

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390472** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.07.05

(22) Дата подачи заявки
2021.09.09

(51) Int. Cl. *C07K 14/22* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12R 1/36 (2006.01)

(54) **ВЕЗИКУЛЫ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ**

(31) **20195709.9**

(32) **2020.09.11**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/074744**

(87) **WO 2022/053535 2022.03.17**

(71) Заявитель:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)**

(72) Изобретатель:

**Делани Изабель, Джордано Джулиа,
Леуцци Розанна, Маргарит И Рос
Иммакулада (IT)**

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к области вакцинных композиций против нейссерии (в частности, вакцинных композиций против гонококка) и применению таких композиций в медицине. Более конкретно, данное изобретение относится к генетически модифицированным гонококкам штамма FA1090 и полученным из них везикулам наружной мембраны. В изобретении также предложен способ получения генетически модифицированных гонококков по изобретению, а также иммуногенных композиций и вакцин, содержащих везикулы наружной мембраны по изобретению.

A1

202390472

202390472

A1

ВЕЗИКУЛЫ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к генетически модифицированной бактерии *Neisseria gonorrhoeae* и везикулам наружных мембран, полученных из нее. Везикулы наружных мембран особенно эффективны в иммуногенных композициях и вакцинах, например, вакцинах для применения в медицине.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Грамотрицательные диплококки *Neisseria gonorrhoeae* представляют собой облигатный патоген человека, вызывающий инфекцию, передающуюся половым путем (ИППП), гонорею. Гонококковая инфекция обычно проявляется инфекцией слизистых оболочек половых путей, прямой кишки, зева или глаз.

Инфекция *Neisseria gonorrhoeae* представляет собой серьезную глобальную проблему для здравоохранения: по оценкам, во всем мире регистрируется более 106 миллионов случаев в год (ВОЗ, 2018). Гонорея является вторым наиболее часто регистрируемым инфекционным заболеванием в США (CDC 2019), и ее распространенность во всем мире, по-видимому, растет. Например, распространенность в Австралии увеличилась на 63% за последние 5 лет (*Kirby Institute. HIV, viral hepatitis and sexually transmissible infections in Australia: Annual Surveillance Report 2017*) и на 63% в США в период между 2014 и 2018 (*CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2018*). Однако, поскольку широко распространены бессимптомные инфекции (ими подвержены до 80% инфицированных женщин и 40% инфицированных мужчин), истинная распространенность *N. gonorrhoeae* до конца не известна.

В отсутствие лечения или диагностики инфекция *N. gonorrhoeae* может привести к серьезным последствиям. К таким последствиям относятся эндометрит, воспалительные заболевания органов малого таза, абсцессы уrogenитального тракта, неблагоприятные исходы беременности, неонатальные осложнения (включая слепоту) и бесплодие. Кроме того, заражение *N. gonorrhoeae* увеличивает риск заражения и передачи вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (*Hayes R, Watson-Jones D, Celum C, van de Wijgert J, Wasserheit J. Treatment of sexually transmitted infections for HIV prevention: end of the road or new beginning? AIDS 2010; 24: S15–26*).

Борьба с *N. gonorrhoeae* в значительной степени основана на лечении антибиотиками. Однако этот подход скомпрометирован быстрым и продолжающимся

развитием устойчивости к противомикробным препаратам (УПП). У *N. gonorrhoeae* выработалась устойчивость ко многим антибиотикам, которыми ранее успешно лечили инфекцию. Это оставило цефалоспорины в качестве последней линии защиты для лечения гонореи. Однако штаммы с высоким уровнем устойчивости к цефалоспорином широкого спектра действия (например, цефтриаксону и цефиксиму) в настоящее время выделены по всему миру (Unemo M, Jensen JS. *Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: gonorrhoea and Mycoplasma genitalium*. *Nat Rev Urol* 2017; 14:139–152).

Стремясь положить конец эпидемиям ИППП как серьезной проблеме общественного здравоохранения, ВОЗ недавно выпустила проект глобальной стратегии в области здравоохранения, в которой поставлена глобальная целевая цель по снижению заболеваемости *N. gonorrhoeae* на 90% к 2030 г. (WHO, *Global Health Sector Strategy on sexually transmitted infections, 2016–2021, 20 December 2017*). Учитывая способность гонококков вызывать УПП, гонококковая вакцина станет ключом к долгосрочному контролю над гонореей (Edwards JL, Jennings MP, Seib KL *Neisseria gonorrhoeae* vaccine development: hope on the horizon? *Current Opinion in Infectious Diseases: June 2018 - Volume 31 - Issue 3 - p 246-250*), (Gottlieb SL, Jerse AE, et al. *Advancing vaccine development for gonorrhoea and the Global STI Vaccine Roadmap*. *Sex Health*. 2019;16(5):426-432. doi:10.1071/SH19060).

Однако до настоящего времени разработка гонококковой вакцины была затруднена, поскольку ни одна специфическая гонококковая вакцина-кандидат не продемонстрировала клиническую защиту. Тем не менее, недавнее ретроспективное исследование методом случай-контроль показало, что снижение заболеваемости гонореей произошло среди пациентов клиник сексуального здоровья (в возрасте 15-30 лет) после их вакцинации вакциной MeNZB с везикулами наружной мембраны (OMV), направленной против *Neisseria meningitidis* серогруппы B (то есть перекрестная защита). Однако эффективность MeNZB против *N. gonorrhoeae* была относительно низкой (по оценкам, 31 %) (Petousis-Harris H, Paynter J, Morgan J, et al. *Effectiveness of a Group B OMV meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand – a case control study*. *Lancet* 2017; 390:1603–1610).

