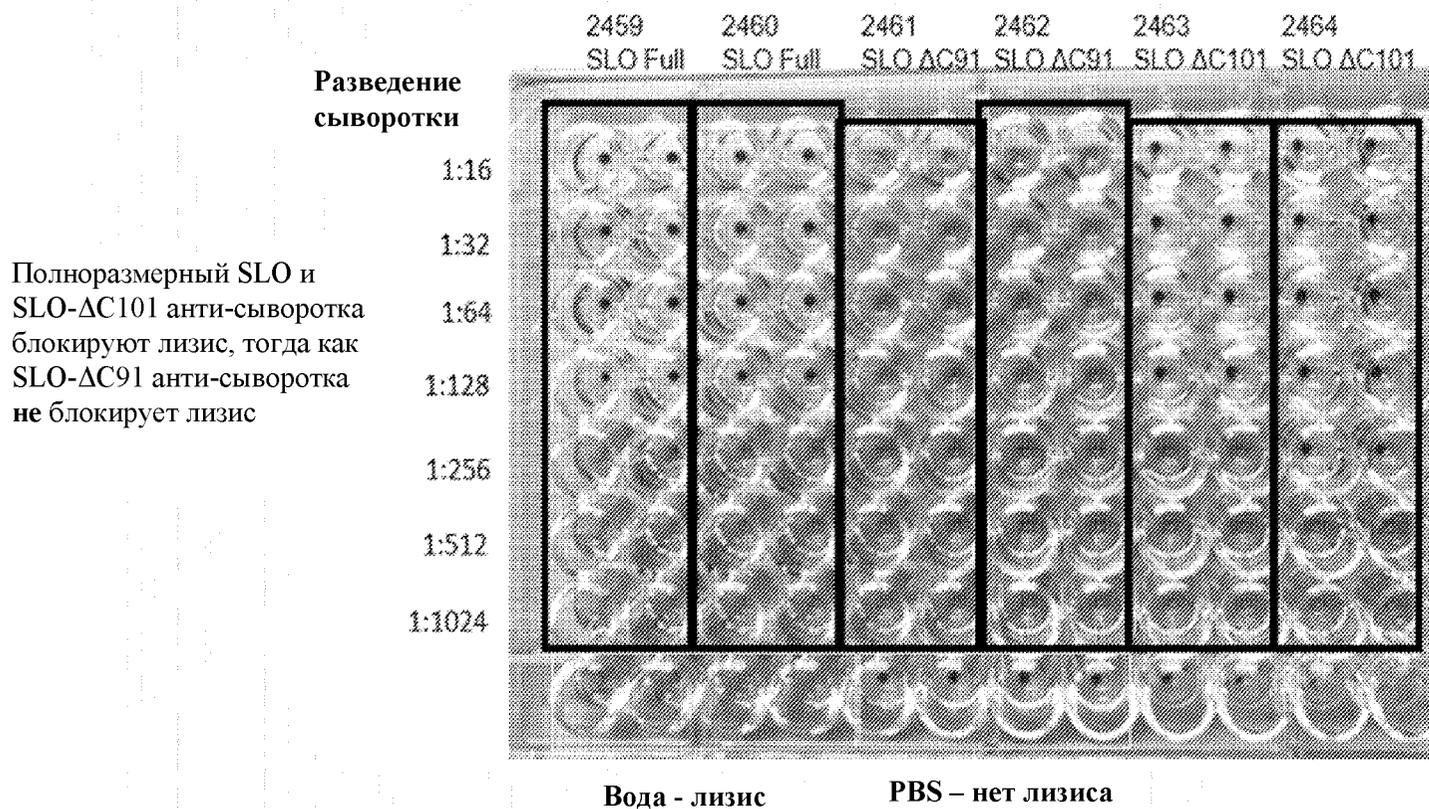


**ФИГ. 22С**

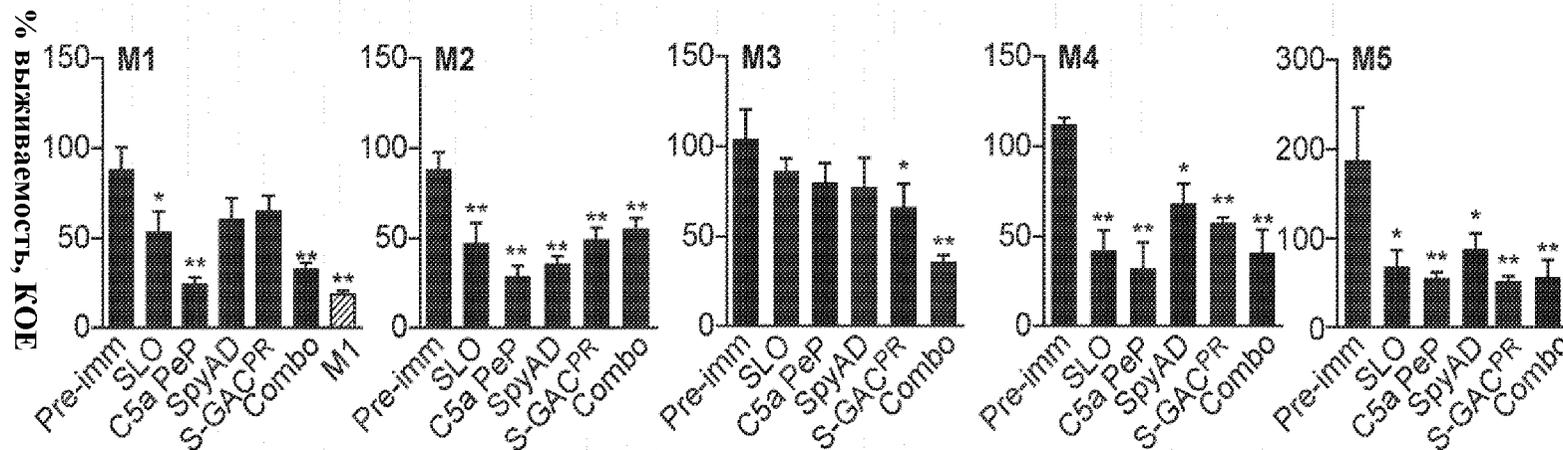


**ФИГ. 23**

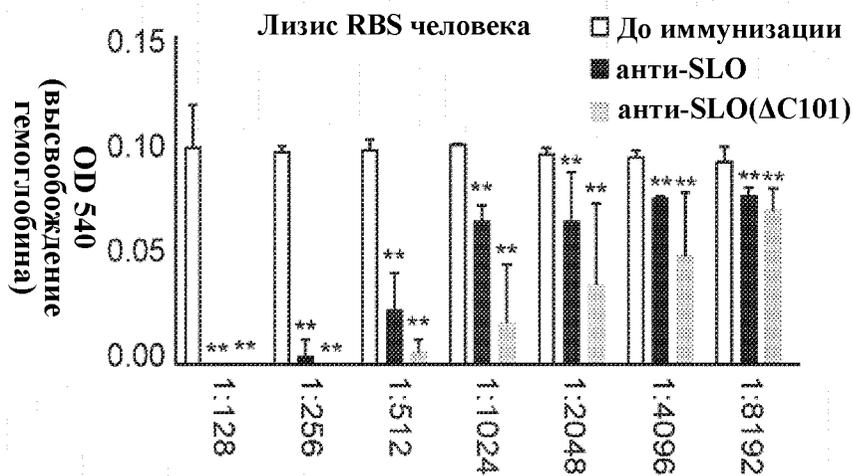
0,1 мкг/мл рекомбинантного SLO добавляли во все лунки в темных боксах



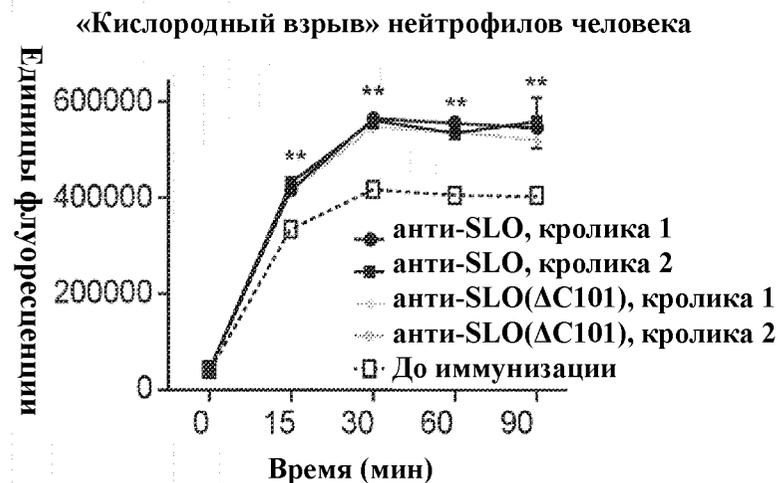
Опсонфагоцитарное уничтожение нейтрофилами человека



