



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.06

(21) Номер заявки
202090908

(22) Дата подачи заявки
2018.10.11

(51) Int. Cl. *A61K 39/02* (2006.01)

(54) ВАКЦИНА И СВЯЗАННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПАРОДОНТИТА И СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/571,582

(32) 2017.10.12

(33) US

(43) 2020.10.29

(86) PCT/US2018/055496

(87) WO 2019/075260 2019.04.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВАКСАЙТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Фэирмен Джеффри (US)

(74) Представитель:
Христофоров А.А., Джермакян Р.В.,
Гизатуллина Е.М., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В., Строкова О.В.,
Угрюмов В.М. (RU)

(56) NAKAO RYOMA ET AL. "Assessment of outer membrane vesicles of periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* as possible mucosal immunogen", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 34, no. 38, 25 July 2016 (2016-07-25), pages 4626-4634, XP029693837, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2016.06.016 page 4628, the paragraph bridging the left-hand column and the right hand column

RYOMA NAKAO ET AL. "Outer Membrane Vesicles of *Porphyromonas gingivalis* Elicit a Mucosal Immune Response", PLOS ONE, vol. 6, no. 10, 14 October 2011 (2011-10-14), page e26163, XP55064355, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0026163 Title, Abstract, the paragraphs entitled "OMVs of *P. gingivalis* retain the immunodominant determinants" and "OMVs of *P. gingivalis* elicit *P. gingivalis*-specific humoral immune responses"

WO-A1-0147961

FRAZER L.T. ET AL. "Vaccination with recombinant adhesins from the RgpA-Kgp proteinase-

adhesin complex protects against *Porphyromonas gingivalis* infection", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 24, no. 42-43, 30 October 2006 (2006-10-30), pages 6542-6554, XP028011006, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2006.06.013, [retrieved on 2006-10-30], Title, Abstract, paragraph 3.2

WO-A1-9734629

WO-A1-9716542

GIBSON FRANK C. III ET AL. "Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 69, no. 12, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 7959-7963, XP002350671, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.69.12.7959-7963.2001 Title, abstract, the paragraph entitled "Immunization of mice with RgpA but not RgpB protects the animals from *P. gingivalis*-induced bone loss"

WO-A1-2011097688

WO-A1-0072875

N. LI ET AL. "Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* - complex domain structures confer diverse functions", EUROPEAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 1, no. 1, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 41-58, XP55106493, ISSN: 2062-509X, DOI: 10.1556/EuJMI.1.2011.1.7 Table 1 on page 2424

DONGYING BAI ET AL. "Immunoreactive antigens recognized in serum samples from mice intranasally immunized with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles", PATHOGENS AND DISEASE, vol. 73, no. 3, 4 December 2014 (2014-12-04), XP055547688, DOI: 10.1093/femspd/ftu006 the paragraph bridging pages 9 and 10

WO-A2-2017066719

PAUL D. VEITH ET AL. "*Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Exclusively Contain Outer Membrane and Periplasmic Proteins and Carry a Cargo Enriched with Virulence Factors", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 13, no. 5, 3 April 2014 (2014-04-03), pages 2420-2432, XP055548434, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/pr401227e Table 1 on page 2424

WO-A1-2005112993

(57) Предложены иммуногенная композиция, вакцинный состав для пародонтита, содержащий указанную иммуногенную композицию, и способы лечения или предупреждения заболевания пародонта, где указанные способы включают введение субъекту иммунологически эффективного количества указанной композиции или вакцинного состава. Иммуногенная композиция содержит по меньшей мере один полипептид, содержащий: последовательность антигена Mfa1, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1

бактерии *Porphyromonas*; и последовательность антигена HA1, последовательность антигена HA2 или как последовательность антигена HA1, так и последовательность антигена HA2, где указанная последовательность антигена HA1 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из домена 1 гемагглютинаина гингипаина RgpA, содержащегося в белке гингипаине RgpA бактерии *Porphyromonas*, и указанная последовательность антигена HA2 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из домена 2 гемагглютинаина гингипаина RgpA, содержащегося в белке гингипаине RgpA бактерии *Porphyromonas*.

044863 B1

044863 B1

Область техники

Изобретение в целом относится к предупреждению (профилактике) и лечению пародонтита и, более конкретно, относится к композиции вакцины против пародонтита и способу ее применения.

Уровень техники

Заболевания пародонта, в совокупности называемые "пародонтитом", представляют собой часто встречающиеся и в то же время сложные хронические воспалительные заболевания полости рта, разрушающие мягкие и твердые ткани, поддерживающие зубы. Потеря альвеолярной кости вокруг зубов, если ее не лечить, может привести к расшатыванию и последующей потере зубов. Заболевание пародонта является одним из наиболее распространенных заболеваний человека бактериального происхождения. Недавние исследования показали, что приблизительно 60% людей старше 40 лет в Соединенных Штатах страдают пародонтитом средней или тяжелой степени тяжести и испытывают ощутимую потерю костной ткани челюсти. Частота случаев пародонтита возрастает с возрастом; см. Eke et al. (2012) *J. Dent. Res.* 91(10): 914-920. Тяжелое генерализованное заболевание пародонта встречается приблизительно у 5-20% индивидуумов во всем мире (Burt et al. (2005) *J. Periodontol.* 76(8): 1406-19, часто приводя к множественной потере зубов к достижению среднего возраста, и экономическое бремя этого заболевания является значительным с экономическими последствиями, оцениваемыми согласно данным за 2010 год в 54 миллиарда долларов только в США (Listl et al. (2015) *J. Dent. Res.* 94(10): 1355-61.

Система классификации пародонтита, основанная как на степени тяжести, так и на причинах возникновения, имеет семь признанных основных категорий: (1) заболевание десен или "гингивит", связанное с воспалением десны; (2) хронический пародонтит, медленно прогрессирующее заболевание, которое может быть либо локализованным, либо генерализованным; (3) ранний или "агрессивный" пародонтит; (4) пародонтит, связанный с системным заболеванием, таким как сахарный диабет, СПИД и лейкоз; (5) некротический пародонтит; (6) пародонтальные абсцессы; и (7) пародонтит, связанный с эндодонтическими поражениями. Последние шесть категорий называются "деструктивными" заболеваниями пародонта, поскольку причиненный ущерб является необратимым. См. Armitage (1999) *Ann. Periodontol.* 4(1): 1-6. Симптомы пародонтита включают воспаленные или кровоточащие десны, рецессию десны, карманы между зубами и деснами, а в случае тяжелого пародонтита - расшатывание или потерю зубов. Лечение будет зависеть от степени тяжести и причины заболевания и включает удаление зубных отложений (скейлинг), сглаживание поверхности корня зуба, терапию антибиотиками и хирургическое вмешательство. Удаление зубных отложений и сглаживание поверхности корня зуба часто необходимо проводить несколько раз, терапия антибиотиками может быть сопряжена с проблемами, поскольку полезные микробы полости рта могут быть уничтожены вместе с патогенными бактериями, а стоматологическая операция обычно является нежелательным решением, применяющимся в качестве крайней меры.

Пародонтит развивается вследствие присутствия ключевых бактерий, таких как *Porphyromonas gingivalis*. Организмы *Porphyromonas* обладают рядом молекул, способствующих их общей вирулентности, включая фимбрии и гингипаины (группа цистеиновых протеаз), которые влияют на различные аспекты патогенеза заболевания, включая прикрепление бактерий к клеткам и другим представителям микробного сообщества, развитие воспаления и микробный дисбиоз, связанный с заболеванием пародонта; см. Lamont et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4): 1244-63, и Bostanci et al. (2012) *FEMS Microbiol. Lett.* 333(1): 1-9. Некоторые из этих факторов вирулентности бактерий были исследованы в качестве потенциальных мишеней для разработки вакцин. См., например, Lamont et al., цитируемый выше; Arjunan et al. (2016) *Mol. Oral Microbiol.* 31(1): 78093; Takahashi et al. (2006) *Cell Microbiol.* 8(5):738-57; Malek et al. (1994) *J. Bacteriol.* 176(4): 1-52-9; Gibson et al. (2001) *Infect. Immun.* 69(12): 7959-63; и Evans et al. (1992) *Infect. Immun.* 60(7): 2926-35.

Вакцина для лечения пародонтита - и, возможно, также для предупреждения пародонтита - устранила бы необходимость повторных клинических вмешательств и/или стоматологических операций. Разработка эффективной терапевтической и/или профилактической вакцины против заболеваний пародонта была бы особенно ценной, поскольку заболевание встречается у значительной части взрослого населения. Тем не менее, пародонтит является многофакторным заболеванием, где факторы включают бактериальный состав зубного налета, генетические характеристики хозяина и факторы окружающей среды, что создает уникальные препятствия для базового понимания патогенеза заболевания пародонта и реализации потенциала для целенаправленной разработки вакцины.

Идеальная вакцина против пародонтита обеспечивала бы достижение терапевтической эффективности у субъектов с пародонтитом и была бы эффективной также и в контексте профилактики. Потребность в агрессивных клинических вмешательствах была бы устранена, а число людей, страдающих заболеваниями пародонта, существенно снизилось бы. Кроме того, идеальная вакцина была бы проста в изготовлении с использованием экономически эффективного процесса, подходящего для крупномасштабного производства.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение вышеуказанной потребности в данной области техники, и в рамках настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция, вакцинный состав, содержащий указанную композицию, и способы лечения и предупреждения заболевания пародонтита.

донта.

В первом варианте реализации предложена иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере один полипептид, содержащий: (а) последовательность антигена Mfa1, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 бактерии *Porphyromonas*; и (b) последовательность антигена HA1, последовательность антигена HA2 или как последовательность антигена HA1, так и последовательность антигена HA2, где (i) указанная последовательность антигена HA1 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из домена 1 гемагглютинаина гингипаина RgpA (также называемого в настоящей заявке "HA1 гингипаина" или "HA1"), содержащегося в белке гингипаине RgpA бактерии *Porphyromonas*, и (ii) указанная последовательность антигена HA2 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из домена 2 гемагглютинаина гингипаина RgpA (также называемого в настоящей заявке "HA1 гингипаина" или "HA1"), содержащегося в белке гингипаине RgpA бактерии *Porphyromonas*.