OMV представляют собой сложную смесь компонентов наружной мембраны, которые естественным образом высвобождаются грамотрицательными бактериями, такими как *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* (Van Der Pol L, Stork M, Van Der Ley P. *Outer membrane vesicles as platform vaccine technology*. *Biotechnol J* 2015; 10:1689–1706). Наблюдение за перекрестной защитой вакцины MeNZB на основе OMV впервые предоставило доказательства того, что вакцина на основе OMV может быть эффективным подходом для защиты субъектов от гонореи. В связи с этим Liu с коллегами показали, что

интравагинальная инокуляция микроинкапсулированного интерлейкина-12 и OMV гонококка может обеспечивать защиту мышей от инфекции *N. gonorrhoeae* (Liu Y, Hammer LA, Liu W, et al. *Experimental vaccine induces Th1-driven immune responses and resistance to Neisseria gonorrhoeae infection in a murine model. Mucosal Immunol* 2017; 10:1594–1608). Однако другие попытки использовать OMV гонококка в качестве возможных вакцин не дали убедительных результатов. Например, гонококковая вакцина-кандидат на основе OMV была иммуногенной с точки зрения индукции антител в сыворотке и слизистых оболочках, но не дала результатов в исследовании с контрольным заражением на мышах (Freixeiro et al, *A genetically modified native outer membrane vesicle vaccine administered by a subcutaneous/intranasal route failed to accelerate clearance of gonococcus in a heterologous mouse challenge study. 21st International Pathogenic Neisseria Conference September 23 – 28, 2018, Oral Poster Presentation Abstract OP174*).

По-прежнему существует потребность в эффективной вакцине против гонореи. Авторы настоящей заявки неожиданно обнаружили, что результатом получения генетически модифицированного гонококка, в частности, из исходного штамма FA1090 оказался гонококк с улучшенными свойствами с точки зрения его полезности в качестве вакцинного штамма. В частности, генетически модифицированный гонококк а) был способен расти в жидкой культуре и б) продуцировал OMV на продуктивном уровне по сравнению с другими штаммами гонококка с такими же генетическими модификациями. Кроме того, указанный генетически модифицированный гонококк FA1090 продуцировал OMV с улучшенными иммуногенными свойствами, такими как их способность индуцировать значительные перекрестно-бактерицидные титры антител. Это было само по себе удивительно. Это было особенно неожиданно с учетом геномных анализов, которые предполагали, что *Neisseria gonorrhoeae* штамма FA1090 были генетически разнородными (то есть периферическими) по сравнению с геномами более 4000 гонококков сравнения.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящей заявки обнаружили, что путем создания генетически модифицированного гонококка, в частности, из исходного штамма FA1090, они смогли получить вакцинный штамм с неожиданными свойствами. В частности, изобретатели обнаружили, что генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090 может быть перенесена в жидкую культуру и продуцировать OMV на продуктивных уровнях по сравнению с другими гонококковыми штаммами с такими же генетическими модификациями. Кроме того, OMV, полученные из указанного генетически модифицированного гонококка FA1090, были высокоиммуногенными и индуцировали

значительные титры перекрестно-бактерицидных антител. Учитывая эти доклинические данные, вакцина на основе раскрытых здесь везикул наружной мембраны способна проявлять клиническую эффективность в профилактике гонококковой инфекции и заболевания у людей.

Таким образом, в первом аспекте предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена, мРНК и/или полипептида биосинтеза липида А лауроилацилтрансферазы (*lpxII*); и
- б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена, мРНК и/или полипептида модифицируемого восстановлением белка (*rmp*).

В следующем аспекте предложен способ получения гонококковой бактерии, включающий либо:

- а) снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpxII* в гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерия FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090; или
- б) снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpxII* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090.

В еще одном аспекте предложено применение гонококковой бактерии для получения везикул наружной мембраны.

В следующем аспекте предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококка штамма FA1090, где указанная везикула наружной мембраны содержит либо пониженные уровни, либо неопределяемый уровень полипептида *lpxII* и полипептида *rmp*.

В следующем аспекте предложена везикула наружной мембраны (OMV) из генетически модифицированного гонококка штамма FA1090, содержащего генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) а) снижает или прекращает экспрессию и/или функцию гена *lpxII*, мРНК *lpxII* и/или полипептида *LpxII*; и б) снижает или прекращает экспрессию и/или функцию гена *rmp*, мРНК *rmp* и/или полипептида *Rmp*, причем указанная OMV включает: 1)

пониженные уровни полипептида Rmp по сравнению с уровнями полипептида Rmp в сравнительной OMV из штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации; и 2) пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной OMV.

В еще одном аспекте предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококковой бактерии по изобретению.

В еще одном аспекте предлагается иммуногенная композиция, содержащая везикулу наружной мембраны по изобретению.

В еще одном аспекте предложена вакцина, содержащая либо везикулу наружной мембраны по изобретению, либо иммуногенную композицию по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция по изобретению или вакцина по изобретению для применения в медицине.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция по изобретению или вакцина по изобретению для применения при иммунизации субъекта против инфекции *Neisseria*, например, инфекции *N. gonorrhoea*.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция по изобретению или вакцина по изобретению для применения при лечении или предупреждении заболевания, вызванного *Neisseria*, например, *N. gonorrhoea*.

В еще одном аспекте предложен способ лечения или профилактики заболевания, вызванного *Neisseria* (например, *N. gonorrhoea*), у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению.

В еще одном аспекте предложен способ иммунизации субъекта, нуждающегося в этом, против *Neisseria* (например, *N. gonorrhoea*), включающий введение субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению.

В еще одном аспекте предложен способ выработки иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению.

В еще одном аспекте предложено применение иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного *Neisseria*.