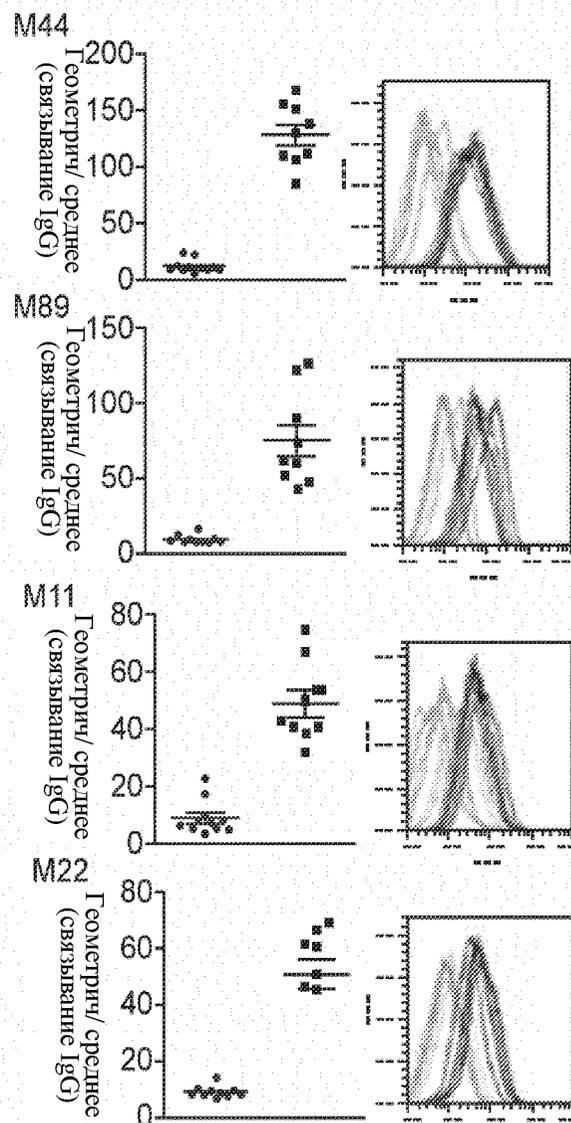
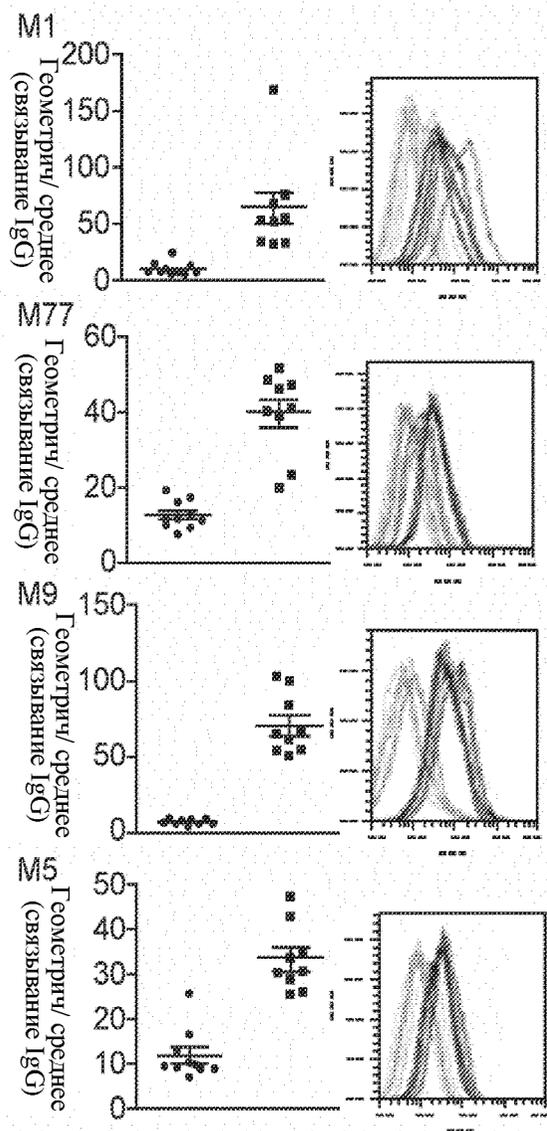
ФИГ. 24А



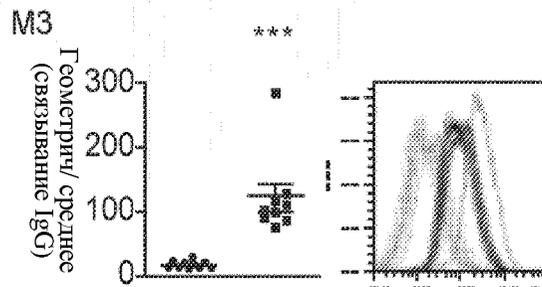
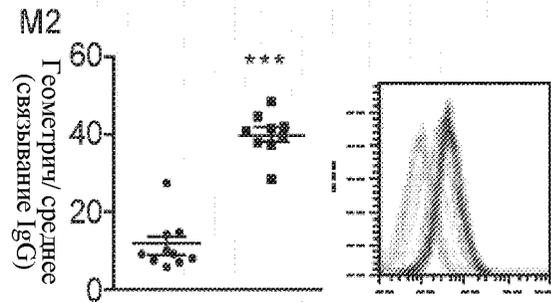
ФИГ. 24В



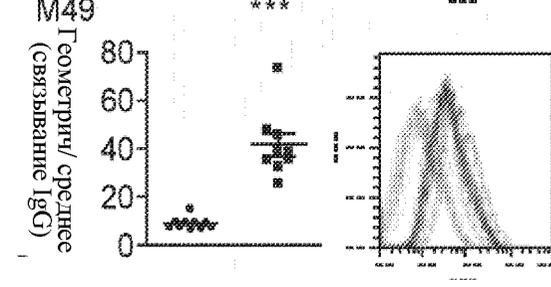
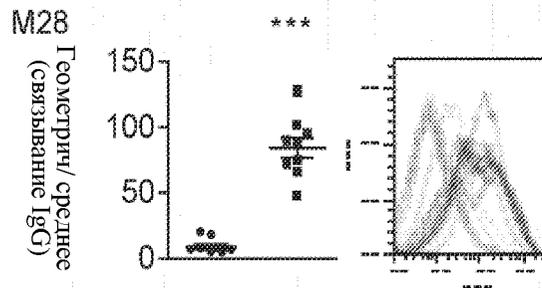
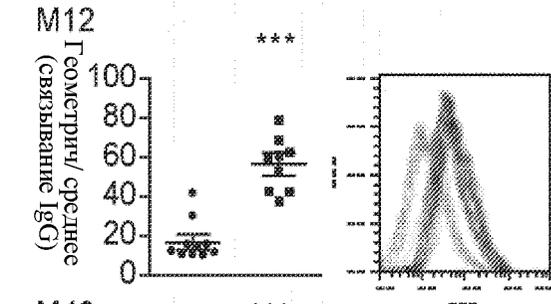
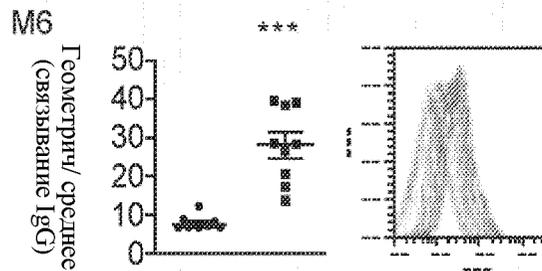
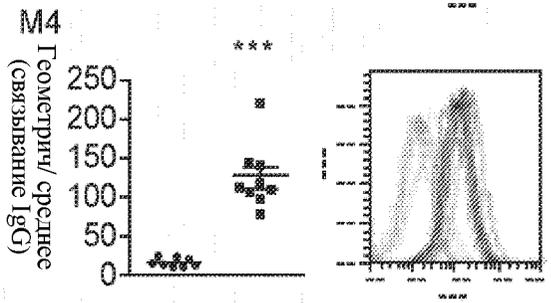
ФИГ. 24С