В одном из аспектов этого варианта реализации указанный по меньшей мере один полипептид содержит первый полипептид, содержащий: (а) последовательность антигена Mfa1 и последовательность антигена HA1; (b) последовательность антигена Mfa1 и последовательность антигена HA2; или (c) последовательность антигена Mfa1, последовательность антигена HA1 и последовательность антигена HA2. Таким образом, следует принимать во внимание, что первый полипептид может представлять собой слитый белок, включающий последовательность антигена Mfa1, а также последовательность антигена HA1 и/или последовательность антигена HA2. В связанном аспекте указанный по меньшей мере один полипептид содержит (а) первый полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1; и (b) второй полипептид, содержащий последовательность антигена HA1, последовательность антигена HA2 или как последовательность антигена HA1, так и последовательность антигена HA2. Таким образом, в этом аспекте последовательность антигена Mfa1 находится в одном полипептиде, а последовательности антигена HA1 и HA2 находятся во втором полипептиде, представляющем собой слитый полипептид, если присутствуют обе последовательности.

В еще одном аспекте этого варианта реализации указанный по меньшей мере один полипептид иммуногенной композиции содержит первый полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1, второй полипептид, содержащий последовательность антигена HA1, и третий полипептид, содержащий последовательность антигена HA2. Таким образом, в этом аспекте присутствуют три разных полипептида, каждый из которых содержит одну из последовательностей антигена Mfa1, HA1 и HA2.

В связанном аспекте последовательность антигена Mfa1, последовательность антигена HA1 и последовательность антигена HA2 по существу гомологичны иммуногенной аминокислотной последовательности полипептида фимбрилина Mfa1, HA1 гингипаина и HA2 гингипаина, соответственно, видов *Porphyromonas*, выбранных из *P. gingivalis*, *P. gulae*, *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis*, *P. canoris*, *P. salivosa* и *P. circumdentaria*.

В еще одном аспекте этого варианта реализации последовательность антигена Mfa1, последовательность антигена HA1 и последовательность антигена HA2 по существу гомологичны иммуногенной аминокислотной последовательности полипептида фимбрилина Mfa1, HA1 гингипаина и HA2 гингипаина, соответственно, из *P. gingivalis*.

В еще одном аспекте этого варианта реализации последовательность антигена Mfa1, последовательность антигена HA1 и последовательность антигена HA2 по существу гомологичны иммуногенной аминокислотной последовательности полипептида фимбрилина Mfa1, HA1 гингипаина и HA2 гингипаина, соответственно, из *P. gulae*.

В еще одном варианте реализации изобретения предложен вакцинный состав против пародонтита, содержащий иммуногенную композицию, как описано выше, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В обычном случае состав содержит по меньшей мере одно вспомогательное вещество, где по меньшей мере одно вспомогательное вещество выбрано из носителей, солюбилизаторов, эмульгаторов, стабилизаторов, консервантов, изотонических средств, буферных систем, диспергаторов, разбавителей, модификаторов вязкости и усилителей абсорбции. Вакцина может, в дополнение или в качестве альтернативы, включать по меньшей мере один адъювант.

В одном из аспектов этого варианта реализации вакцинный состав приготовлен в виде стерильного раствора для инъекции. В связанном аспекте этого варианта реализации вакцинный состав приготовлен в виде лиофилизированной композиции, подлежащей восстановлению (разведению) перед использованием.

В еще одном варианте реализации предложен способ иммунизации субъекта против заболевания пародонта путем введения указанному субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению. В одном из аспектов этого варианта реализации способ включает лечение пародонтита у субъекта, демонстрирующего симптомы пародонтита. В еще одном аспекте этого варианта реализации способ включает снижение риска развития пародонтита у субъекта, который может быть предрасположен к развитию пародонта, включая пародонтит от средней до тяжелой степени тяжести, где предрасположенность связана с фактором риска, таким как возраст, генетическая предрасположенность, иммунодефицитное состояние, системное заболевание, повышающее

риск развития пародонтита, наличие эндодонтических поражений или абсцессов, или другими факторами риска. Примеры системных заболеваний, повышающих риск развития пародонтита от средней до тяжелой степени тяжести, включают сахарный диабет, СПИД, лейкоз и синдром Дауна.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен анализ методом SDS-PAGE очищенных полипептидов Mfa1, HA1 и HA2, полученных путем бесклеточного синтеза белка.

На фиг. 2 представлены сывороточные значения EC_{50} IgG против Mfa1, HA1 и HA2 *P. gingivalis*. Группы животных G1-G6 служили контрольными или экспериментальными группами, и образцы сыворотки брали у животных непосредственно перед пероральным инфицированием (Post-Vax; незакрашенные столбцы) или при умерщвлении (закрашенные столбцы), и по данным ELISA рассчитывали значения EC_{50} для молекул IgG, специфичных к (A) Mfa1, (B) HA1 и (C) HA2 *P. gingivalis*.

На фиг. 3 показаны результаты экспериментов по оценке влияния вакцинного состава против пародонтита на потерю костной ткани челюсти *in vivo*.

Подробное описание изобретения

1. Терминология и определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящей заявке, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области, к которой относится данное изобретение. Отдельные термины, имеющие особую важность для описания настоящего изобретения, определены ниже.

В данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число определяемого объекта, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, "полипептид" относится не только к одному полипептиду, но также к комбинации двух или более разных полипептидов, которые могут быть или не быть объединены, "адъювант" относится к одному адъюванту, а также к двум или более адъювантам, которые могут быть отдельными или объединенными в одну композицию, и тому подобное.

"Биомолекула", также называемая в настоящей заявке "биологической молекулой", представляет собой любую органическую молекулу, будь то природную, рекомбинантную, полностью или частично химически синтезированную или химически или биологически модифицированную, которая является, была или может быть частью живого организма. Данный термин охватывает, например, полипептиды, пептидные фрагменты, аминокислоты, полисахариды, липиды и тому подобное.

Подразумевается, что термин "полипептид" включает любую структуру, состоящую из одной или более аминокислот, и, таким образом, включает дипептиды, олигопептиды, полипептиды, полипептидные фрагменты и белки. Аминокислоты, составляющие весь полипептид или его часть, могут представлять собой любую из двадцати стандартных встречающихся в природе аминокислот, то есть аланина (A), цистеина (C), аспарагиновой кислоты (D), глутаминовой кислоты (E), фенилаланина (F), глицина (G), гистидина (H), изолейцина (I), лизина (K), лейцина (L), метионина (M), аспарагина (N), пролина (P), глутамина (Q), аргинина (R), серина (S), треонина (T), валина (V), триптофана (W) и тирозина (Y), а также нестандартных аминокислот, таких как изомеры и модификации стандартных аминокислот, например, D-аминокислоты, непротеиногенные аминокислоты, посттрансляционно модифицированные аминокислоты, ферментативно модифицированные аминокислоты, β -аминокислоты, конструкции или структуры, имитирующие аминокислоты (например, α,α -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламино кислоты, молочная кислота, β -аланин, нафтилаланин, 3-пиридилаланин, 4-гидроксипролин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин и норлейцин) и другие нестандартные аминокислоты, как описано, например, в патенте США № 5679782 за авт. Rosenberg et al. Описанные в настоящей заявке полипептиды могут включать одну или более неестественных аминокислот, несущих функциональную группу, обеспечивающую конъюгацию со вторичным антигеном, например, полисахаридом. Полипептиды могут быть (a) встречающимися в природе, (b) полученными химическим синтезом, (c) полученными с помощью технологии рекомбинантных ДНК, (d) полученными биохимической или ферментативной фрагментацией более крупных молекул, (e) полученными способами, являющимися комбинацией способов (a)-(d), перечисленных выше, или (f) полученными любыми другими способами получения пептидов, такими как бесклеточный синтез белка, описанный ниже.

Термины "идентичность последовательностей", "процент гомологии последовательностей" и "гомология последовательностей" в контексте последовательности полимерной биомолекулы, например, полипептидной последовательности, относятся к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков (или нуклеотидов, или других типов мономерных звеньев, составляющих полимерную биомолекулу) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в пределах заданной длины (окна сравнения), как измерено с использованием алгоритма сравнения последовательностей, например, BLASTP или алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана. В настоящем контексте процент гомологии последовательностей может быть определен по всей длине биомолекулы или только по части. Одним из способов расчета процента гомологии последовательностей является программа BLASTP, в которой значения по умолчанию

установлены на длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу замен BLOSUM62; см., например, Henikoff et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915. В качестве примера, для определения выравнивания последовательностей и % идентичности последовательностей используются программы BESTFIT или GAP в составе пакета программного обеспечения GCG Wisconsin (Accelrys, Мэдисон, Висконсин) с использованием предоставленных параметров по умолчанию. Если эти предпочтительные методы вычисления идентичности последовательностей дают различающиеся величины, преимущественную силу имеет способ, обеспечивающий более высокую идентичность последовательностей.

Термин "по существу гомологичный" относится к проценту гомологии последовательностей в пределах заданной длины (например, "х" аминокислот полипептида), равному по меньшей мере приблизительно 50%, включая, таким образом, например, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 99% и 100%.

"Рекомбинантные" полипептиды относятся к полипептидам, полученным с помощью технологии рекомбинантных ДНК, то есть полученным из клеток, трансформированных экзогенной конструкцией ДНК, кодирующей желаемый полипептид. "Синтетические" полипептиды представляют собой полипептиды, полученные химическим синтезом.

В контексте настоящей заявки термин "иммуногенный" относится к способности антигена (например, полипептида) вызывать иммунный ответ, представляющий собой гуморальный или клеточный иммунный ответ, и предпочтительно оба. В предпочтительном варианте реализации субъект будет демонстрировать терапевтический либо защитный иммунологический ответ на введение "эффективного количества" или "иммунологически эффективного количества" иммуногенной композиции, описанной в настоящей заявке, так что будет повышена устойчивость к новой инфекции и/или будет снижена клиническая тяжесть заболевания пародонта. Иммунологический ответ обычно проявляется ослаблением или устранением по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекцией.