В еще одном аспекте предложено применение иммуногенной композиции по

изобретению или вакцины по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного *N. gonorrhoea*.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, где субъекту вводят по меньшей мере 2 дозы композиции.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, где субъектами являются подростки и/или взрослые.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, в которых субъект подвержен повышенному риску инфицирования *N. gonorrhoea* относительно среднего риска в общей популяции.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способа или применение по изобретению, где субъекта иммунизируют совместно против одного или нескольких дополнительных инфекционных агентов.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, где указанную иммуногенную композицию или вакцину вводят внутримышечным или внутрибрюшинным путем.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1: Встречаемость гонококковых изолятов, рассматриваемых в геномном анализе (как описано в Примере 1), по странам происхождения (* = встречаемость <0,5%). Для анализа было доступно 4058 полных геномов *N. gonorrhoeae*.

ФИГ. 2: Филогенетический анализ коровых и не-коровых однонуклеотидных полиморфизмов (snps) геномов гонококков, включая геномы штаммов, имеющих в собственной коллекции (отмечены символом □). Длина ветвей пропорциональна генетическому расстоянию. Идентифицировали шесть компактных кластеров, отмеченных черными стрелками.

ФИГ. 3: Филогенетическая реконструкция и структура популяции 4058 геномов гонококков, включая штаммы из собственной коллекции (схема NM_cgMLST_v1.0). Кластеризация по профилям 4058 штаммов, установленных типированием полного генома.

ФИГ. 4: Для определения оптимального количества разбиений популяции гонококка применяли оптимизацию параметра силуэт. Изменчивость всего генома показывает, что изоляты группируются в 24 отдельных кластера.

ФИГ. 5: Центральность (близость к центру) определяется как среднее расстояние

каждого штамма по отношению к другим на основе полногеномного анализа. Среднее филогенетическое расстояние между каждым штаммом и всеми остальными («центральность») на основе аллельных вариаций 1605 локусов генов NM_cgMLST_v1.0.

ФИГ. 6А, Фиг. 6В и Фиг. 6С: Схематическое изображение контролей для поколения мутантов. Для проверки возникновения двойной гомологичной рекомбинации и образования мутантного клона конструировали пару внешних по отношению к области делеции праймеров, как показано (Фиг. 6А). Присутствие клеток дикого типа, смешанных с общей мутантной популяцией (Фиг. 6С), исследовали с помощью праймеров, которые специфически спариваются с геномом дикого типа, но не с мутантом (Фиг. 6В).

ФИГ. 7: Агарозный гель при проверке клонов FA1090 $\Delta lpxI1$ при помощи «внешней» ПЦР. Проводили ПЦР с праймерами, внешними по отношению к событию рекомбинации, и продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле. В качестве отрицательного контроля реакции ПЦР использовали воду. В качестве маркера использовали маркер молекулярных масс 1kb plus. Стрелки указывают ожидаемые полосы для мутанта с нокаутом (КО) и для штамма дикого типа (WT).

ФИГ. 8: Агарозный гель при проверке клонов FA1090 $\Delta lpxL1$ при помощи «внутренней» ПЦР. Проводили ПЦР с праймерами, специфичными для популяции дикого типа, и продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле. Наличие полосы коррелирует с наличием остаточных клеток дикого типа в популяции. В качестве отрицательного контроля реакции ПЦР использовали воду. В качестве маркера использовали маркер молекулярных масс 1kb plus.

ФИГ. 9А: Структуры липида А, очищенного из референсной партии FA1090, и его масс-спектроскопический спектр, полученный с применением MALDI-TOF. Записанные спектры показывают немодифицированный гексацилированный липид А: самый высокий пик соответствует форме MPLA, второй – форме BPLA. MALDI-TOF профиль липида.

ФИГ. 9В: Структура липида А, соответствующая пентаацилированной форме, очищенной от генетически модифицированного FA1090 $\Delta lpxI1$, и его масс-спектроскопический спектр, полученный с применением MALDI-TOF. По сравнению со спектром на Фиг. 9А, разница масс между каждым из соответствующих пиков (MPLA и BPLA) составляет 182 Да, что представляет собой массу цепи лауриновой кислоты. Сигнал при m/z 1572, соответствующий неидентифицированному липиду, присутствует в обоих спектрах.

ФИГ. 10: Агарозный гель при проверке клонов FA1090 $\Delta lpxI1, \Delta rmp$ при помощи «внешней» ПЦР. Проводили ПЦР с праймерами, внешними по отношению к событию рекомбинации, и продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле. Как лизат

ДНК, так и геномную ДНК (гДНК) штамма дикого типа использовали в качестве положительного контроля реакции ПЦР и для сравнения с мутантными клонами. В качестве отрицательного контроля реакции ПЦР использовали воду. В качестве маркера использовали маркер молекулярных масс 1 kb plus. Стрелки указывают ожидаемые полосы для мутанта с нокаутом (КО) и для штамма дикого типа (WT).

ФИГ. 11: Агарозный гель при проверке клонов FA1090 $\Delta lpxI1, \Delta rmp$ при помощи внутренней ПЦР. Проводили ПЦР с праймерами, специфичными для исходной популяции (клетки, из которых был получен мутант 2КО, в данном случае FA1090 $\Delta lpxL1$), и разделяли продукты ПЦР электрофорезом в 1% агарозном геле. Наличие полосы коррелирует с наличием остаточных исходных клеток в популяции В качестве маркера использовали маркер молекулярных масс 1 kb plus.

ФИГ. 12: Локус *lpxL1*, выделенный из немодифицированного изолята FA1090.

ФИГ. 13: Локус *lpxL1*, выделенный из штамма FA1090 $\Delta lpxI1, \Delta rmp$.

ФИГ. 14: Локус *rmp*, выделенный из немодифицированного изолята FA1090.

ФИГ. 15: Локус *lrmp*, выделенный из штамма FA1090 $\Delta lpxI1, \Delta rmp$.