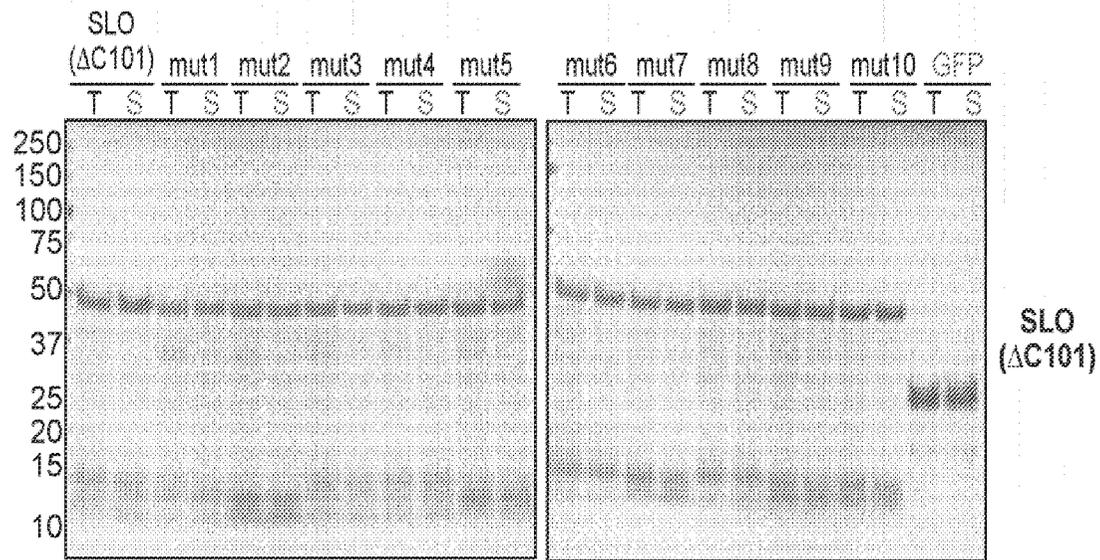
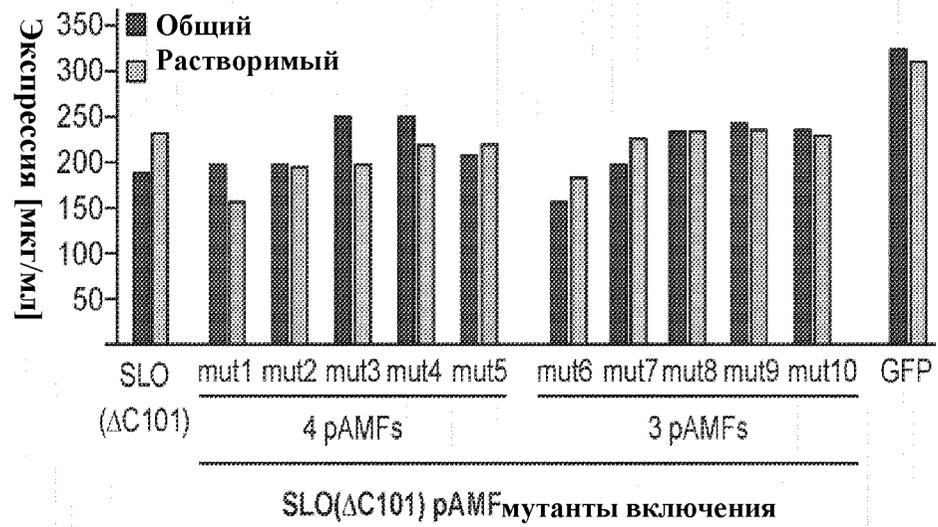
**ФИГ. 25А**



Ложнообработанные мыши:  
светлые линии  
Обработанные иммунной  
сывороткой мыши: темные  
линии



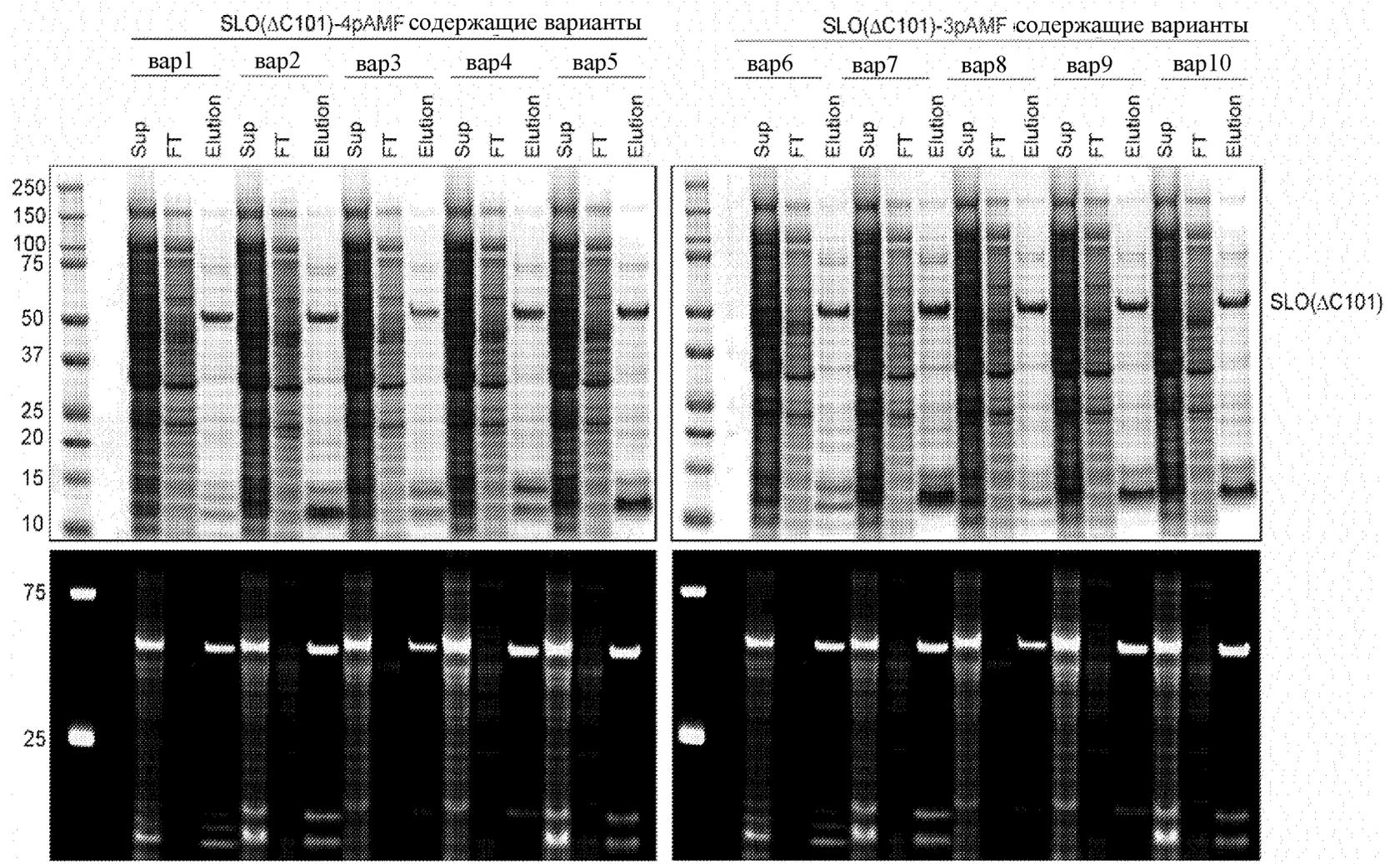
**ФИГ. 25В**



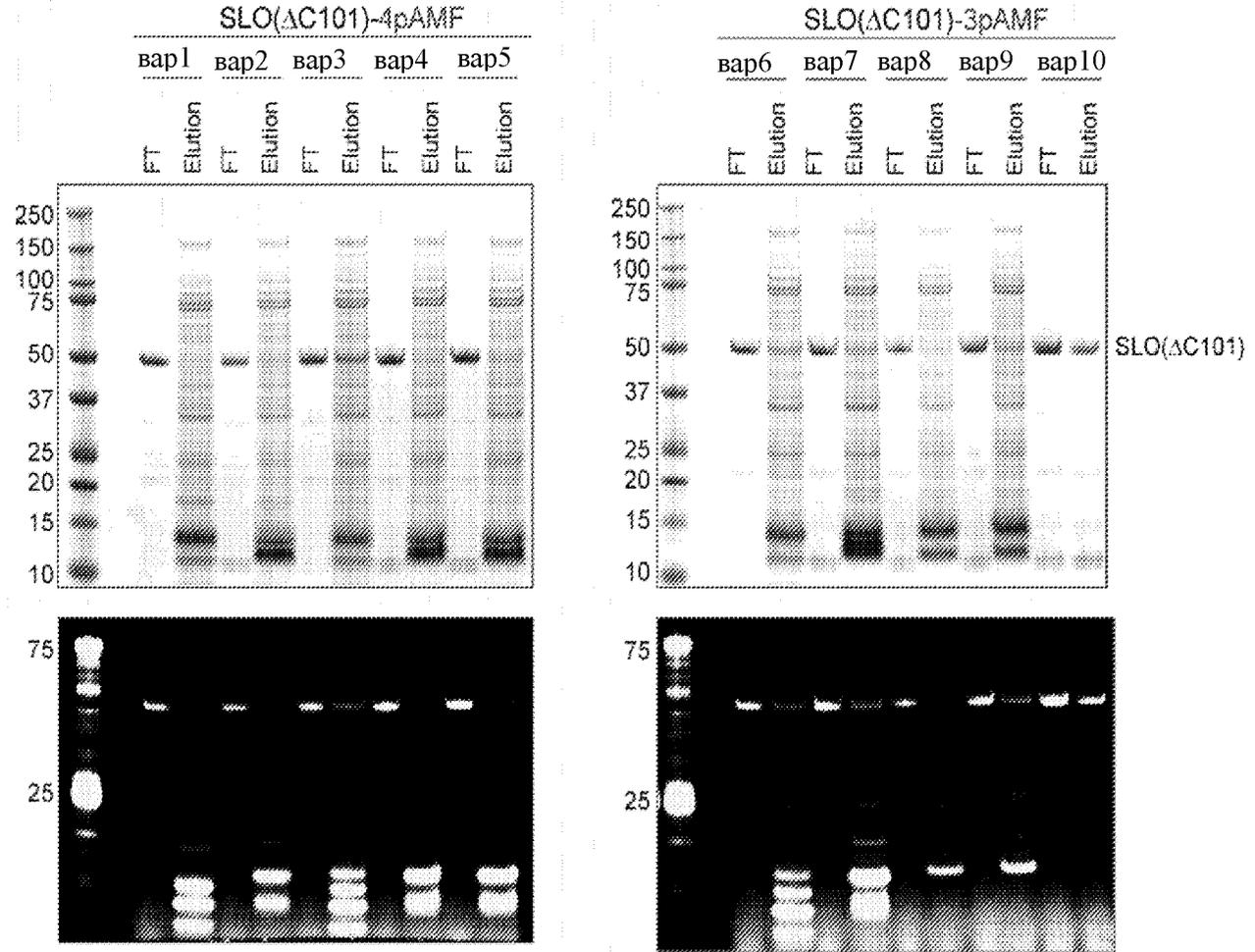
Ауторадиограмма включения <sup>14</sup>C-лейцина