В контексте настоящей заявки в случаях, когда термин "очищенный" используется в отношении молекулы, это означает, что концентрация очищаемой молекулы была увеличена относительно концентрации молекулы в ее естественной среде. Термин может также относиться к очистке химически синтезированной молекулы от реакционной смеси, в которой молекула была получена в качестве продукта реакции. В контексте настоящей заявки в случаях, когда термин "выделенный" используется в отношении молекулы, данный термин означает, что молекула была удалена из ее естественной среды. Например, полинуклеотид или полипептид, в естественных условиях присутствующий в живом организме, не является "выделенным", но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от веществ, сопутствующих ему в естественном состоянии, является "выделенным". Выделенный фрагмент, независимо от того, отделен ли он от естественной среды или от неестественной среды (например, рекомбинантной экспрессии, бесклеточной экспрессии, химического синтеза и т. д.), предпочтительно имеет чистоту по меньшей мере приблизительно 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99%, или он может иметь 100% чистоту. В контексте настоящей заявки термин "% чистоты" обозначает содержание композиции, состоящей из представляющей интерес молекулы, выраженное в массовых процентах. В контексте настоящей заявки термин "молекулярная масса" полипептида или другой биомолекулы относится к молекулярной массе, рассчитанной методом эксклюзионной хроматографии (SEC) в сочетании с многоугловым рассеянием лазерного излучения (MALS).

Термин "лечение" относится к терапевтическому лечению путем введения иммуногенной композиции или вакцинного состава согласно изобретению, где целью является уменьшение или устранение инфекции. Например, "лечение" может включать непосредственное воздействие, подавление, ингибирование и устранение инфекции, а также снижение степени тяжести, отсрочку начала и/или уменьшение симптомов, связанных с инфекцией. Если иное не указано явным образом или не следует из контекста, термин "лечение" охватывает "предупреждение" (или профилактику или профилактическое лечение), где "предупреждение" может относиться к снижению риска того, что у субъекта разовьется инфекция, отсрочке возникновения симптомов, предотвращению рецидива инфекции или предотвращению развития инфекции.

2. Иммуногенная композиция и вакцинный состав.

В первом варианте реализации изобретения предложена иммуногенная композиция, включающая по меньшей мере один полипептид, содержащий: (а) последовательность антигена Mfa1, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 бактерии *Porphyromonas*; и (b) последовательность антигена HA1 и/или последовательность антигена HA2, где последовательность антигена HA1 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из HA1 гингипаина *Porphyromonas*, а последовательность антигена HA2 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из HA2 гингипаина *Porphyromonas*. Указанный по меньшей мере один полипептид может представлять собой слитый белок, содержащий последовательность антигена Mfa1, последовательность антигена HA1 и последовательность антигена HA2. Указанный по меньшей мере один полипептид также может представлять собой слитый белок, содержащий последовательность антигена Mfa1 и последовательность антигена HA1, или слитый белок, содержащий

последовательность антигена Mfa1 и последовательность антигена HA2. В одном варианте такого варианта реализации указанный по меньшей мере один полипептид может содержать первый полипептид, включающий последовательность антигена Mfa1, и второй полипептид, включающий одну или обе из последовательности антигена HA1 и последовательности антигена HA2.

Однако в предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один полипептид в составе иммуногенной композиции содержит два разных полипептида: первый полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1, и второй полипептид, содержащий последовательность антигена HA1 или последовательность антигена HA2. В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один полипептид в составе иммуногенной композиции содержит три разных полипептида: первый полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1, второй полипептид, содержащий последовательность антигена HA1, и третий полипептид, содержащий последовательность антигена HA2.

Как обсуждается выше, последовательность антигена Mfa1 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 бактерии *Porphyromonas*, последовательность антигена HA1 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из HA1 гингипаина *Porphyromonas*, и последовательность антигена HA2 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из HA2 гингипаина *Porphyromonas*. Иммуногенные последовательности в этих трех антигенах могут совместно или по отдельности представлять собой полноразмерный белок или домен (то есть белок Mfa1, домен 1 гемагглютинаина гингипаина RgpA и/или домен 2 гемагглютинаина гингипаина RgpA) или часть (или фрагмент) такого белка или домена, при условии, что выбранная часть обеспечивает получение композиций, обладающих способностью генерировать терапевтический или профилактический иммуногенный ответ на бактериальную инфекцию, вызываемую *Porphyromonas*. Обычно эти иммуногенные части или фрагменты полноразмерного белка или домена имеют длину по меньшей мере 20 аминокислотных остатков. При условии сохранения желаемых иммуногенных свойств длина последовательности белка или домена, на которой основана последовательность антигена, является вопросом выбора конструкции и может составлять по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аминокислотных остатков, вплоть до полноразмерного белка или домена, включительно. Следовательно, антигенные последовательности, содержащиеся в полипептидах согласно настоящему изобретению, по существу гомологичны этим иммуногенным аминокислотным последовательностям из полноразмерных последовательностей нативного белка или домена (т. е. белка фимбрилина Mfa1, домена 1 гемагглютинаина гингипаина RgpA и/или домена 2 гемагглютинаина гингипаина RgpA) или их части. Как правило, обычно по причинам, связанным с методикой или эффективностью получения полипептидов, антигенные последовательности, содержащиеся в полипептидах согласно настоящему изобретению, не являются точными копиями нативной иммуногенной последовательности, которой они соответствуют. Например, N-концевой метионил, который можно рассматривать как находящийся за пределами антигенной последовательности для расчета максимального процента идентичности или гомологии, часто присутствует из-за добавления старт-кодона. Также могут иметь место добавления, делеции и замены (часто консервативные замены) при условии, что полипептид не теряет своих выгодных иммуногенных свойств. Следовательно, следует принимать во внимание, что настоящее изобретение может быть осуществлено с полипептидами, содержащими (либо в своем составе, либо полностью) последовательность аминокислотных остатков, представляющую собой антигенную последовательность (т. е. последовательность антигена Mfa1, последовательность антигена HA1 или последовательность антигена HA2), по существу гомологичную иммуногенной последовательности аминокислотных остатков, присутствующей в соответствующем белке или домене, где иммуногенная последовательность аминокислотных остатков представляет собой либо полноразмерный белок или домен, либо его часть или фрагмент. Эти иммуногенные последовательности аминокислотных остатков, по отношению к которым измеряется существенная гомология антигенных последовательностей, независимо представляют собой либо полноразмерный белок или домен, либо его часть, имеющие длину по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или 100 аминокислотных остатков. Как правило, эти антигенные последовательности гомологичны иммуногенной последовательности аминокислотных остатков, по отношению к которой измеряется существенная гомология антигенной последовательности, на уровне по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100%. С помощью стандартного тестирования на животных или людях можно легко установить, вызывают ли композиции согласно настоящему изобретению на основе частей полноразмерных бактериальных белков или доменов терапевтический или профилактический иммуногенный ответ на инфекцию, вызываемую рассматриваемыми бактериями.

Белок фимбрилин Mfa1 происходит из бактерии *Porphyromonas*, а домены 1 и 2 гемагглютинаина гингипаина RgpA содержатся в белке гингипаине RgpA, который также происходит из бактерии *Porphyromonas*, где бактерия *Porphyromonas* может относиться к любому из различных видов *Porphyromonas*, включая *P. gingivalis*, *P. gulae*, *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis*, *P. canoris*, *P. salivosa* и *P. circumdentaria*.

В предпочтительном варианте реализации белок фимбрилин Mfa1 происходит из *P. gingivalis*. Введение иммунологически эффективного количества композиции, содержащей по меньшей мере один полипептид с последовательностью антигена Mfa1, в данном контексте будет индуцировать иммунный ответ, при котором генерируются антитела против Mfa1, нарушая один или более патологических процессов, посредством которых осуществляется инфицирование *P. gingivalis*. В этом варианте реализации последовательность антигена Mfa1 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 бактерии *P. gingivalis*, такой как последовательность из белка фимбрилина Mfa1 *P. gingivalis*, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Полипептид фимбрилина Mfa1 *P. gingivalis*, полученный, как описано в приведенном ниже экспериментальном разделе, содержит 552 аминокислоты (этот и последующие SEQ ID включают добавление N-концевого метионина из старт-кодона, используемого в бесклеточном синтезе, описанном ниже) и имеет молекулярную массу, равную 60 018, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, воспроизведенную для удобства ниже:

```

MGNPDPDAAKSYMSMTLSMPMGSARDGQNQDNPQYNFVGEWAGK
DKIEKVSIIYMVPQGGPGLVESAEDLDFGTYYDAPTQEAGSNNVILKPKKG
IKVNSAVGKTVKVVVVLNDIAGKAKALLANVNAVDFEAKFKEVIELSTQ
AQALGTVADGPNPATAAGKIAKKNVNETIMMTCFEPASPLTIEAAVSE
ANAIAGVKNQAKVTVERSARAMVSTKAESYEIKATTQIGSIAAGDVLAT
VSDIRWVVAQGERKQYLSKRGTVPENTWVTPGSDYISTNANFHAQAT
MYYDYDTGLWDDHNADPTMVSQTKVPTLANYQLQDVTDELAQRLSGKF
LLPNTHKSGIDAATSHYKRGNTAYVLRVAKFTPKKEAFIDKGDYTDGTP
VPEYTDGDDFFVGENGQFYVSMKSVTDPKVGGVAGMKAHKYVKGKVL
YYAWLNPSTTSPDSWNSPVVRNNIYHIIKSIKKLGFNWNPLVNPQNP
NDPNGPINPNPDPNPDEPGTPIPTDPEQPLPDQDTFMSVEVTVLPWKVHS
YEVDL

```

В этом варианте реализации, в котором последовательность антигена Mfa1 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 из *P. gingivalis*, предпочтительно, хотя и не обязательно, чтобы последовательность антигена HA1 была по существу гомологичной иммуногенной аминокислотной последовательности из домена 1 гемагглютинаина (HA1) гингипаина RgpA, содержащегося в белке гингипаине RgpA *P. gingivalis*, где, например, иммуногенная аминокислотная последовательность может происходить из HA1, имеющего SEQ ID NO: 2. Аналогичным образом в этом варианте реализации предпочтительно, чтобы последовательность антигена HA2 была по существу гомологичной иммуногенной аминокислотной последовательности из домена 2 гемагглютинаина (HA2) гингипаина RgpA, содержащегося в белке гингипаине RgpA *P. gingivalis*, где иммуногенная аминокислотная последовательность может происходить из HA2, имеющего SEQ ID NO: 3.