ФИГ. 16: SDS-PAGE-паттерн OMV, полученных из FA1090 дикого типа, $\Delta lpxI1$ FA1090 (1КО) и $\Delta lpxI1, \Delta rmp$ (2КО) FA1090. Определяли содержание белка в полосах, которые мигрировали с кажущейся молекулярной массой ~28 кДа.

ФИГ. 17: Центральность определяли как среднее расстояние каждого штамма по отношению к другим. Филогенетическое среднее расстояние от каждого штамма до всех остальных («центральность») на основе схемы аллельных вариаций 59 белковых локусов.

ФИГ. 18: Активация TLR4 с помощью OMV из FA1090 WT и мутантного FA1090. Клетки HEK293-NF-kB λ Luc/hTLR4 стимулировали *in vitro* различными концентрациями (по белку) OMV из FA1090 дикого типа (WT) или OMV, полученными из мутанта FA1090 $\Delta lpxI1$ (или 1КО) (#GMMA2) и мутанта FA1090 $\Delta lpxI1, \Delta rmp$ (или 2КО) (#GMMA3). Затем клетки лизировали и количественно определяли опосредованную TLR4 активацию NF-kB, измеряя индукцию люциферазной активности по люминесценции. Активация клеток выражается как кратность индукции по сравнению с клетками, обработанными средой.

ФИГ. 19: Профили роста шести гонококков с двойными мутациями ($\Delta lpxI1, \Delta rmp$) в двух протестированных препаратах сред. Рост отслеживали в течение 16 часов и измеряли по оптической плотности (OD), измеренной при 600 нм.

ФИГ. 20А: Показана объемная продуктивность OMV для шести гонококков 2КО ($\Delta lpxI1, \Delta rmp$) в двух средах для выращивания. Для каждого образца регистрировали флуоресценцию с добавлением и без добавления красителя, а фоновую флуоресценцию

надосадочной жидкости без красителя вычитали из значений образцов, обработанных красителем. Также вычитали контрольный образец только со средой. Показана концентрация OMV в культуральной надосадочной жидкости (в мг/л), которую оценивали путем экстраполяции значений из стандартной кривой. Данные представлены в виде среднего значения двух биологических повторов для каждого штамма и условия культивирования.

Фиг. 20B: Результаты на Фиг. 20A, нормализованные к различной оптической плотности при длине волны 600 нм (OD₆₀₀ нм), достигаемой каждым штаммом в каждом условии, для сравнения удельной продуктивности.

ФИГ. 21: Иммуногенность OMV (называемых здесь GMMA), полученных как из двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$), так и из двойного мутанта F62 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$). 7-недельных самок мышей CD1 иммунизировали внутрибрюшинно два раза с интервалом в 4 недели OMV из FA1090 2КО или F62 2КО, приготовленными на квасцах, или только квасцами. Функциональные антитела против указанных штаммов в сыворотке, собранной через две недели после второй иммунизации, измеряли с помощью hSBA с применением человеческой сыворотки в качестве источника комплемента.

ФИГ. 22A, Фиг. 22B и Фиг. 22C: Результаты ингибирования бактериальной адгезии (BAI) для штаммов FA1090 (Фиг. 22A), SK920679 (Фиг. 22B) и WHO-M (Фиг. 22C) показаны для разведений сыворотки самок мышей CD1 в возрасте семи недель, которых иммунизировали внутрибрюшинно два раза с интервалом в 4 недели с помощью OMV (обозначаемых здесь как GMMA), полученных из двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$, помеченного как «dd» на Фиг.) в двух отдельных экспериментах. OMV готовили на квасцах, и в качестве отрицательного контроля также исследовали контрольный образец, представляющий собой только квасцы. Функциональные антитела измеряли с помощью BAI с указанными штаммами (FA1090 (Фиг. 22A), SK92-679 (Фиг. 22B) и WHO-M (Фиг. 22C)). “dd” = дельта, дельта, то есть FA1090 $\Delta\Delta$ (относится к двойному мутанту $\Delta lpx11, \Delta rmp$).

ФИГ. 23: OMV (называемые здесь GMMA) из FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (2КО) не индуцируют антитела против gmp. Самок мышей CD1 в возрасте семи недель иммунизировали внутрибрюшинно два раза с интервалом в 4 недели OMV из FA1090 $\Delta lpx11$ (одиночный мутант) или FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (двойной мутант), приготовленными на квасцах, и через 2 недели после второй иммунизации измеряли IgG против gmp в объединенных сыворотках с помощью иммуноанализа на основе Lumineх.

ФИГ. 24: титры hSBA против гомологичного штамма FA1090, измеренные в

объединенных сыворотках 4wp2 и 2wp3 от мышей CD1, иммунизированных квасцами, Bexsero или 7 партиями вакцины OMV FA1090 2КО (TRD4-TRD10). Столбцы представляют средний титр в двух независимых экспериментах. Точки представляют отдельные титры.

ФИГ. 25А: Измеряли индивидуальный титр hSBA против указанных штаммов гонококка в индивидуальной сыворотке мышей CD1, иммунизированных квасцами, Bexsero или вакцинами OMV FA1090 2КО партий TRD4, TRD 5 и TRD9. Данные представлены вместе с GMT (95% ДИ).

Фиг. 25В и Фиг. 25С: GMR hSBA с 95% ДИ выявил превосходство титров вакцины OMV FA1090 2КО партий TRD4, TRD 5 и TRD9 по сравнению с квасцами (Фиг. 25В) и Bexsero (Фиг. 25С) по меньшей мере для 9 из 11 исследованных штаммов.

ФИГ. 26: Анти-OMV IgG измеряли с помощью Lumindex в объединенной сыворотке группы мышей, иммунизированных, как указано. Приведены титры IgG для всех 7 партий вакцины OMV FA1090 2КО и Bexsero. Пунктирная линия указывает нижний предел количественного определения, LLOQ=329.