ФИГ. 26

**ФИГ. 27А**



**ФИГ. 27В**



**ФИГ. 28**

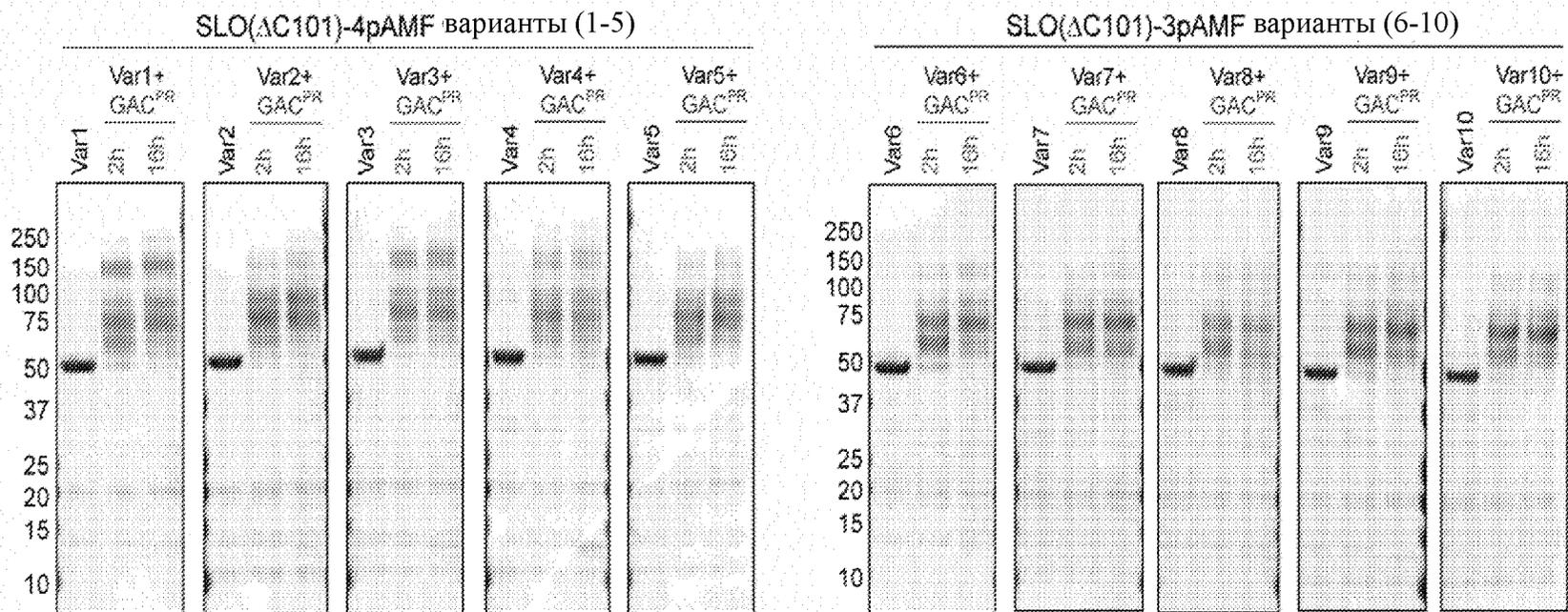
**Инкубация DBCO-derivatизированного GAC с вариантами SLO при 25C в течение ночи**

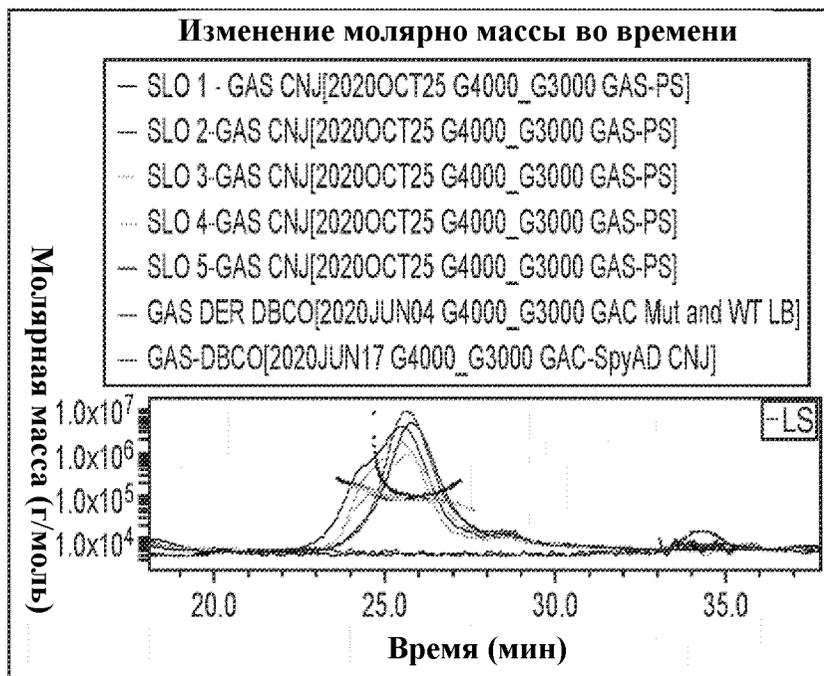
Реакция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Белок	60.0	48.0	80.0	48.0	40.0	17.8	20.9	48.0	21.8	30.0	
PS-DBCO	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	424.8
Буфер (10x PBS)	6.0	12.0	6.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	
Вода	11.5	17.5	-8.5	17.5	25.5	47.7	44.7	17.5	43.7	35.5	
Всего	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	

Исходный раствор белка	Вар1	Вар2	Вар3	Вар4	Вар5	Вар6	Вар7	Вар8	Вар9	Вар10	мг/мл
	0.8	1.0	0.6	1.0	1.2	2.7	2.3	1.0	2.2	1.6	

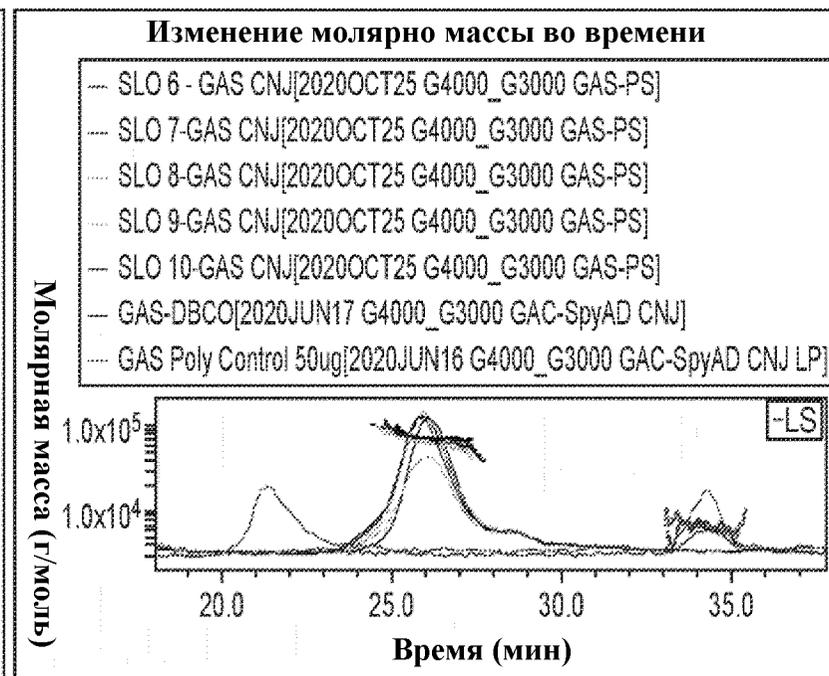
Исходный раствор PS-DBCO	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	мг/мл