HA1 гингипаина *P. gingivalis*, полученный, как описано ниже, содержит 176 аминокислот и имеет молекулярную массу, равную 19 059, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, воспроизведенную для удобства ниже:

```

MLSSEFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESEFG
LGGIGVLTDPNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASST
GNDASNFTNALLEETITAKGVRSPAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVA
FRHFQSTDMFYIDLDEVEI

```

HA2 гингипаина *P. gingivalis*, также полученный, как описано ниже, содержит 442 аминокислоты и имеет молекулярную массу, равную 48 299, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, воспроизведенную ниже:

```

MFTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQDWLCLSSGQLDWLTAHGNTV
VASFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKVKYVAVNDGFPDHYAVMIS
KTGTNAGDFTVVFEETPNGINKGGARFGLSTEANGAKPQSVWIERTVDLP
AGTKYVAFRHYNCSDLNYILLDDIQFTMGGSPPTDYTYTVYRDGTKIKE
GLTETTFEEDGVATGNHEYCVYKYTAGVSPKVCVNVNTINPTQFNPKN
LKAQPDGGDVVLKWEAPSGKRGELLNEDFEGDAIPTGWTALDADGDGN
NWDITLNEFTRGERHVLSPLRASNVAYSISLLQGQEYLPLTPNNFLITPKV
EGAKKITYKVGSPGLPQWSDHYALCISKSGTAAADFEVIFEETMITYTQG
GANLTREKDLPAKTYVAFRHYNCTDVLGIMDDVVI

```

Предполагается, что объединение последовательности антигена Mfa1 с одной или обеими из последовательности антигена HA1 и последовательности антигена HA2 в одном или нескольких полипептидах в одной иммуногенной композиции направлено против нескольких механизмов, вовлеченных в патоген-

ное развитие заболевания пародонта, связанного с инфекцией, вызываемой *Porphyromonas*, то есть механизмов, связанных с белком фимбрилина Mfa1, а также с белками гингипаина RgpA.

В еще одном варианте реализации белок фимбрилин Mfa1 происходит из *P. gulae*. В этом случае последовательность антигена Mfa1 по существу гомологична иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 бактерии *P. gulae*, такой как последовательность из белка фимбрилина Mfa1 *P. gulae*, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Как поясняется в отношении *P. gingivalis*, последовательность антигена HA1 и последовательность антигена HA2 должны быть по существу гомологичными иммуногенным аминокислотным последовательностям из домена 1 гемагглютинаина RgpA и домена 2 гемагглютинаина RgpA, соответственно, содержащихся в белке гингипаине RgpA организма *P. gulae*. Иммуногенная аминокислотная последовательность из HA1 *P. gulae* может происходить из SEQ ID NO: 5, а иммуногенная аминокислотная последовательность из HA2 *P. gulae* может происходить из SEQ ID NO: 6.

Полипептид фимбрилина Mfa1 *P. gulae* (SEQ ID NO: 4):

MGNGPDPDAAKSYMSMTLSMPLGSARAGDGDQDPNPDYNYVGEWAGK
DKIEKVSIIYMPQGGPGLVESAEEDLDFSTYYDAPTQDPGSNNVILKPKKGIK

VNSAVGKTVKVYVVLNDIAGKAKALLANVNAADFDKAF KEVIELSTQAE
AVSQANAFNGTAAGKIAKKNATDETIMMTCLQPSDALTIEAAVSEANAIA
GVKNQAKVTVERSVARAMLSTKADTFEILAAHQIGEIAAGSVLATITDIRWV
VAQGERRQYLSKKRGTIQENTWVTPGSDFVPTSSTFHTNATEYYDYAGWED
HNTDPTVISGTQVPTLADYQLQNVTDELAQSLSGKFLPNTHKSGTDAATS
HYKRGNTAYVLIRAKFTPKEAFIDKGYTYDGTQVPEYEADQDFVGENG
QFYVSMKSVTDPKVGVTGMKANKYVKGVLYYAWLNPSTTSPDTWWNS
PVVRNNIYHIIKSIKLGFNWNPLVPDPNPDPVNPNNPDPNPDEPGTPVPTD
DPEQPLPDQDTFMSVEVTVLPWKVHSYEVDL

HA1 гингипаина *P. gulae* (SEQ ID NO: 5):

MTESFDGGIPATWTLIDADGDGHGWKHGKAPGVAGYNSNGCVYSESG
LGGIGVLTDPNYLITPALNLPNGGKLTFWVCAQDAAYASEHYAVYASST
GNAASNFTNALLEETLTAAGVRSPEAIRGRVQGTWYQKTVDLDPAGTKYVA
FRHFQSTDMFYIDIDEVEI

HA2 гингипаина *P. gulae* (SEQ ID NO: 6):

MNAKRSELLNENFEGDDIPAGWTALDADGDGNNWGVQLNQFTRGER
EALAPLRASNVAISYSSLNQQGGYLPLTPNNFLITPKVEGAKKISYKV
GSPGNQSWSHDHYALCISKGTGAASDFEIFEETMVYSQGGANFTRE
KDLDPGTKYVAFRHYNCTDVLAIVIDDVVITG

Таким образом, настоящие иммуногенные композиции включают:

- (1) иммуногенную композицию, содержащую (а) последовательность антигена Mfa1 *P. gingivalis*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 *P. gingivalis*, имеющего SEQ ID NO: 1, и (b) последовательность антигена HA1 *P. gingivalis*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из HA1 гингипаина *P. gingivalis*, SEQ ID NO: 2;
- (2) иммуногенную композицию, содержащую (а) последовательность антигена Mfa1 из *P. gingivalis*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 *P. gingivalis*, имеющего SEQ ID NO: 1, и (b) последовательность антигена HA2 *P. gingivalis*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из HA2 гингипаина *P. gingivalis*, SEQ ID NO: 3;
- (3) иммуногенную композицию, содержащую (а) последовательность антигена Mfa1 *P. gingivalis*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 *P. gingivalis*, имеющего SEQ ID NO: 1, (b) последовательность антигена HA1 *P. gingivalis*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из HA1 гингипаина *P. gingivalis*, SEQ ID NO: 2, и (c) последовательность антигена HA2 *P. gingivalis*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из HA2 гингипаина *P. gingivalis*, SEQ ID NO: 3;
- (4) иммуногенную композицию, содержащую (а) последовательность антигена Mfa1 *P. gulae*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 *P. gulae*, имеющего SEQ ID NO: 4, и (b) последовательность антигена HA1 *P. gulae*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из HA1 гингипаина *P. gulae*, SEQ ID NO: 5;
- (5) иммуногенную композицию, содержащую (а) последовательность антигена Mfa1 из *P. gulae*, по

существо гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 *P. gulae*, имеющего SEQ ID NO: 4, и (b) последовательность антигена HA2 *P. gulae*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из HA1 гингипаина *P. gulae*, SEQ ID NO: 6; и

(6) иммуногенную композицию, содержащую (a) последовательность антигена Mfa1 *P. gulae*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из белка фимбрилина Mfa1 *P. gulae*, имеющего SEQ ID NO: 4, и (b) последовательность антигена HA1 *P. gulae*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из HA1 гингипаина *P. gulae*, SEQ ID NO: 5, и (c) последовательность антигена HA2 *P. gulae*, по существу гомологичную иммуногенной аминокислотной последовательности из HA1 гингипаина *P. gulae*, SEQ ID NO: 6.

В предпочтительном варианте реализации композиция содержит иммуногенную композицию, подходящую для включения в состав вакцинного состава. По меньшей мере один полипептид, содержащий выбранную последовательность антигена, как описано выше, предпочтительно включен в композицию в выделенной или очищенной форме, где термины "выделенный" и "очищенный" определены ранее в настоящей заявке. Количество по меньшей мере одного полипептида в иммуногенной композиции является достаточным и эффективным количеством для генерирования терапевтического или профилактического иммунного ответа у субъекта, то есть представляет собой количество, делающее всю композицию иммуногенной. Таким образом, введение иммунологически эффективной дозы иммуногенной композиции субъекту в составе вакцинного состава вызовет иммунный ответ, как поясняется в части (I) данного раздела, предпочтительно ответ, служащий для ингибирования прогрессирования или предотвращения возникновения заболевания пародонта, связанного с инфекцией, вызываемой *Porphyromonas*. Относительные количества каждого полипептида в композиции могут значительно различаться. Однако в состав композиции обычно включают выбранные полипептиды, например, (a) первый полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1, и второй полипептид, содержащий последовательность антигена HA1, последовательность антигена HA2 или обе; или (b) первый полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1, второй полипептид, содержащий последовательность антигена HA1, и третий полипептид, содержащий последовательность антигена HA2, - объединенные в количествах, соответствующих массовому отношению каждого полипептида в композиции к каждому другому полипептиду в композиции в диапазоне от приблизительно 1:5 до приблизительно 5:1, обычно в диапазоне от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, например, в диапазоне от приблизительно 1:1,5 до приблизительно 1,5:1, включая приблизительно 1:1. В предпочтительном варианте реализации массовое отношение каждого полипептида в композиции к каждому другому полипептиду в композиции находится в диапазоне от 1:5 до 5:1, обычно от 1:3 до 3:1, например, от 1:1,5 до 1,5:1, и включая 1:1. Соответственно, иммуногенная композиция может представлять собой одно из следующего:

(1) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, и второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA1, в массовом отношении в диапазоне от 1:5 до 5:1;

(2) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, и второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA1, в массовом отношении в диапазоне от 1:3 до 3:1;

(3) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, и второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA1, в массовом отношении в диапазоне от 1:1,5 до 1,5:1;

(4) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, и второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA1, в массовом отношении, равно приблизительно 1:1;

(5) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, и второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA2, в массовом отношении в диапазоне от 1:5 до 5:1;

(6) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, и второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA2, в массовом отношении в диапазоне от 1:3 до 3:1;

(7) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, и второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA2, в массовом отношении в диапазоне от 1:1,5 до 1,5:1;

(8) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, и второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA2, в массовом отношении, равно приблизительно 1:1;

(9) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA1, и третьего полипептида, содержащего последовательность антигена HA2, где массовое отношение каждого полипептида в композиции к каждому другому полипептиду в композиции находится в диапазоне от 1:5

до5:1;

(10) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA1, и третьего полипептида, содержащего последовательность антигена HA2, где массовое отношение каждого полипептида в композиции к каждому другому полипептиду в композиции находится в диапазоне от 1:3 до3:1;

(11) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA1, и третьего полипептида, содержащего последовательность антигена HA2, где массовое отношение каждого полипептида в композиции к каждому другому полипептиду в композиции находится в диапазоне от 1:1,5 до 1,5:1; и

(12) композицию, приготовленную путем объединения первого полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1, второго полипептида, содержащего последовательность антигена HA1, и третьего полипептида, содержащего последовательность антигена HA2, где массовое отношение каждого полипептида в композиции к каждому другому полипептиду в композиции составляет приблизительно 1:1, таким образом, что массовые отношения трех полипептидов равны приблизительно 1:1:1.