ФИГ. 27А: Анти-OMV IgG измеряли с помощью Lumindex в сыворотке отдельных мышей, иммунизированных, как указано. Приведены индивидуальные титры и среднее геометрическое значение титра (GMT) с 95% ДИ.

ФИГ. 27В: Анти-OMV IgG измеряли с помощью Lumindex в сыворотке отдельных мышей, иммунизированных, как указано. Приведены соотношение средних геометрических значений титров (GMR) с верхним и нижним 95% ДИ для разных партий OMV FA1090 2КО и Bexsero.

ФИГ. 28А: Анти-OMV IgG измеряли с помощью Lumindex в вагинальных смывах отдельных мышей, иммунизированных, как указано. Приведены индивидуальные титры и GMT с 95% ДИ.

ФИГ. 28В: Анти-OMV IgG измеряли с помощью Lumindex в вагинальных смывах отдельных мышей, иммунизированных, как указано. Приведены GMR титров с верхним и нижним 95% ДИ для разных партий вакцины OMV FA1090 2КО и Bexsero или квасцов.

ФИГ. 29А: Анти-OMV IgA измеряли с помощью Lumindex в вагинальных смывах отдельных мышей, иммунизированных, как указано. Приведены индивидуальные титры и GMT с 95% ДИ.

ФИГ. 29В: Анти-OMV IgA измеряли с помощью Lumindex в вагинальных смывах отдельных мышей, иммунизированных, как указано. Приведены GMR титров с верхним и нижним 95% ДИ для разных партий вакцины OMV FA1090 2КО и Bexsero или квасцов.

ФИГ. 30: Глобальная филогения PorB у *N. gonorrhoeae*.

ФИГ. 31: Выравнивание PorB FA1090 2КО и GC_0817560 с идентификацией и изменчивостью внеклеточных петель (1-8).

ФИГ. 32: Доля бактерий, демонстрирующих состояние ON фазовой вариации генетической последовательности oraB в различных штаммах. Указан процент бактерий, которые, по прогнозам, находятся в фазе ON в одном (штаммы FA1090 WT и GC_0817560) или нескольких образцах (FA10902КО и другие штаммы).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Для лучшего понимания различных воплощений данного изобретения приводятся следующие пояснения терминов. Дополнительные термины и пояснения приведены в контексте настоящего изложения.

Если иное не объяснено или не определено в настоящем документе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Например, определения общих терминов молекулярной биологии можно найти в Benjamin Lewin, *Genes V*, опубликовано Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopaedia of Molecular Biology*, опубликовано Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); и Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, опубликовано VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Все ссылки, включая публикации патентов и/или заявок на патенты, цитируемых в этом описании, включены в данное описание путем ссылки.

Используемые в настоящем документе идентификаторы генов, выделенные курсивом, относятся к гену или его мРНК (например, *lpx11* относится к гену *lpx11*). Используемые в настоящем документе идентификаторы генов, не выделенные курсивом, относятся к белку или полипептиду (например, lpx11 относится к белку lpx11). Используемый здесь термин «мРНК и/или полипептид гена *lpx11*» относится к «мРНК гена *lpx11* и/или полипептиду lpx11». Используемый здесь термин «мРНК и/или полипептид гена *rpm*» относится к «мРНК гена *lpx11* и/или полипептиду rpm». Аббревиатура WT соответствует «дикому типу».

Упоминание «липоолигосахарид» (или LOS) может также означать «липополисахарид» (или LPS).

Аминокислоты относятся к аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из

аланина (ala, A), аргинина (arg, R), аспарагина (asn, N), аспарагиновой кислоты (asp, D), цистеина (cys, C), глутамина (gln, Q), глутаминовой кислоты (glu, E), глицина (gly, G), гистидина (his, H), изолейцина (ile, I), лейцина (leu, L), лизина (lys, K), метионина (met, M), фенилаланина (phe, F), пролина (pro, P), серина (ser, S), треонина (thr, T), триптофана (trp, W), тирозина (tyr, Y), валина (val, V).

«**Субъект**», используемый в данном документе, представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, включая людей, не являющихся человеком приматов и не являющихся приматами млекопитающих, таких как представители рода грызунов (включая мышей и крыс, без ограничения), рода *Cavia* (включая морских свинок, без ограничения) и представители отряда зайцеобразных (включая кроликов, без ограничения). В данном документе наиболее предпочтительным субъектом является человек.

Используемый здесь термин «**иммунный ответ**» означает последовательность событий, происходящих на молекулярном, клеточном или тканевом уровне (то есть на любом уровне биологической организации) в ответ на антиген. В контексте настоящего изобретения «иммунный ответ» может представлять собой последовательность клеточных (опосредованных клетками) и/или гуморальных (опосредованных антителами) событий, происходящих в ответ на антиген (например, антигены на поверхности бактерий, вирусов, грибов и так далее) или в ответ на антигены, присутствующие на поверхности OMV, или антигены в виде иммуногенного фрагмента, иммуногенной композиции или вакцины. Используемый здесь термин «**иммуногенность**» означает способность антигена вызывать иммунный ответ.

Используемый здесь термин «**адъювант**» означает соединение или вещество (или комбинацию соединений или веществ), которое при введении субъекту в сочетании с антигеном или антигенами, например, в составе иммуногенной композиции или вакцины, увеличивает или усиливает иммунный ответ субъекта на введенный антиген или антигены (по сравнению с иммунным ответом, полученным в отсутствие адъюванта). Что касается настоящего изобретения, то адъювант, вводимый субъекту в сочетании с везикулами наружной мембраны, увеличивает или усиливает иммунный ответ субъекта на антиген или антигены, присутствующие на поверхности OMV.