# ФИГ. 29





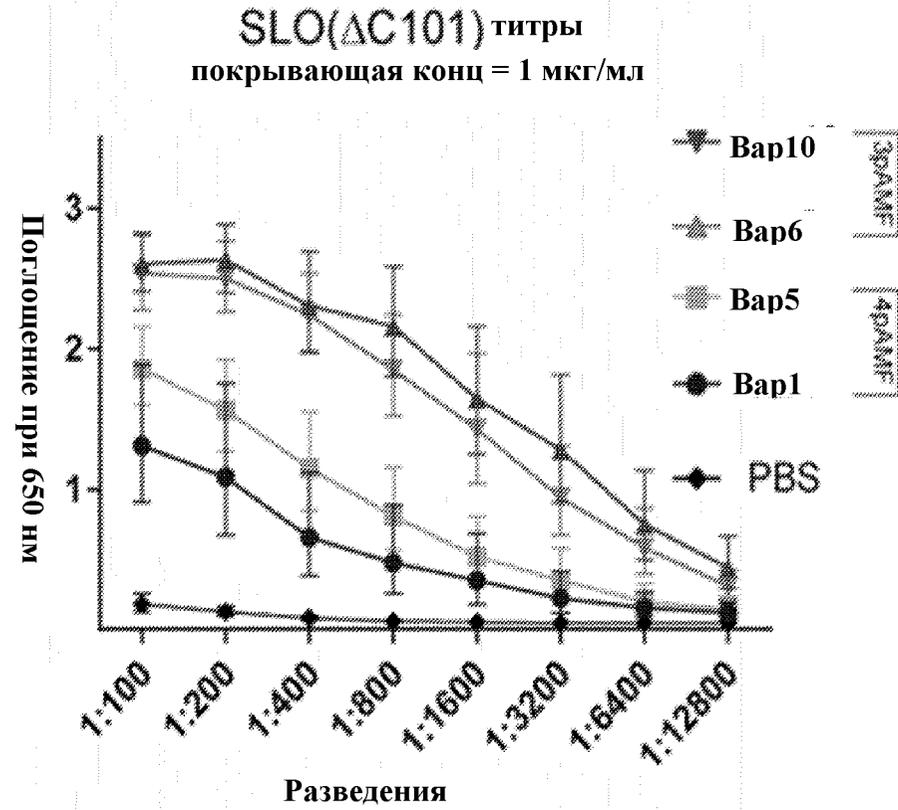
Образец ID	Mw (кДа)
SLO 1 - GAC CNJ	97.1
SLO 2 - GAC CNJ	78.5
SLO 3 - GAC CNJ	90.4
SLO 4 - GAC CNJ	79.1
SLO 5 - GAC CNJ	116
GAC DER DBCO	6.2
GAC-DBCO	6.6



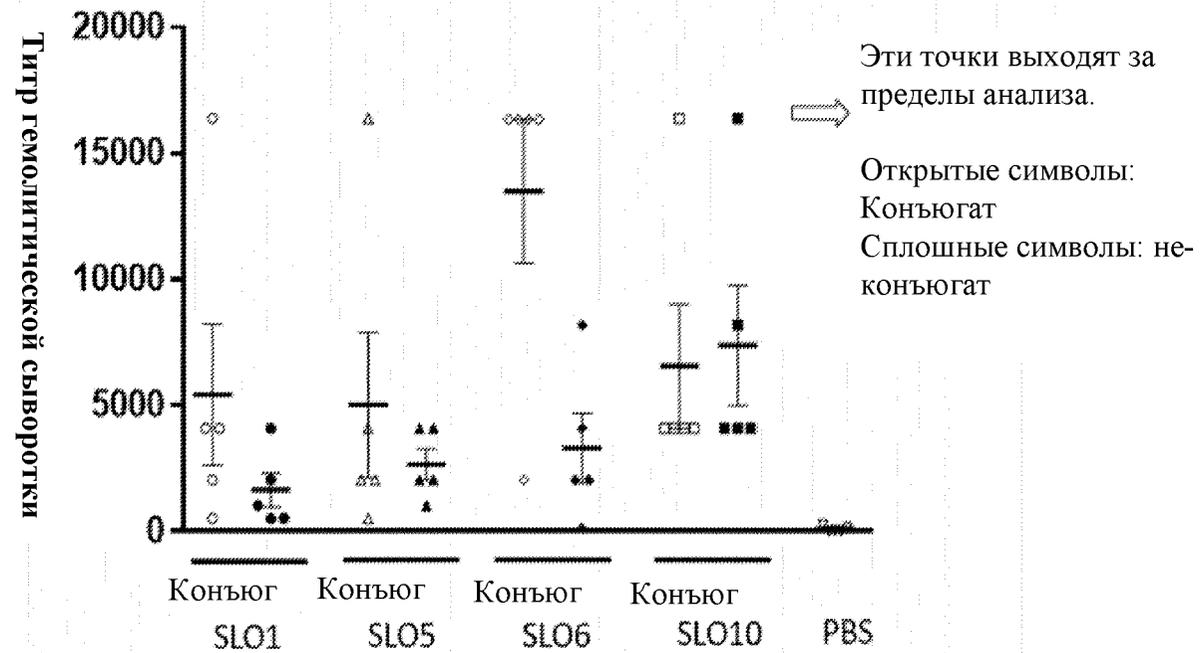
Образец ID	Mw (кДа)
SLO 6 - GAC CNJ	67.4
SLO 7 - GAC CNJ	72.6
SLO 8 - GAC CNJ	62.6
SLO 9 - GAC CNJ	69.6
SLO 10 - GAC CNJ	73.3
GAC DER DBCO	6.6
GAC-Mut no Der	6.9

**ФИГ. 30**

**ФИГ. 31А**

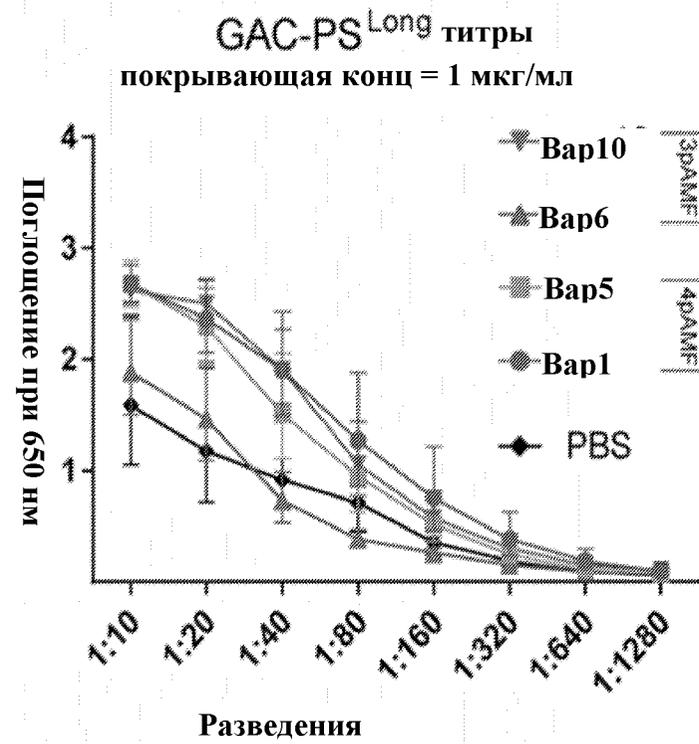


**ФИГ. 31В**

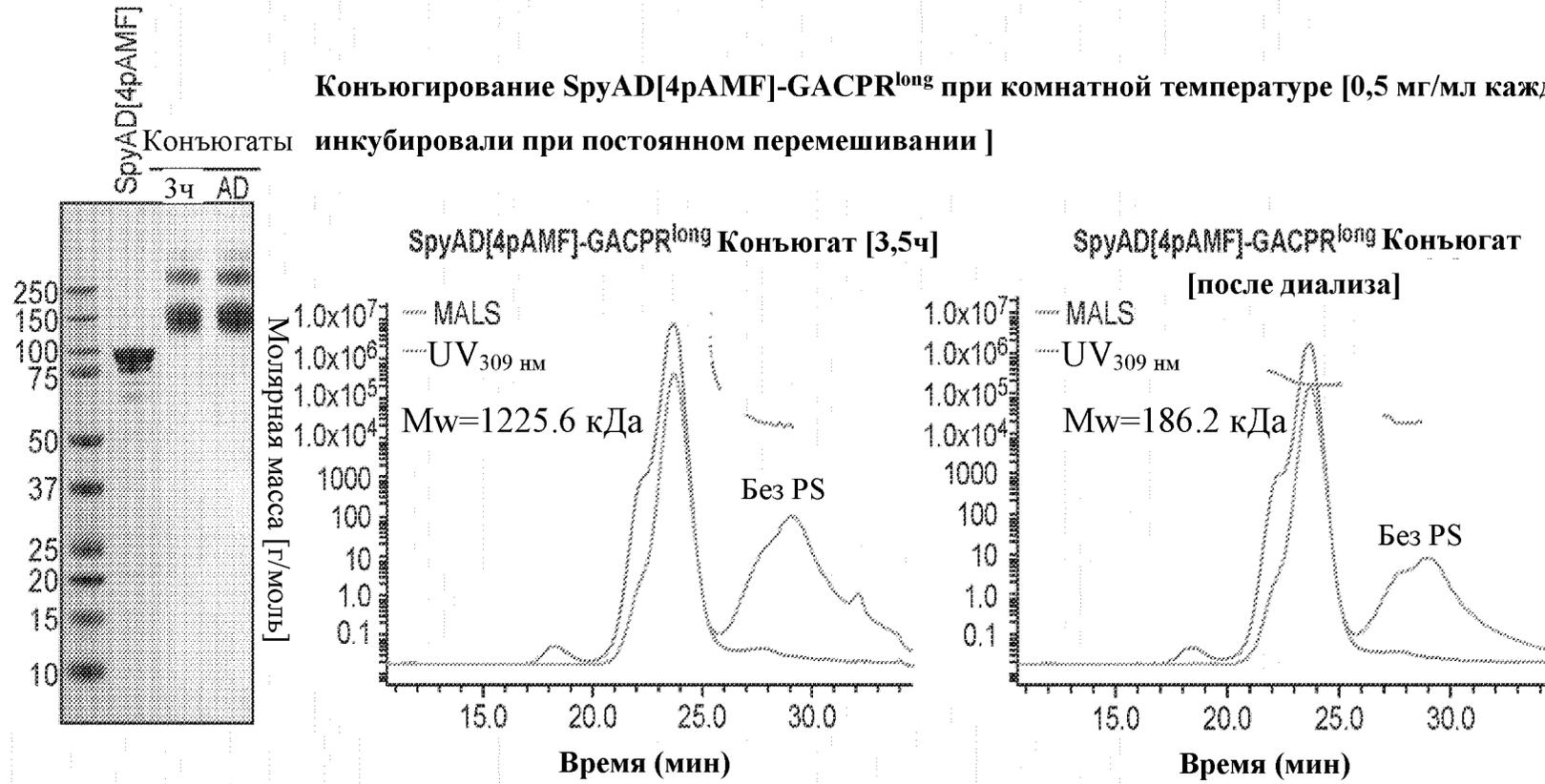


Каждый титр регистрировали как точку, в которой гемолиз достигал половины от контрольного лизиса (H<sub>2</sub>O) 100% RBC