Дополнительные антигены: помимо по меньшей мере одного полипептида, содержащего последовательность антигена Mfa1 и последовательность антигена HA1 и/или последовательность антигена HA2, иммуногенная композиция может содержать один или более дополнительных антигенов. Дополнительный антиген может представлять собой антиген, который индуцирует опосредованный антителами ответ, направленный против патогенных механизмов *Porphomonas* и/или факторов вирулентности, например, бактериальную тирозинкиназу Ptk1 (см. Bainbridge (2010) *Infect. Immun.* 78(11): 4560-69) или фермент фосфосерин-фосфатазу SerB (см. Wright et al. (2014) *MicrobiologyOpen* 3(3): 383-94. В композицию также могут быть включены антигены, направленные против патогенов, отличных от организмов *Porphomonas*, таких как организмы, которые, как правило, присутствуют в мультимикробной биопленке, связанной с прогрессированием заболевания пародонта.

По меньшей мере один полипептид в составе иммуногенной композиции может быть получен многими способами, например, с помощью твердофазного или жидкофазного химического синтеза (полностью или частично), расщеплением более длинных полипептидов с использованием протеаз, экспрессией в клетках рекомбинантного белка, путем очистки от клеточной культуры (например, после рекомбинантной экспрессии) и т. д. Однако предпочтительным способом получения полипептидов является система масштабируемого бесклеточного синтеза белка ("CFPS"), описанная в патенте США № 9040253 за авт. Roy et al., патенте США № 9650621 за авт. Thanos et al., и в Murray et al. (2013) *Current Opin. Chem. Biol.* 17(3): 420-26. Бесклеточный синтез полипептидных антигенов Mfa1, HA1 и HA2 подробно описан в приведенных ниже примерах.

В изобретении также предложен вакцинный состав, содержащий иммуногенную композицию в составе стерильного состава для введения субъекту, например, в виде суспензии, раствора или в лиофилизированной форме, подлежащей разведению перед использованием. Вакцинный состав включает по меньшей мере один полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1 и последовательность антигена HA1 и/или последовательность антигена HA2; необязательные дополнительные антигены, как поясняется выше; и по меньшей мере один дополнительный компонент, выбранный из адъювантов и вспомогательных веществ, как описано далее:

Адъюванты: вакцинный состав может содержать один или более адъювантов для усиления иммунного ответа на один или более антигенов в иммуногенной композиции. Подходящие адъюванты вакцин для включения в настоящий состав описаны в соответствующих источниках и литературе и будут очевидны для специалистов в данной области техники. Основные группы адъювантов представляют собой следующие:

Адъюванты на основе минеральных солей, включая адъюванты на основе квасцов, такие как фосфат алюминия, гидроксид алюминия и сульфат алюминия, а также адъюванты на основе других минеральных солей, такие как фосфатные, гидроксидные и сульфатные соли кальция, железа и циркония;

Составы сапонинов, включая сапонин квиллайи Quil A и полученный из Quil A сапонин QS-21, а также иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), образующиеся при смешивании холестерина, фосфолипида и сапонина;

Полученные из бактерий и связанные с бактериями адъюванты, включая, не ограничиваясь перечисленным, пептидогликаны и липополисахариды клеточной стенки, полученные из грамотрицательных бактерий, таких как *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum*, *C. granulosum*, *Bordetella pertussis* и *Neisseria meningitidis*, например, липид A, монофосфорил-липид A (MPLA), другие производные и миметики липида A (например, RC529), энтеробактериальный липополисахарид ("LPS"), лиганды TLR4 и димиколат трегалозы ("TDM");

Мурамилпептиды, такие как N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин ("MDP") и аналоги и производные MDP, например, треонил-MDP и нор-MDP;

Адъюванты на масляной основе, включая эмульсии масло-в-воде (м/в) и вода-в-масле (в/м), такие

как эмульсии сквален-вода (например, MF59, AS03, AF03), полный адъювант Фрейнда ("CFA") и неполный адъювант Фрейнда ("IFA");

Адъюванты на основе липосом;

Адъюванты на основе микросфер, образованные из биоразлагаемых и нетоксичных полимеров, таких как поли(а-гидроксикислота), поли(гидроксимасляная)кислота, полиортоэфир, полиангидрид, поликапролактон и т. д.;

Иммуномодуляторы человека, включая цитокины, такие как интерлейкины (например, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-12), интерфероны (например, интерферон- γ), макрофагальный колониестимулирующий фактор и фактор некроза опухоли;

Биоадгезивы и мукоадгезивы, такие как хитозан и его производные и этерифицированная гиалуроновая кислота, и микросферы или мукоадгезивы, такие как сшитые производные поли(акриловой кислоты), поливинилового спирта, поливинилпирролидона, полисахаридов и карбоксиметилцеллюлозы;

Соединения имидазохинолина, включая имиквимод и его гомологи, например, резиквимод;

Агонисты TLR-9, такие как Hsp90 и олигодезоксинуклеотиды, содержащие неметирированные CpG-мотивы (см., например, Bode et al. (2011) *Expert Rev. Vaccines* 10(4): 499-511); и

Углеводные адъюванты, включая адъюванты-производные инулина гамма-инулин и альгаммулин, и другие углеводные адъюванты, такие как полисахариды на основе глюкозы и маннозы, включая глюканы, декстраны, лентинаны, глюкоманнаны, галактоманнаны, леваны и ксиланы.

Примеры адъювантов в настоящей заявке включают соли на основе квасцов, такие как фосфат алюминия и гидроксид алюминия.

Вакцинный состав также включает по меньшей мере одно вспомогательное вещество и, как правило, два или более вспомогательных веществ, для выполнения любой из ряда функций, где вспомогательные вещества представляют собой иммунологически и фармакологически инертные компоненты, которые являются "фармацевтически приемлемыми". "Фармацевтически приемлемый" компонент в настоящей заявке представляет собой компонент, который (1) может быть включен в состав вакцинного состава, вводимого субъекту, не вызывая значительных нежелательных биологических эффектов или не взаимодействуя пагубным образом с любыми другими компонентами состава; и (2) соответствует критериям, изложенным в документе Неактивный ингредиент (Inactive Ingredient), подготовленном Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), и, предпочтительно, также получил статус "Рассматриваемый как безопасный" ("GRAS"). Тип вспомогательного вещества или вспомогательных веществ, включенных в состав вакцинного состава, будет частично зависеть от выбранного способа введения и конкретного типа состава или лекарственной формы, например, жидких составов для инъекции, составов для применения в виде интраназального спрея или тому подобного; способы введения и соответствующие составы обсуждаются ниже. В целом, однако, инертные компоненты, которые могут быть предпочтительно включены в состав вакцинного состава согласно изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, носители, солилизаторы, эмульгаторы, стабилизаторы, консерванты, изотонические средства, буферные системы, диспергаторы, разбавители, модификаторы вязкости, усилители абсорбции и их комбинации. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых инертных добавок содержится в Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20-е изд., ISBN: 0683306472.

3. Введение и применение.

Иммуногенная композиция согласно изобретению подходит для применения в способе иммунизации субъекта против заболевания пародонта, где способ включает введение указанному субъекту иммунологически эффективного количества вакцинного состава для пародонта, содержащего иммуногенную композицию, как описано в настоящей заявке.

Субъект может представлять собой человека или млекопитающее, отличное от человека, и выбор бактерии-мишени (которая будет источником иммуногенных аминокислотных последовательностей, которым соответствуют последовательности антигена) может зависеть от типа субъекта. Например, иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению, используемая для лечения или предупреждения пародонтита у человека, обычно направлена против *P. gingivalis*. В качестве другого примера, иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению, используемая для лечения или предупреждения пародонтита у млекопитающего, отличного от человека, где такими субъектами могут быть собаки, лошади, молочный скот, кошки или другие млекопитающие, как правило, будет направлена против *P. gulae*.

Способ может включать введение иммуногенной композиции в качестве терапевтической вакцины, то есть для лечения субъекта, страдающего пародонтитом. Способ также может включать введение иммуногенной композиции в качестве профилактической вакцины, что означает, например, что способ снижает риск развития у субъекта пародонтита (в том числе пародонтита от средней до тяжелой степени тяжести) и, таким образом, может отсрочивать или исключать развитие пародонтита. Когда вакцина используется в профилактических целях, субъект может быть предрасположен к развитию пародонтита вследствие любого количества факторов риска, включая возраст, генетическую предрасположенность; иммунодефицитное состояние; заболевание, повышающее риск развития пародонтита от средней до тя-

желой степени тяжести, например, сахарный диабет, СПИД, лейкоз, синдром Дауна; или наличие эндодонтических поражений или абсцессов. В качестве примера, пациенты, получающие терапию против TNF (т. е. принимающие ингибитор TNF, такой как этанерцепт или адалимумаб), например, при лечении ревматоидного артрита или псориаза, часто демонстрируют воспаление десен и обладают повышенным риском развития пародонтита.

"Иммунологически эффективное количество" вакцинного состава представляет собой количество, которое либо в виде разовой дозы, либо как часть серии из двух или более доз, эффективно для лечения или предупреждения заболевания пародонта, где "лечение" и "предупреждения" определены в части (1) этого раздела. Вводимое количество будет варьировать в зависимости от нескольких факторов, включая общее состояние здоровья и физическое состояние субъекта, возраст субъекта, способность иммунной системы субъекта синтезировать соответствующие антитела, форму композиции (например, жидкость для инъекции, назальный спрей и т. д.), таксономическую группу субъекта (например, человек, примат, отличный от человека, субъекты, отличные от примата, и т. д.), и другие факторы, известные врачу, контролирующему введение.

Введение иммуногенной композиции в виде вакцинного состава может быть осуществлено с использованием любого эффективного способа системной доставки. Композицию обычно вводят парентерально, например, путем инъекции, включая внутривенную, внутримышечную, внутривнутрибрюшинную, интестинальную или подкожную инъекцию; инъекция также может быть осуществлена в десну, в таком случае вакцинный состав вводят непосредственно в десну. Кроме того, композиция может быть введена трансмукозально, например, интраназальным, сублингвальным, трансбуккальным, интравагинальным или ректальным способами. Однако предусмотрены и другие способы введения, и изобретение не ограничено в этом отношении. Например, другие способы введения включают пероральную и трансдермальную доставку, а также введение посредством ингаляции или с использованием подкожного имплантата.