Используемый здесь термин «**защищать**» применительно к инфекции, заболеваниям или состояниям, вызванным *Neisseria* (в частности, *N. gonorrhoeae*), означает защиту посредством профилактики. Защита может, например, относиться к снижению числа случаев инфекции, заболевания или состояния, вызванного *Neisseria* (в симптоматических и бессимптомных состояниях), что обеспечивает контроль над

заболеванием и/или контроль за сопутствующими неблагоприятными последствиями для репродуктивного здоровья, вызванных *Neisseria*. Защита может приводить к сокращению числа посещений клиники. Термин «защищать» (или «защита») может использоваться здесь в отношении защиты от первичной инфекции *Neisseria* с точки зрения профилактики острых заболеваний (цервицита и уретрита), уменьшения влияния антимикробной резистентности, инфицирования ВИЧ, связанного с гонококком, и долгосрочных репродуктивных осложнений, возникающих вследствие указанной инфекции. Защита от вызывающих заболевания гонококковых инфекций может быть достигнута в различных анатомических областях (урогенитальной, аноректальной, ротоглоточной). Используемый здесь термин «предупредить» (или предупреждение) означает, что в результате усиленной защиты заболевания или состояния, вызванные *N. gonorrhoeae*, в значительной степени предотвращаются, что приводит к улучшению показателей здоровья населения.

Используемый в настоящем документе термин «лечить» (или лечение) применительно к инфекции, заболеваниям или состояниям, вызванным *Neisseria* (в частности, *N. gonorrhoeae*), означает лечение любого симптома, эффекта или фенотипа путем введения после инфицирования, вызванного *N. gonorrhoea*. Лечение может означать уменьшение тяжести или частоты симптомов состояния или заболевания у субъекта, замедление или прекращение прогрессирования состояния и/или полное или частичное устранение симптомов заболевания или состояния у субъекта. Лечение инфекции, заболевания или состояния, вызванного *N. gonorrhoea*, включает улучшение, стабилизацию, уменьшение или устранение симптомов, эффектов или фенотипов, вызванных *N. gonorrhoea* у людей. Лечение инфекции, заболевания или состояния, вызванного *N. gonorrhoea*, также может включать элиминацию или уничтожение бактерий.

Используемый в настоящем документе термин «генетическая(ие) модификация(и)» означает любое изменение состава, структуры или действия генетического материала в клетке для обеспечения определенного эффекта (например, снижение или прекращение экспрессии). Квалифицированному специалисту известны многочисленные способы снижения или прекращения экспрессии гена и/или белка по сравнению с экспрессией в немодифицированной (например, встречающейся в природе бактерии) или бактерии, содержащей интересующий ген дикого типа. Генетический материал внутри клетки относится либо к ДНК, либо к РНК. Таким образом, термин «генетическая модификация», используемый здесь, означает любое искусственное изменение состава, структуры или действия либо ДНК, либо РНК гонококка, такое как снижение и/или прекращение экспрессии и/или функции определенных генов. Используемый здесь термин «генетически модифицированный» в отношении гонококковой

бактерии относится к гонококку, генетический материал которого был искусственным образом изменен. Генетически модифицированные гонококковые бактерии не включают гонококковых бактерий дикого типа. Генетически модифицированная гонококковая бактерия включает, например, гонококковую бактерию, в которую введен экзогенный полинуклеотид. Генетически модифицированная гонококковая бактерия также относится к бактерии, которая подверглась генетическим манипуляциям таким образом, что эндогенные нуклеотиды были изменены, чтобы включить мутацию, такую как делеция, вставка, замена или их комбинация. Например, эндогенная кодирующая и/или некодирующая область может быть удалена или заменена. Такие генетические модификации могут привести либо к истощению и/или прекращению экспрессии полипептида, и/или могут привести к полипептиду, имеющему другую аминокислотную последовательность, нежели та, которая кодировалась эндогенным полинуклеотидом. Другим примером генетически модифицированной гонококковой бактерии является бактерия, имеющая измененную регуляторную последовательность, такую как промотор, что приводит к повышенной или пониженной экспрессии функционально связанной эндогенной кодирующей области.

Используемый здесь термин «**делеция гена**» или «**нокаут гена**» относится к комбинации генетических методов, которые потенциально могут сделать конкретный ген неработоспособным или неактивным. В некоторых воплощениях делеция гена снижает или прекращает экспрессию полипептида с гена. В некоторых воплощениях происходит снижение или устранение как мРНК, так и белка. В некоторых воплощениях экспрессия гена существенно снижается или прекращается. Существенное снижение означает, что экспрессия гена снижена по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% по сравнению с эндогенным уровнем экспрессии гена. В определенном воплощении экспрессия гена прекращается. Прекращение означает, что при использовании методов мониторинга экспрессии либо мРНК, транскрибируемой с гена, либо экспрессии белка, транслируемого с конкретной мРНК, уровень не определяется. Экспрессию гена можно определять с помощью подходящего метода (например, путем измерения уровней транскриптов с помощью RT/Q-PCR или уровней экспрессированного белка с помощью иммунологического анализа, например, Вестерн-блоттинга). Такие методики известны специалистам в данной области техники. Делеция гена или нокаут гена может включать не только делецию генетических элементов, но и добавление, замену или модификацию, так что ген становится неработоспособным или неактивным, то есть вставка генетической последовательности может вызвать неправильную трансляцию гена, например, за счет

появления преждевременного стоп-кодона или миссенс-трансляции. Гены могут быть подвергнуты делеции, например, путем замены гена или фрагмента указанного гена другим гетерологичным геном (например, геном устойчивости к антибиотику), например, путем гомологичной рекомбинации.