**ФИГ. 31С**

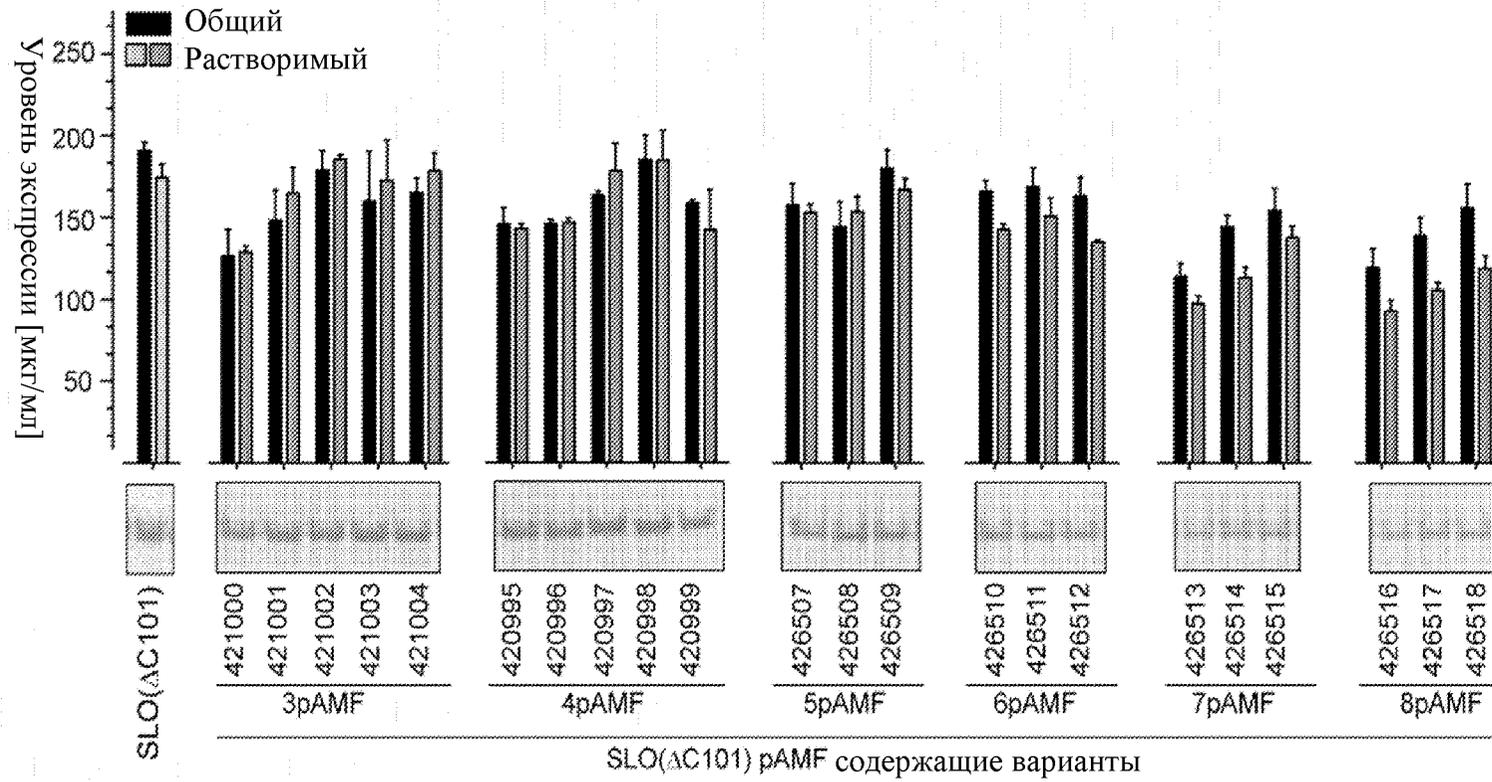


Конъюгирование SpyAD[4pAMF]-GACPR<sup>long</sup> при комнатной температуре [0,5 мг/мл каждого  
 инкубировали при постоянном перемешивании ]