Способ введения в значительной степени определяет тип состава или лекарственной формы, содержащих иммуногенную композицию. Композиции, приготовленные для парентерального введения, включают стерильные водные и неводные растворы, суспензии и эмульсии. Водные растворы для инъекции содержат активный агент в водорастворимой форме. Примеры неводных растворителей или носителей включают жирные масла, такие как оливковое масло и кукурузное масло, синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, низкомолекулярные спирты, такие как пропиленгликоль, синтетические гидрофильные полимеры, такие как полиэтиленгликоль, липосомы и тому подобное. Парентеральные составы могут также содержать вспомогательные вещества, такие как соли-буферизаторы, эмульгаторы, стабилизаторы, консерванты, изотонические средства, буферные системы, диспергаторы, разбавители, модификаторы вязкости, усилители абсорбции и их комбинации. Стерильность составов для инъекции обеспечивают путем включения стерилизующего средства, фильтрации через удерживающий бактерии фильтр, облучения или нагревания. Они также могут быть изготовлены с использованием стерильной среды для инъекции. Иммуногенная композиция или ее отдельные компоненты также могут находиться в высушенной, например, лиофилизированной, форме, которая может быть разделена подходящим носителем непосредственно перед введением путем инъекции.

Из трансмукозальных способов обычно, хотя и не обязательно, предпочтительным является интраназальное введение. Интраназальные составы, в том числе вводимые интраназально вакцинные составы, известны в данной области техники и должны разрабатываться со ссылкой на разработанное FDA Руководство для промышленности под названием "Лекарственные средства в форме назального спрея и раствора, суспензии и спрея для ингаляции" (Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products). Интраназальные составы представляют собой жидкости, т. е. растворы, эмульсии, суспензии или тому подобное, для введения в виде спреев, интраназальных инъекций или капель и могут содержать адьюванты и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, как указано выше. Из-за относительно большого размера антигенов в составе состава системная доставка интраназальным способом требует включения в иммуногенную композицию усилителя трансмукозальной абсорбции. Примеры подходящих усилителей трансмукозальной абсорбции включают, не ограничиваясь перечисленным, алкилсахариды, циклодекстрины и хитозаны; см. Maggio (2014) *J. Excip. Food Chem.* 5(2): 100-12; и Merkus et al. (1999) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 41-57. Концентрацию усилителя выбирают таким образом, чтобы иммунологически эффективное количество состава проходило через слизистую оболочку носа и поступало в системный кровоток с эффективной скоростью переноса. Различные анатомические и физиологические факторы, определяющие состав и природу интраназального вакцинного состава, обсуждаются, например, в Auroga (October 2002) *Drug Development & Delivery* 2(7).

Другие способы введения и соответствующие составы включают, не ограничиваясь перечисленным, сублингвальное введение быстрорастворимой лекарственной формы, такой как быстрорастворимая таблетка; трансбуккальное введение с использованием буккального пластыря или другой системы буккальной доставки; интравагинальное введение с использованием пессария, мази или крема; ректальную доставку с использованием ректального суппозитория, мази или крема; трансдермальное введение с использованием трансдермального пластыря или состава; подкожное введение с помощью введенного имплантата или гранулы; ингаляцию с использованием сухого порошкового состава для ингаляции; и перо-

ральное введение с использованием пероральной лекарственной формы, такой как таблетка, капсула или тому подобное.

Как упоминалось ранее в настоящей заявке, вакцинный состав вводят субъекту в рамках подходящей схемы приема. Композиция может быть введена однократно или два или более раз с интервалами между ними в течение длительного периода времени. Например, после начальной, "примирующей" дозы может следовать по меньшей мере одна "бустерная" доза. Временной интервал между примирующей и последующей бустерной дозой, а также между бустерными дозами, обычно составляет от приблизительно 2 до приблизительно 24 недель, чаще приблизительно от 2 до 12 недель, например, от 2 до 8 недель, от 3 до 6 недель и т. д. Независимо от способа введения, например, внутримышечной инъекции, инъекции в десну, интраназального введения или тому подобного, объем разовой дозы вакцины обычно будет составлять от приблизительно 1 мкл до приблизительно 500 мкл, обычно от приблизительно 1 мкл до приблизительно 250 мкл, чаще от приблизительно 2,5 мкл до приблизительно 200 мкл и предпочтительно от приблизительно 5 мкл до приблизительно 150 мкл. Следует принимать во внимание, что общая концентрация антигена в иммуногенной композиции соответствует иммунологически эффективной дозе композиции на единицу объема, исходя из вышеупомянутых рекомендаций по объему дозы.

Для простоты применения иммуногенная композиция согласно изобретению может быть включена в состав упакованного продукта или "набора", включающего инструкции для самостоятельного введения или введения врачом. Набор включает герметичный контейнер, содержащий дозу вакцинного состава, обычно "стандартную дозу", подходящую в случае введения разовой дозы, которая является иммунологически эффективной. Вакцина может присутствовать в жидкой форме и, таким образом, быть готовой для введения в виде инъекции или тому подобного, или она может присутствовать в другой форме, которая требует от пользователя проведения процесса приготовления перед введением, например, гидратации лиофилизированного состава, активации инертного компонента или тому подобного. Набор также может включать два или более герметичных контейнера с примирующей дозой в первом контейнере и бустерной дозой в одном или более дополнительных контейнерах, или вакцинным составом против пародонти-та в первом контейнере и вакциной, направленной против другой инфекции, которая может быть или не быть связанной с инфекцией, вызываемой *Porphyromonas*, в другом контейнере.

Экспериментальный раздел

Получение бесклеточного экстракта.

Бесклеточные экстракты, содержащие дополнительный шаперон DsbC, получали, как описано ранее в Groff et al. (2014) *Mabs* 7(1):231-242. Вкратце, штамм *E. coli* SBJY001 (см. Yin et al. (2012) *Mabs* 6(3):671-678) трансформировали плазмидой pACYC, несущей tandemные копии гена dsbC. Клетки выращивали, собирали и гомогенизировали, как описано в Zawada et al. (2011) *Biotechnol. Bioeng.* 108(7): 1570-1578. Посредством последующего осветления с помощью центрифугирования получили экстракт, который был использован для последующей реакции бесклеточной экспрессии.

Получение рекомбинантных Mfa1, HA1, HA2 *P. gingivalis* и очистка.

Последовательность ДНК, кодирующие белки HA1, HA2 и фимбрилина Mfa1, ассоциированные с *P. gingivalis*, были оптимизированы по кодонам, синтезированы (DNA 2.0; Менло-Парк, Калифорния) и клонированы в ранее описанный вектор pYD317 [30]. Бесклеточные реакции проводили с помощью системы Xpress CFTM CFPS, по существу как описано ранее (Yin et al., см. выше; Zimmerman et al. (2014) *Bioconjug. Chem.* 25(2):351-361). Для экспрессии HA1, HA2 и фимбрилина Mfa1 проводили реакции с предварительной обработкой IAM (йодацетамид) при 25°C с добавлением окисленного глутатиона (2 мМ) для создания окислительной среды для дисульфидных связей. Экспрессию HA1 и HA2 проводили без обработки клеточного экстракта IAM; добавление восстановленного глутатиона (8 мМ) поддерживало восстанавливающую среду для экспрессии. По прошествии 16 ч протекания реакции экспрессированные белки выделяли из бесклеточных реакционных смесей с использованием аффинной очистки с помощью his-метки на смоле Ni-сефароза (GE Lifesciences, Питтсбург, Пенсильвания) в соответствии с рекомендациями производителя. Дальнейшую очистку белка HA1, HA2, а также белка фимбрилина Mfa1 осуществляли с помощью катионообменной хроматографии на смоле SP ImpRes (GE Lifesciences). Вкратце, в пулах элюатов, полученных на Ni-сефарозе, заменяли буфер цитратом натрия (50 мМ), NaCl (50 мМ), pH 4,5 и наносили их на колонку, уравновешенную в том же буфере. Затем очищенный белок элюировали градиентным элюированием до Трис (50 мМ), NaCl (1М), pH 7,5. Аналогичным образом дополнительно очищали HA2 с помощью анионообменной хроматографии на Q ImpRes (GE Lifesciences). Уравновешивание и загрузку колонки проводили в Трис (50 мМ), NaCl (50 мМ), pH 7,5, с последующим градиентным элюированием до Трис (50 мМ), NaCl (1М), pH 7,5.

После заключительной хроматографической очистки все белки подвергали диализу в PBS Дульбекко и анализировали с помощью SDS-PAGE, а также проводили анализ интактной массы с помощью Q-TOF (квадрупольного времяпролетного спектрометра) (Agilent, Санта-Клара, Калифорния). В случае HA1 анализ интактной массы убедительно показал, что цистеины были окислены и образовали ожидаемую дисульфидную связь.

Культивирование *P. gingivalis* и оценка бактериальной чистоты.

Штамм *Porphyromonas gingivalis* A7436 выращивали, как описано ранее (Huang et al. (2015) *Mol.*

Oral. Microbiol. 30(6):438-450). Вкратце, исходный материал, хранившийся в морозильной камере, высевали на чашки с анаэробным кровяным агаром, *P. gingivalis* собирали по прошествии трех дней анаэробного роста при 37°C, собранные организмы помещали в стерильные бульоны с сердечно-мозговым экстрактом с добавками L-цистеина (0,75 г/л), гемина (5 мг/л) и менадиона (1 мг/л). Через 24 часа бактерии в логарифмической фазе роста собирали центрифугированием и суспендировали до концентрации 1×10^{10} КОЕ/мл в 2% карбоксиметилцеллюлозе в апиrogenном физиологическом растворе для перорального инфицирования (100 мкл/инфицирование). Для иммунизации выращенные в бульоне *P. gingivalis* доводили до концентрации 1×10^9 КОЕ/мл в физиологическом растворе для инъекций и термоинактивировали (60°C в течение 30 минут) перед инъекцией, при этом уничтожение бактерий подтверждали посевом. Окрашивание по Граму проводили на всех бульонных культурах *P. gingivalis* в целях обеспечения чистоты.

Мыши, иммунизация и пероральное инфицирование.