Используемый здесь символ « Δ » используется для обозначения бактериального штамма, в котором была осуществлена делеция/нокаут последовательности гена, указанная после символа Δ , в соответствии с определением «делеция гена» или «нокаут гена».

Используемый в данном документе термин «**везикула (везикулы) наружной мембраны**» или «OMV» относится к протеолипосомным везикулам, полученным путем разрушения или блеббинга наружной мембраны грамотрицательных бактерий с образованием из нее везикул, которые сохраняют антигены из наружной мембраны. Грамотрицательные бактерии естественным образом выделяют OMV, которые высвобождаются в питательную среду. Гетерологичные антигены экспрессируются в грамотрицательных бактериях таким образом, что они собираются в мембране, затем высвобождаются в культуральную надосадочную жидкость. OMV таких бактерий являются репрезентативными для наружной мембраны и периплазматических бактериальных компартментов и позволяют представить мембранные белки в их естественном составе и структуре. В самом широком смысле OMV относятся к любым таким протеолипосомным везикулам. Однако термин OMV включает «нативные OMV» (nOMV), микровезикулы (MV), OMV, экстрагированные детергентом (DOMV), и пузырьки, которые представляют собой протрузии наружной мембраны, которые остаются прикрепленными к бактериям до высвобождения в виде MV. Все они составляют часть изобретения и вместе именуется здесь OMV, если явным образом не указано иное. В предпочтительном воплощении изобретения OMV представляют собой nOMV. Используемый в настоящем документе термин «везикулы наружной мембраны», или OMV может также обозначаться как GMMA.

Используемый здесь термин «**изогенный**» относится к двум отдельным организмам, имеющим по существу идентичные геномы. В воплощении изогенный означает два индивидуальных организма, имеющих идентичные геномы. В контексте настоящего описания два организма могут быть изогенными, за исключением конкретной указанной генетической модификации.

Используемый здесь термин «**гетерологичная последовательность гена**» относится к нуклеотидной последовательности (например, последовательности гена или части последовательности гена), которая не встречается в природе применительно к референсному организму. В контексте настоящего изобретения последовательность

гетерологичного гена относится к последовательности, которая в природе не присутствует в геноме гонококкового штамма FA1090.

Используемый здесь термин **«геномная рекомбинация»** относится к процессу обмена генетической информацией между двумя полинуклеотидами. В целях делеции/нокаута гена гомологичная рекомбинация включает создание конструкции ДНК, содержащей маркер устойчивости к антибиотику вместо гена, нокаут которого необходим. Конструкция также содержит последовательность гена, гомологичную целевой последовательности. Этот подход основан на механизмах клеточной репарации для рекомбинации ДНК-конструкции в существующую ДНК. Это приводит к изменению последовательности эндогенного гена.

Используемый здесь термин **«иммуногенная композиция»** относится к смеси химически связанных веществ, подходящей для введения человеку или животному (например, в экспериментальных или клинических условиях), которая способна вызывать специфический иммунный ответ, например, против патогена, такого как *Neisseria*. Как таковая, иммуногенная композиция включает один или более антигенов (например, полипептидных антигенов) или антигенных эпитопов. Иммуногенная композиция может также включать один или более дополнительных компонентов, способных вызывать или усиливать иммунный ответ, таких как адъювант, носитель и/или адъювант. В некоторых случаях иммуногенные композиции вводят для индукции иммунного ответа, который полностью или частично защищает субъекта от симптомов или состояний, индуцированных патогеном. В контексте настоящего описания термин «иммуногенная композиция» следует понимать как охватывающий композиции, которые предназначены для введения субъекту или популяции субъектов с целью вызвать защитный иммунный ответ против *Neisseria* перед заражением или паллиативный иммунный ответ против *Neisseria* после заражения.

Под **«иммунологически эффективным количеством»** подразумевается, что введение этого количества индивидууму либо в виде однократной дозы, либо в составе серии является эффективным для лечения, защиты или профилактики. Введение иммунологически эффективного количества вызывает иммунный ответ, включая защитный иммунный ответ. Это количество может варьироваться в зависимости от здоровья и физического состояния индивидуума, подлежащего лечению, возраста, таксономической группы индивидуума, подлежащего лечению (например, не являющийся человеком примат, примат и так далее), способности иммунной системы индивидуума синтезировать антитела, желаемой степени защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других соответствующих факторов. Предполагается, что количество будет находиться в относительно широком диапазоне.

Используемый здесь термин «**фармацевтически приемлемый**» означает, что объект подходит для введения субъекту (например, человеку или животному). В Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition 25 (1975) описаны композиции и составы (включая разбавители), подходящие для фармацевтической доставки терапевтических и/или профилактических композиций, включая иммуногенные композиции.

В данном описании термин «**антитело**» используется в самом широком смысле для обозначения молекул с иммуноглобулиноподобным доменом (например, IgG, IgM, IgA, IgD или IgE) и включает моноклональные, рекомбинантные, поликлональные, химерные, человеческие, гуманизированные, мультиспецифические антитела, включая биспецифические антитела и гетероконъюгированные антитела; один переменный домен (например, VH, VHH, VL, доменные антитела (dAbTM)), антигенсвязывающие фрагменты антитела, Fab, F(ab')₂, Fv, дисульфид-связанный Fv, одноцепочечный Fv, дисульфид-связанный scFv, диатела, TANDABSTM и так далее, а также модифицированные версии любого из вышеперечисленных (обзор альтернативных форматов «антитела» представлен [Holliger P, Hudson P.J. *Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol.* 2005;23(9):1126-36]). Альтернативные форматы антител включают альтернативные каркасы, в которых одна или более CDR антигенсвязывающего белка могут быть размещены на подходящем каркасе или скелете неиммуноглобулинового белка, таком как аффитело, каркас SpA, домен класса A рецептора ЛПНП, авимер или домен EGF.