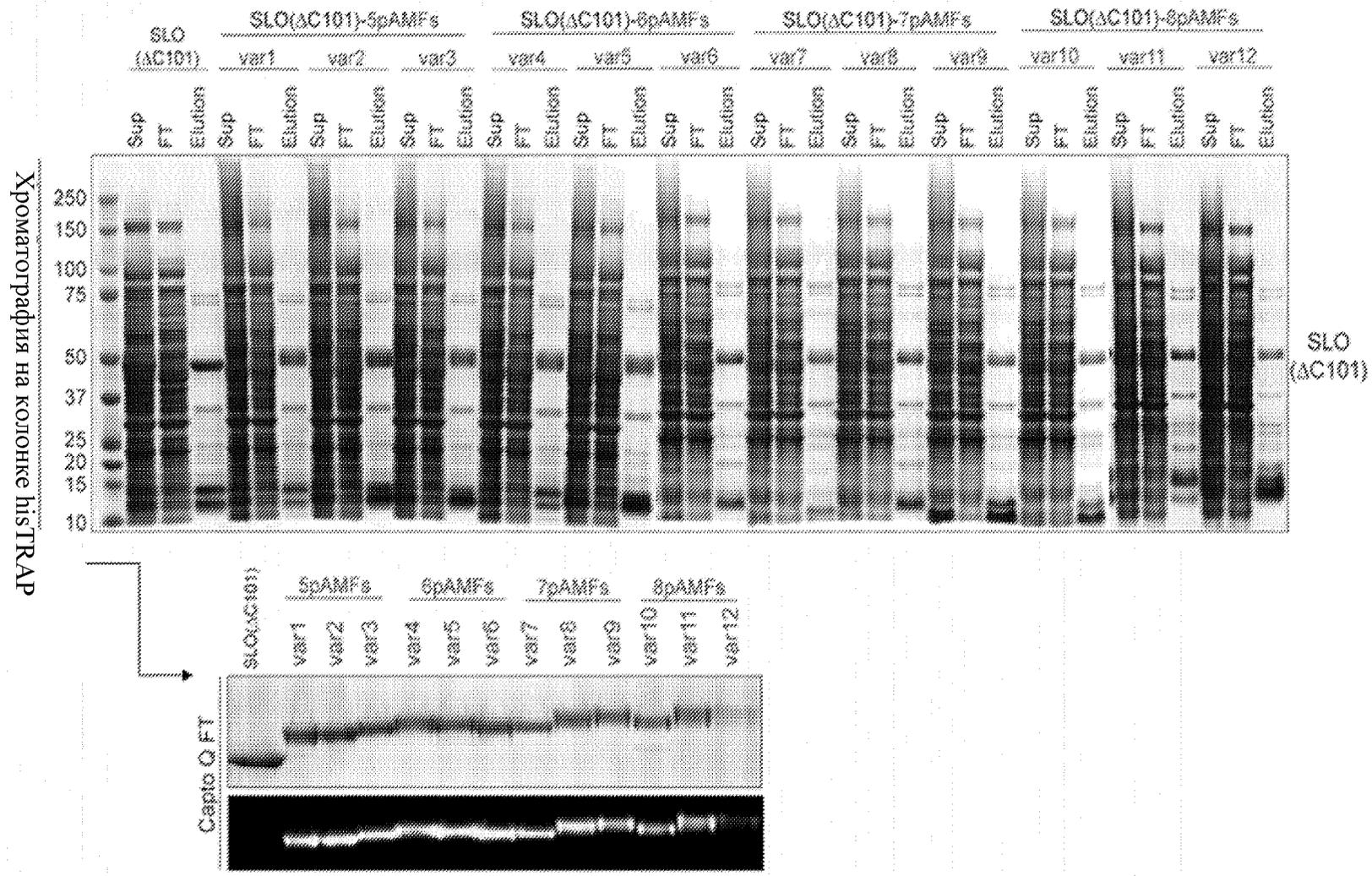
ФИГ. 32

ФИГ. 33А

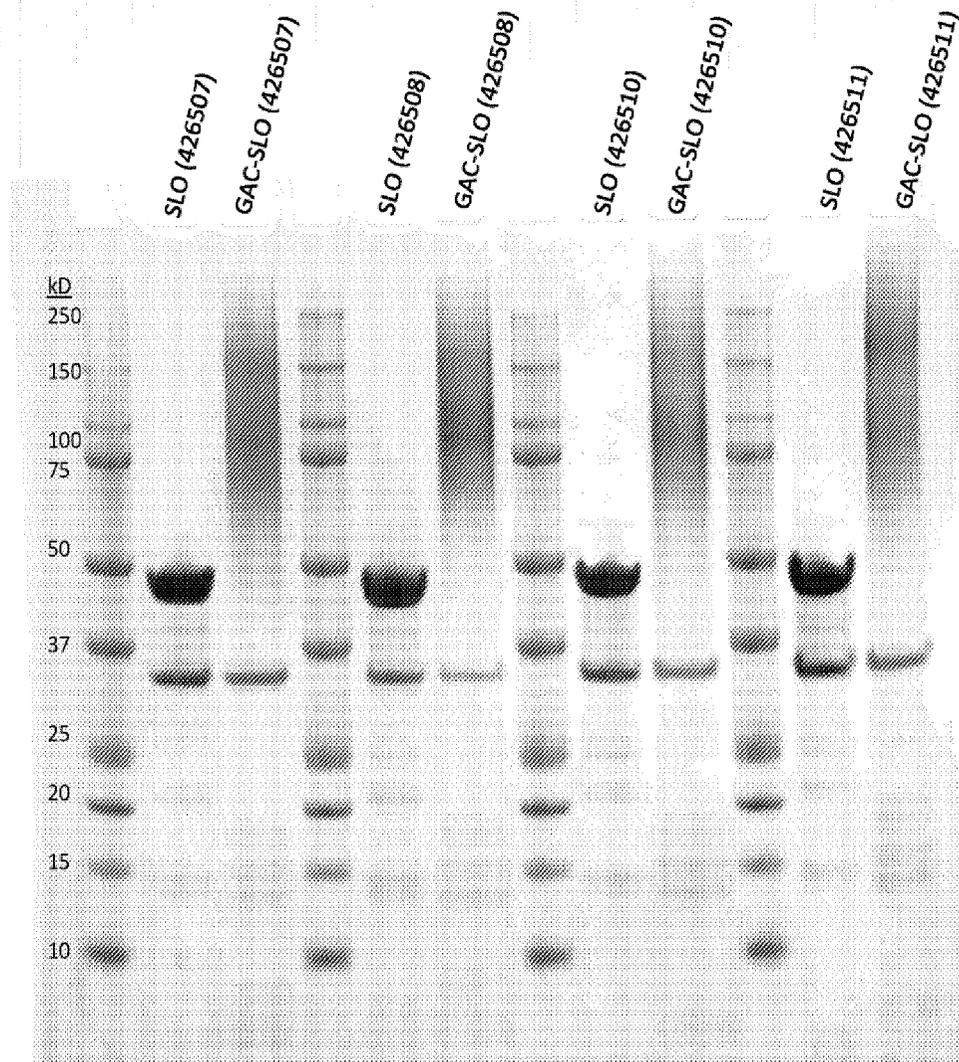


var – вариант; Elution – элюирование

**ФИГ. 33В**



**ФИГ. 34**



GAC Long:SLO – 0.5:0.5

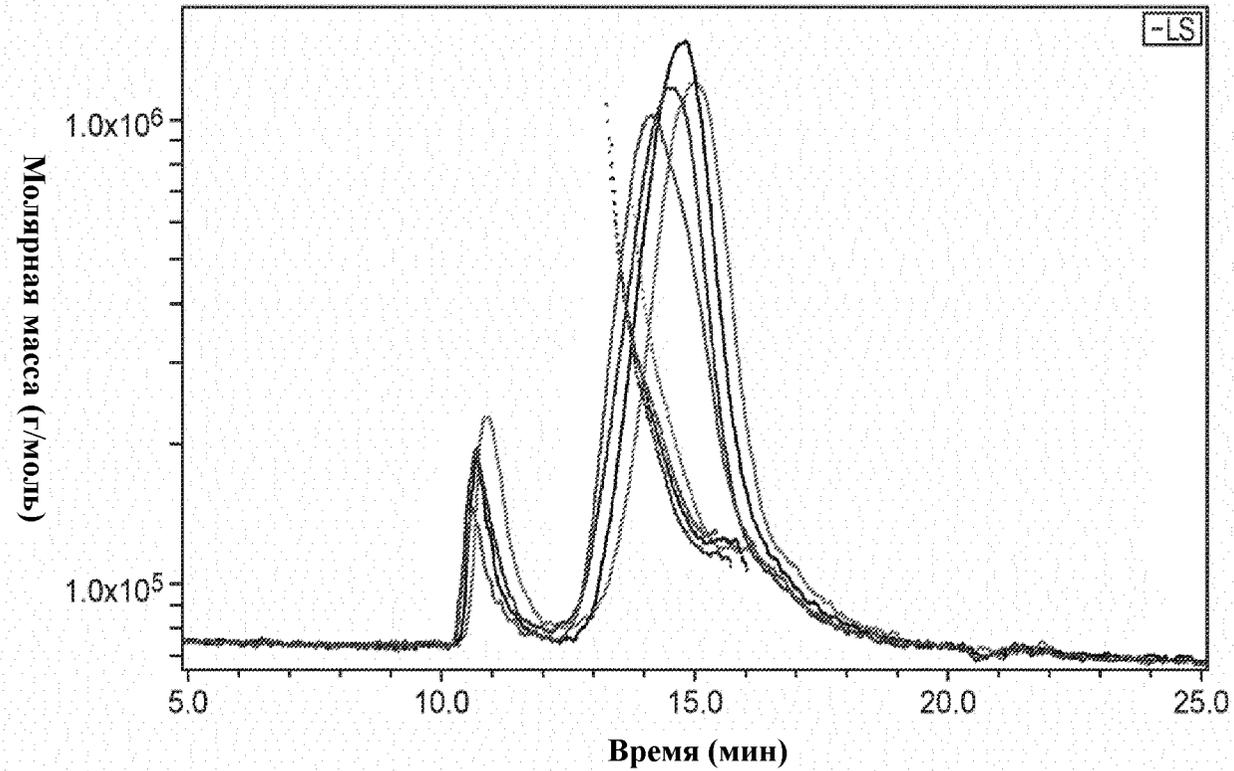
Реакция протекала в течение ночи, 650 об/мин, 22°C

Нагрузка образца: 10 мкл

Нагрузка белка: 5 мкг

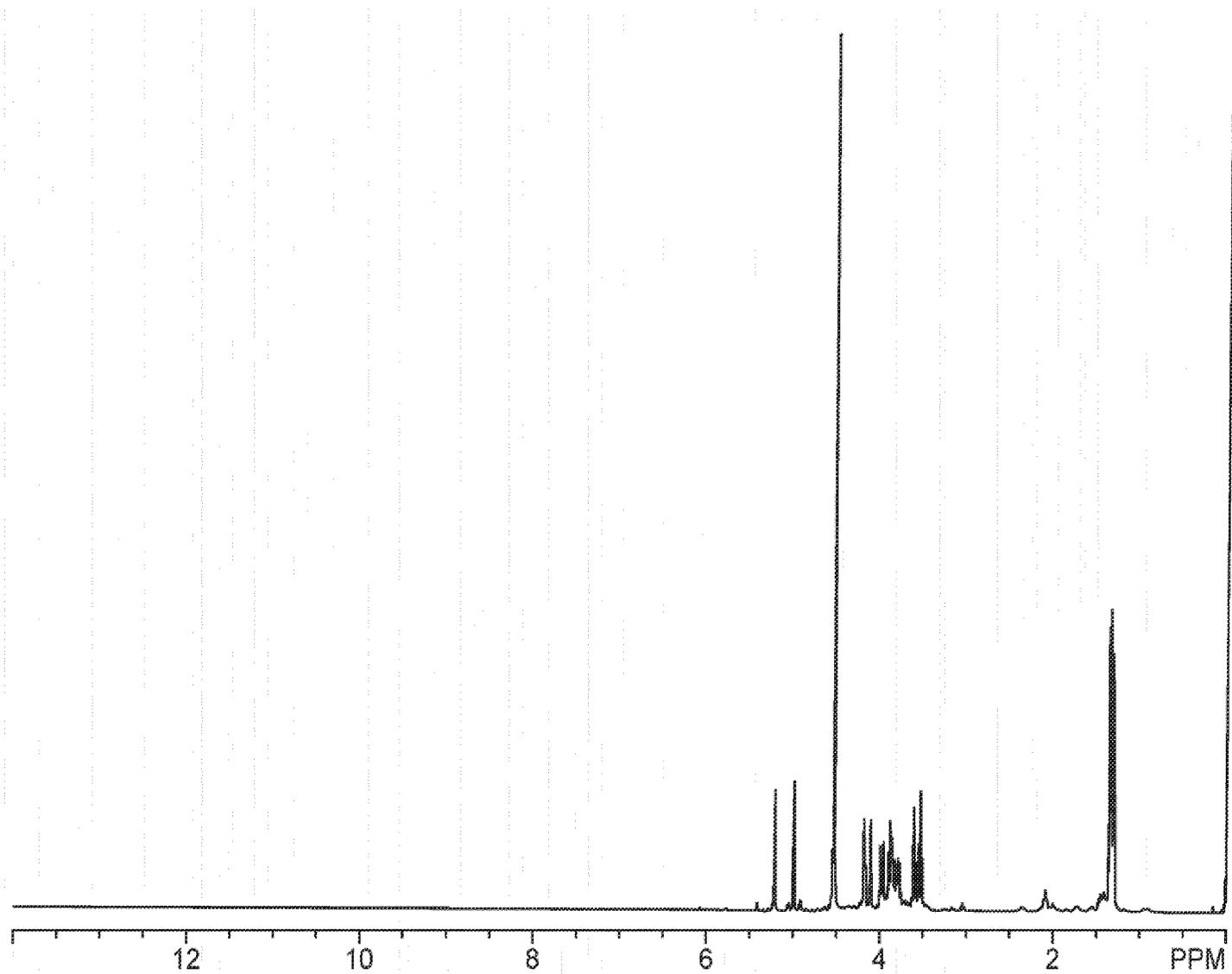
Изменение молярной массы во времени

— 426507[2021JAN22 GAC-SPY CNJ] — 426508[2021JAN22 GAC-SLO CNJ] — 426510[2021JAN22 GAC-SLO CNJ]  
 — 426511[2021JAN22 GAC-SLO CNJ]