Шестинедельных самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, Уилмингтон, Массачусетс) случайным образом разделяли на шесть групп (n = 8/группу). Они содержались в помещениях, свободных от специфической патогенной микрофлоры, и получали воду и пищу без ограничений. Всех живых животных использовали с одобрения IACUC (Американская ассоциация по аккредитации лабораторных исследований на животных). Группы включали G1) неиммунизированные / без контроля пероральным инфицированием, G2) неиммунизированные / пероральное инфицирование *P. gingivalis*, G3) иммунизация термоинактивированными *P. gingivalis* / пероральное инфицирование *P. gingivalis*, G4) комбинированная иммунизация Mfa1+HA1+HA2 в квасцах / пероральное инфицирование *P. gingivalis*, G5) комбинированная иммунизация Mfa1+HA1+HA2 в MPL / пероральное инфицирование *P. gingivalis*, и G6) комбинированная иммунизация Mfa1+HA1+HA2 в физиологическом растворе для инъекций / пероральное инфицирование *P. gingivalis*. До начала иммунизаций у каждого животного брали исходные образцы сыворотки крови, а затем соответствующие группы мышей иммунизировали путем внутримышечной инъекции инактивированных *P. gingivalis* или Mfa1+HA1+HA2 (5 мкг каждого белка/инъекция), суспендированных в квасцах (Imject, ThermoFisher Sci, Рокфорд, Иллинойс), монофосфорил-липиде А (MPL; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) или физиологическом растворе для инъекций. Последующие внутримышечные бустерные иммунизации проводили через 2 и 4 недели после первичной иммунизации. Через две недели после завершения иммунизации у животных брали образец сыворотки непосредственно перед пероральным инфицированием *P. gingivalis*. Пероральное инфицирование мышей осуществляли, как сообщалось ранее (Gonzalez et al. (2003) Infect. Immun. 71(4):2283-2287). Вкратце, животные получали 10-дневный курс перорального сульфаметоксазола/триметоприма (Hi-Tech Pharmical, Амтивилл, Нью-Йорк) в питьевой воде с последующим прекращением введения антибиотиков и трехдневным отдыхом. Суспензию *P. gingivalis* (1×10^{10} КОЕ/мл + 2% карбоксиметилцеллюлозы в физиологическом растворе для инъекций) осторожно наносили на десны подвергшихся инфицированию мышей, используя шприц, снабженный иглой для кормления, 3 раза в течение 1 недели. Контрольные животные включали животных, подвергшихся имитации инфицирования с помощью только 2% карбоксиметилцеллюлозы. После 42-дневного отдыха после завершения перорального инфицирования животных умерщвляли, перед умерщвлением брали образцы крови, и голову каждой мыши обрабатывали для измерения потери костной ткани челюсти. Последний образец сыворотки отбирали у каждого животного при умерщвлении, и все собранные образцы сыворотки хранили при -80°C.

Детекция Mfa1-, HA1- и HA2-специфичных IgG в сыворотке мышей.

Антигены (0,5 мкг/мл) высевали при 4°C в течение ночи на планшеты Maxisorp (NUNC, Рочестер, Нью-Йорк), трижды промывали PBS, содержащим Твин-20 (0,05%), и блокировали PBS с 1% BSA в течение минимум 1 ч. Последовательно 2-кратно разведенные образцы сыворотки от вакцинированных мышей (100 мкл/лунку) добавляли в отдельные лунки и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали, инкубировали с антителами, специфичными к соответствующему изолированному, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:6000; Southern Biotech, Бирмингем, Алабама), визуализировали с добавлением 100 мкл субстрата ТМВ (Pierce, Рокфорд, Иллинойс) в течение 20-30 мин и останавливали реакцию добавлением 50 мкл H₂SO₄ (1,0 М). Поглощение в каждой лунке измеряли при 450 нм за вычетом поглощения при 570 нм для поправки на отклонения в высевании. Полученные данные для каждого образца наносили на график с получением кривой зависимости кратности разведения от измерения A₄₅₀-A₅₇₀. Титр антител определяли как срединную точку кривой разведения, как определено с помощью расчетов EC₅₀ с использованием программного обеспечения для статистического анализа Prism (GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния). Среднее значение EC₅₀ для каждой когорты принимали за конечный титр антител.

Измерение потери костной ткани челюсти.

Уровни костной ткани челюсти определяли с помощью морфометрического анализа, как это делалось ранее (Gibson et al. (2001) Infect. Immun. 69(12): 7959-7963). После умерщвления вокруг верхнечелюстных моляров удаляли мягкие ткани, и после тщательной очистки окрашивали черепа метиленовым синим. До начала измерения костной ткани образцы были замаскированы исследователем, не осведомленным о распределении на группы. Измерения костной ткани челюсти на верхнечелюстных молярах

были получены с помощью цифровой камеры, прикрепленной к стереомикроскопу, от гребня альвеолярной кости (ABC) до эмалево-цементной границы (CEJ) в 14 установленных точках (Baker et al. (1994) Arch. Oral Biol. 39(12): 1035-1040). Анализ изображений проводили с использованием ImageJ (Schneider et al. (2012) Nat. Methods 9(7): 671-675), длины в пикселях на экране были переведены в миллиметры, и данные, полученные от каждого животного в группе, были объединены с получением средней длины на уровне группы \pm SEM.

Статистический анализ.

Данные анализировали с помощью программного обеспечения для статистического анализа Prism (GraphPad). Сравнение между группами проводили, как указано, с использованием непарного t-критерия Стьюдента или ANOVA с апостериорным анализом, и значимым считали $P < 0,05$.

Результаты.

SDS-PAGE: очищенные белки, полученные с помощью CFPS, денатурировали и добавляли в лунки (3 μ г/лунку), разделяли на гелях Bis-Tris с градиентом 4-12% и окрашивали кумасси синим. Результаты анализа белков, полученных в восстанавливающих условиях, показаны на фиг. 1. Дорожка 1: маркеры молекулярной массы. Дорожка 2: Mfa1. Дорожка 3: HA1. Дорожка 4: HA2.

Чтобы определить, вызывали ли белки, доставленные внутримышечной инъекцией, ответы специфичных к белку антител IgG, и чтобы определить, влияли ли различные адъюванты (квасцы по сравнению с MPL) на вызванный ответ IgG, у групп мышей по завершении периода иммунизации и при умерщвлении собирали образцы сывороток и тестировали на уровни Mfa1-, HA1- и HA2-специфичных IgG с помощью ELISA. Кривые титрования для каждого образца сыворотки были преобразованы в значения EC_{50} . Как и ожидалось, сыворотки, полученные от неиммунизированной группы мышей до перорального инфицирования, характеризовались низкими уровнями IgG к Mfa1, HA1 и HA2. Сыворотки, взятые у мышей, иммунизированных инактивированными *P. gingivalis* A7436, вызывали символическое увеличение IgG, специфичных к очищенному Mfa1 и HA2, причем HA2 > Mfa1. Для групп мышей, иммунизированных в/м комбинированными белками, суспендированными в квасцах, MPL или физиологическом растворе для инъекций, было выявлено, что все мыши, получавшие комбинированную вакцину, отвечали антиген-специфичными IgG. Уровни IgG к Mfa1 после иммунизации были наиболее устойчивыми в адъюванте MPL; результат в MPL превышал таковой для квасцов или физиологического раствора. В случае HA1 квасцы лучше всего стимулировали IgG, специфичные к молекуле, причем квасцы > MPL > физиологический раствор, в то время как в случае HA2 квасцы и MPL стимулировали реагирование антиген-специфичных IgG на аналогичных уровнях, и в обоих случаях оно было выше, чем при использовании физиологического раствора.

Сравнение уровней IgG при умерщвлении показало, что у группы неиммунизированных мышей, перорально инфицированных *P. gingivalis* A7436, генерировалось несколько повышенное количество специфических IgG к Mfa1 и HA2, но не к HA1. Иммунизация термоинактивированными *P. gingivalis* A7436 показала аналогичное повышение на низком уровне по сравнению с уровнями IgG, измеренными непосредственно перед пероральным инфицированием, независимо от использования адъюванта или физиологического раствора, за исключением измеренного IgG против HA1 у мышей, иммунизированных комбинацией белков в физиологическом растворе.

На фиг. 2 представлены сывороточные значения EC_{50} IgG против Mfa1, HA1 и HA2 *P. gingivalis*. Группы животных G1-G6 служили контрольными или экспериментальными группами, и образцы сыворотки брали у животных непосредственно перед пероральным инфицированием (Post-Vax; незакрашенные столбцы) или при умерщвлении (закрашенные столбцы), и по данным ELISA рассчитывали значения EC_{50} молекул IgG, специфичных к (A) Mfa1, (B) HA1 и (C) HA2 *P. gingivalis*.

Чтобы понять, может ли комбинация белков эффективно ограничивать степень вызываемой *P. gingivalis* потери костной ткани челюсти, иммунизированных животных подвергали пероральному инфицированию *P. gingivalis*. Группы мышей, которые не были иммунизированы или иммунизированы инактивированными *P. gingivalis*, служили в качестве контролей. По сравнению с мышами, получившими имитацию инфицирования (G1), у животных, перорально инфицированных *P. gingivalis* A7436 (G2), развивалась потеря костной ткани челюсти, о чем свидетельствует увеличение среднего расстояния от ABC до CEJ ($p < 0,001$). Как и ожидалось, иммунизация инактивированным составом *P. gingivalis* A7436 (G3) обеспечивала измеримую защиту от потери костной ткани, вызванной гомологичным организмом ($p < 0,01$). Группы мышей, которым вводили комбинированную белковую вакцину, полученную из гетерологичного штамма *P. gingivalis*, суспендированную в квасцах (G4) или MPL (G5), были защищены от вызванной *P. gingivalis* потери костной ткани челюсти ($p < 0,01$ для каждой по сравнению с проведением только перорального инфицирования *P. gingivalis*). Между адъювантами не наблюдалось различий в уровне защиты (измерения расстояния от ABC до CEJ), что свидетельствует о том, что внутримышечная доставка вакцины-кандидата обеспечивала аналогичные защитные ответы ($p > 0,05$). Также было отмечено, что группа животных, иммунизированных комбинированной белковой вакциной, суспендированной в физиологическом растворе (G6), также была защищена от перорального инфицирования *P. gingivalis*, аналогично защите, наблюдавшейся для случая, когда белки вводили внутримышечно с адъювантом

($p > 0,05$ по сравнению с адьювантами квасцами или MPL), и уровень защиты независимо от используемого адьюванта был аналогичен уровню защиты, обеспечиваемому в группе, вакцинированной термоинактивированным цельным организмом ($p > 0,05$ для всех).