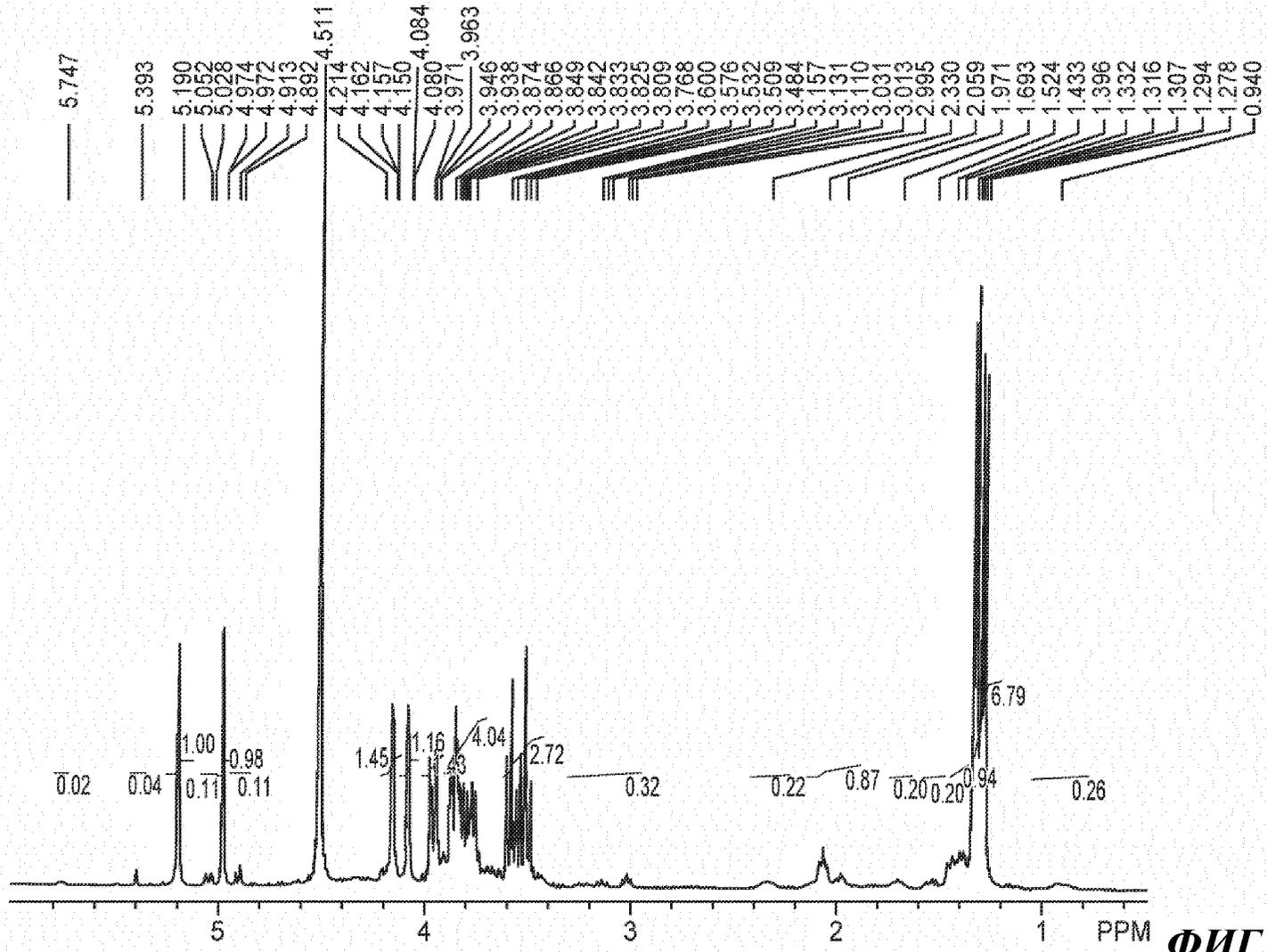
ID образца	Mw (кДа)
426507SLO(ΔC101)-GAC конъюгат	161.1
426508 SLO(ΔC101)-GAC конъюгат	162.2
426510 SLO(ΔC101)-GAC конъюгат	159.1
4265011 SLO(ΔC101)-GAC конъюгат	208.9

**ФИГ. 35**



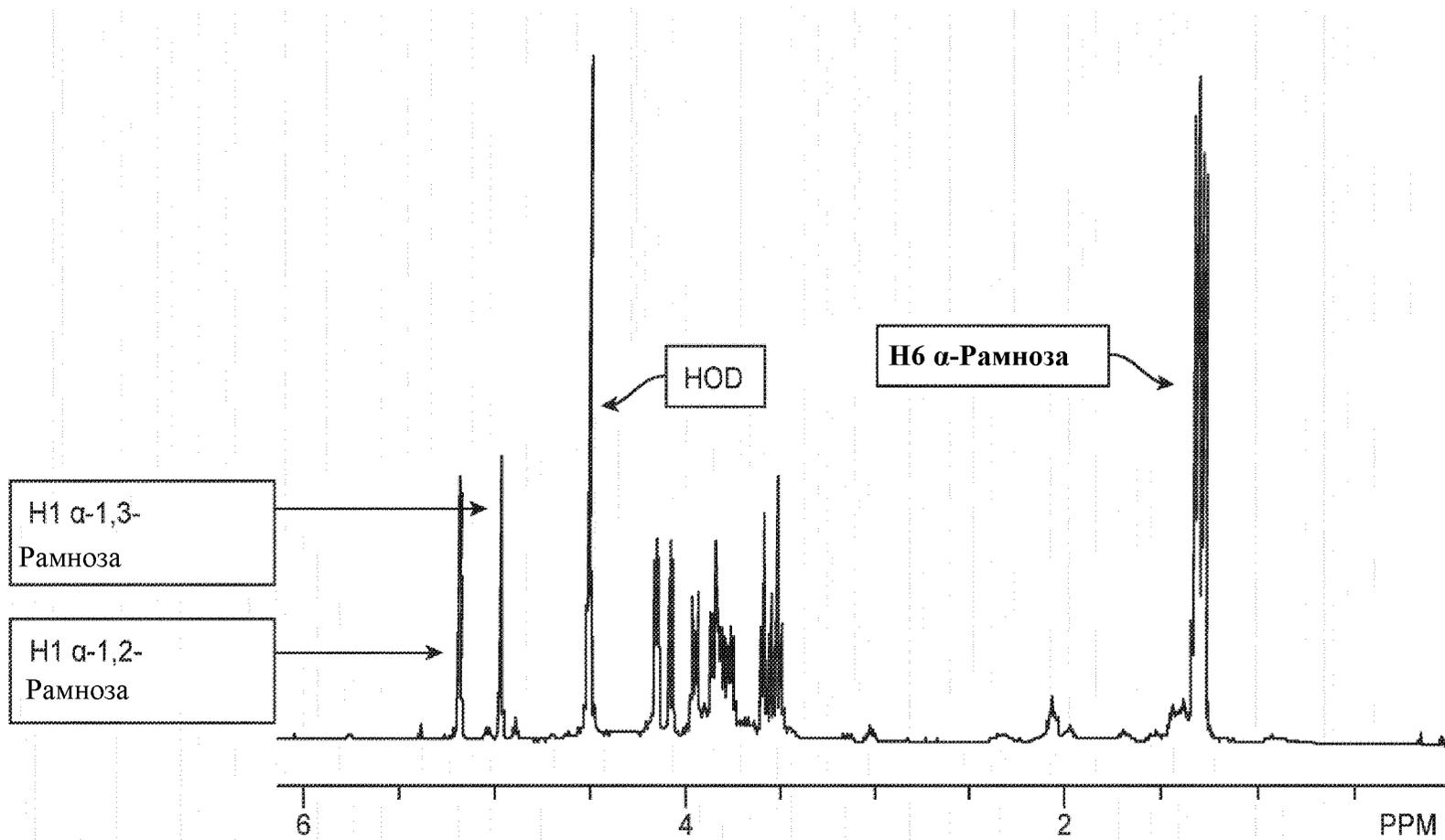
54/57

**ФИГ. 36А**



**ФИГ. 36В**

LS/SS



ФИГ. 36С