На фиг. 3 показаны результаты экспериментов по оценке потери костной ткани челюсти *in vivo*. (A) Мышей BALB/c случайным образом разделяли на группы (G1-6), и иммунизированные животные получали 3 внутримышечных инъекции комбинированного белкового коктейля в соответствующем адьюванте или в физиологическом растворе для инъекций с 2-недельными интервалами (примирование и 2 бустерных инъекции; красные стрелки). Контрольная группа иммунизации (G3) получала термоинактивированные *P. gingivalis* (эквивалентно 1×10^7 КОЕ/инъекция). Все животные получали 10-дневный курс сульфаметоксазола/триметоприма (антибиотики) в питьевой воде с последующим прекращением введения антибиотиков за три дня до имитации перорального инфицирования (G1) или перорального инфицирования *P. gingivalis* (3 раза в течение 1 недели; G2-6). После завершения перорального инфицирования (0 нед.) животным давали отдохнуть в течение шести недель и затем умерщвляли. На фиг. 3 представлены результаты, демонстрирующие среднее расстояние между эмалево-цементной границей (CEJ) и гребнем альвеолярной кости (ABC) в мм \pm SEM, # = $p < 0,001$ по сравнению с G1 (не инфицированные), *** = $p < 0,01$ по сравнению с G2 (только пероральное инфицирование *P. gingivalis*) (с использованием ANOVA и теста множественных сравнений Данна).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере один адьювант и:
 - (a) последовательность антигена Mfa1, при этом указанная последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4; и
 - (b) последовательность антигена HA1, последовательность антигена HA2 или как последовательность антигена HA1, так и последовательность антигена HA2, где
 - (i) указанная последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5, и
 - (ii) указанная последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 6.
2. Иммуногенная композиция по п.1, где иммуногенная композиция содержит первый рекомбинантный полипептид, содержащий:
 - (a) последовательность антигена Mfa1 и последовательность антигена HA1;
 - (b) последовательность антигена Mfa1 и последовательность антигена HA2; или
 - (c) последовательность антигена Mfa1, последовательность антигена HA1 и последовательность антигена HA2.
3. Иммуногенная композиция по п.1, где иммуногенная композиция содержит:
 - (a) первый рекомбинантный полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1; и
 - (b) второй рекомбинантный полипептид, содержащий последовательность антигена HA1 или последовательность антигена HA2 или как последовательность антигена HA1, так и последовательность антигена HA2.
4. Иммуногенная композиция по п.1, где иммуногенная композиция содержит:
 - (a) первый рекомбинантный полипептид, содержащий последовательность антигена Mfa1;
 - (b) второй рекомбинантный полипептид, содержащий последовательность антигена HA1; и
 - (c) третий рекомбинантный полипептид, содержащий последовательность антигена HA2.
5. Иммуногенная композиция по п.1, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 1, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 2, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 3.
6. Иммуногенная композиция по п.4, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 1, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 2, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 3.
7. Иммуногенная композиция по п.5, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 3.
8. Иммуногенная композиция по п.1, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 4, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 5, и последовательность

ность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 6.

9. Иммуногенная композиция по п.4, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 4, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 5, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 6.

10. Иммуногенная композиция по п.9, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 4, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6.

11. Вакцинный состав, содержащий иммуногенную композицию по любому из пп.1-10 и по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

12. Вакцинный состав по п.11, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 1, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 2, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 3.

13. Вакцинный состав по п.11, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 3.

14. Вакцинный состав по п.11, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 4, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 5, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную SEQ ID NO: 6.

15. Вакцинный состав по п.11, где последовательность антигена Mfa1 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 4, последовательность антигена HA1 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5, и последовательность антигена HA2 содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6.

16. Вакцинный состав по любому из пп.11-15, где по меньшей мере одно вспомогательное вещество выбрано из носителей, солюбилизаторов, эмульгаторов, стабилизаторов, консервантов, изотонических средств, буферных систем, диспергаторов, разбавителей, модификаторов вязкости и усилителей абсорбции.

17. Вакцинный состав по любому из пп.11-16, приготовленный в виде стерильного раствора для инъекции.

18. Вакцинный состав по любому из пп.11-16 в лиофилизированной форме.

19. Способ иммунизации субъекта против заболевания пародонта, включающий введение указанному субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.1-10.

20. Способ иммунизации субъекта против заболевания пародонта, включающий введение указанному субъекту иммунологически эффективного количества вакцинного состава по любому из пп.11-18.

21. Способ по п.20, где заболевание пародонта связано с бактерией *Porphyromonas*, выбранной из группы, состоящей из *P. gingivalis*, *P. gulae*, *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis*, *P. canoris*, *P. salivosa* и *P. circumdentaria*.

22. Способ по п.21, где бактерия *Porphyromonas* представляет собой *P. gingivalis* или *P. gulae*.

23. Способ по любому из пп.20-22, где субъект представляет собой человека.

24. Способ по любому из пп.20-22, где субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека.

25. Способ по любому из пп.20-24, где вакцинный состав содержит стерильный раствор для инъекции, и где вакцинный состав вводят указанному субъекту путем инъекции.

26. Способ по п.25, где вакцинный состав вводят в виде внутримышечной инъекции или в виде инъекции в десну.

27. Способ по любому из пп.20-24, где вакцинный состав вводят трансмукозально или интраназально.

28. Способ по любому из пп.20-27, где вакцинный состав вводят однократно.

29. Способ по любому из пп.20-27, где вакцинный состав вводят два или более раз.

30. Способ по любому из пп.20-29, где субъект демонстрирует симптомы пародонтита, и вакцинный состав вводят в качестве терапевтической вакцины.

31. Способ снижения риска развития пародонтита у субъекта, включающий введение указанному субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.1-10.

32. Способ снижения риска развития пародонтита у субъекта, включающий введение указанному

субъекту иммунологически эффективного количества вакцинного состава по любому из пп.11-18.

33. Способ по п.32, где у субъекта имеется по меньшей мере один фактор риска развития пародонтита.

34. Способ по п.33, где по меньшей мере один фактор риска выбран из возраста, генетической предрасположенности, системного заболевания, наличия эндодонтических поражений или абсцессов или их комбинации.

35. Способ снижения потери костной ткани, вызванной заболеванием пародонта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.1-10.

36. Способ предупреждения потери костной ткани, вызванной заболеванием пародонта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, иммунологически эффективного количества вакцинного состава по любому из пп.11-18.

37. Способ снижения воспаления, вызванного заболеванием пародонта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.1-10.

38. Способ снижения воспаления, вызванного заболеванием пародонта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества вакцинного состава по любому из пп.11-18.

39. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-10, где одна или более из последовательности антигена Mfa1, последовательности антигена HA1 и последовательности антигена HA2 получена путем бесклеточного синтеза белка.

40. Применение иммунологически эффективного количества вакцинного состава по любому из пп.11-18 в изготовлении лекарственного средства для иммунизации субъекта против заболевания пародонта.

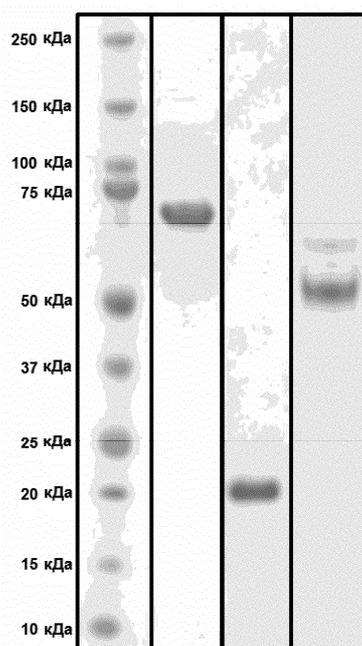
41. Применение иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.1-10 в изготовлении лекарственного средства для снижения риска развития пародонтита у субъекта.

42. Применение иммунологически эффективного количества вакцинного состава по любому из пп.11-18 в изготовлении лекарственного средства для снижения риска развития пародонтита у субъекта.

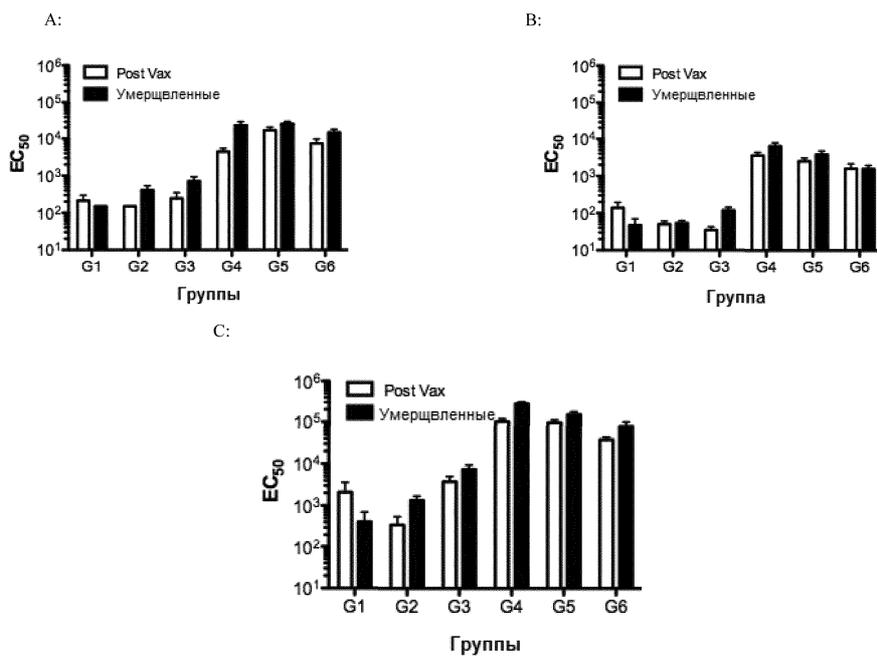
43. Применение иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.1-10 в изготовлении лекарственного средства снижения потери костной ткани, вызванной заболеванием пародонта.

44. Применение эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.1-10 в изготовлении лекарственного средства для снижения воспаления, вызванного заболеванием пародонта.

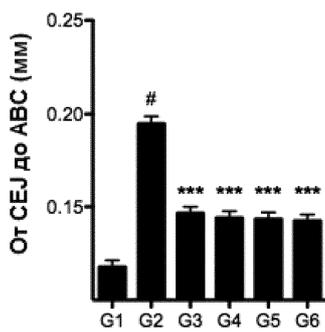
45. Применение эффективного количества вакцинного состава по любому из пп.11-18 в изготовлении лекарственного средства для снижения воспаления, вызванного заболеванием пародонта.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