«**Идентичность последовательности**» может быть определена с помощью алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана, реализованного в программе MPSRCH (Oxford Molecular), где при поиске используются аффинные штрафы с параметрами: штраф за введение гэпа = 12 и штраф за продолжение гэпа = 1, но предпочтительно определяется с помощью алгоритма глобального выравнивания Needleman-Wunsch (см., например, Rubin (2000) *Pediatric. Clin. North Am.* 47:269-285), с применением параметров по умолчанию (например, со штрафом за открытие гэпа = 10,0 и со штрафом за удлинение гэпа = 0,5, с применением матрицы замен EBLOSUM62). Этот алгоритм удобно реализован в утилите needle пакета EMBOSS. Когда в заявке упоминается идентичность последовательности с конкретной SEQ ID, предполагается, что идентичность рассчитывают по всей длине указанной SEQ ID.

Гонококк

В первом аспекте данного изобретения предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и),

которая(ые):

а) снижает или прекращает экспрессию и/или функцию гена, мРНК и/или полипептида лауроилацилтрансферазы биосинтеза липида А (*lpx11*); и

б) снижает или прекращает экспрессию и/или функцию гена, мРНК и/или полипептида модифицируемого восстановлением белка (*rmp*).

В одном воплощении исходный организм, в который затем вводят генетическую(ие) модификацию(и), представляет собой по существу или полностью немодифицированную гонококковую бактерию штамма FA1090. Таким образом, в данном изобретении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и

б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*, где немодифицированная гонококковая бактерия представляет собой гонококковую бактерию штамма FA1090.

В одном воплощении исходный организм, в который затем вводят генетическую(ие) модификацию(и) по изобретению, представляет собой гонококковую бактерию штамма FA1090, которая не содержит генетическую(ие) модификацию(и) ее генов *lpx11* и/или *rmp*. Таким образом, в данном изобретении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и

б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*, где немодифицированная гонококковая бактерия представляет собой гонококковую бактерию штамма FA1090, содержащую гены *lpx11* и/или *rmp* дикого типа.

В одном воплощении предложен штамм *Neisseria gonorrhoeae* FA1090, содержащий модификации, которые, по меньшей мере: снижают общую активность лауроилацилтрансферазы биосинтеза липида А (*Lpx11*) и снижают функциональный модифицируемый восстановлением белок (*Rmp*) по сравнению с функциональным *Lpx11* и функциональным *Rmp* в *N. gonorrhoeae* штамма FA1090 без указанных модификаций.

Гонококковые бактерии штамма FA1090 известны в данной области техники. Штамм FA1090 (штамм серотипа P1B-3 по белку порину) *N. gonorrhoeae* первоначально был выделен из эндоцервикса пациентки с вероятной диссеминированной гонококковой

инфекцией [*Nachamkin I, Cannon JG, Mittler RS. Infect Immun. 1981 May; 32(2):641-8*]. Гонококк FA1090 доступен для приобретения из Американской коллекции типовых культур (ATCC, см., например, депонирование № 700825, 1081 University Blvd, Manassas, Virginia 20110, US), а последовательность генома FA1090 находится в открытом доступе в GenBank (идентификационный номер: AE004969.1).

Хотя в данной области техники очевидно, что штаммы FA1090 могут незначительно различаться (например, в разных лабораториях) из-за естественной изменчивости, специалисту в данной области известны способы определения того, относится ли данный гонококк к штамму FA1090. Например, специалисту в данной области известны способы секвенирования генома гонококка (например, с использованием способа, описанного в Примере 9) и выравнивания генома с геномом известного штамма FA1090, например, геном FA1090, приведенного в GenBank под идентификационным номером AE004969.1. Указанное выравнивание предоставит специалисту уровень идентичности последовательности по сравнению с геномом, приведенным в GenBank под идентификационным номером AE004969.1. Если указанный уровень идентичности последовательностей выше 95%, выше 97% или выше 99%, специалист в данной области может сделать вывод, что указанный гонококк представляет собой гонококк штамма FA1090.

В одном воплощении гонококк FA1090, в который вводят генетическую(ые) модификацию(и), представляет собой гонококк, идентичный по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% геному гонококка, приведенному в GenBank под идентификационным номером AE004969.1 (от 1 июля 2015). В одном воплощении гонококк FA1090, в который вводят генетическую(ые) модификацию(и), представляет собой гонококк, идентичный на 99,97% геному гонококка, приведенному в GenBank под идентификационным номером AE004969.1 (от 1 июля 2015) при подсчете с применением алгоритма OrthoANI, как описано [*Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(2):1100-1103*]. В одном воплощении немодифицированная гонококковая бактерия представляет собой гонококковую бактерию штамма FA1090, которая идентична по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по

меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% геному гонококка FA1090, приведенному в GenBank под идентификационным номером AE004969.1 (от 1 июля 2015). В одном воплощении немодифицированная гонококковая бактерия представляет собой гонококковую бактерию штамма FA1090, которая на 99,97% идентична геному гонококка FA1090, приведенному в GenBank под идентификационным номером AE004969.1 (от 1 июля 2015) при подсчете с применением алгоритма OrthoANI, как описано [Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. *OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(2):1100-1103.*].

В одном воплощении гонококк FA1090, в который введена генетическая(ые) модификация(и) (то есть немодифицированная гонококковая бактерия), представляет собой гонококк штамма FA1090, содержащий последовательности, идентичные по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 97% с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3. В указанном воплощении гонококк FA1090, содержащий последовательности, идентичные по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 97% с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3, сохраняет функциональные белки Lpx11 и Rmp. В одном воплощении гонококк FA1090, в который введена генетическая(ые) модификация(и) (то есть немодифицированная гонококковая бактерия), представляет собой гонококк штамма FA1090, содержащий SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3.

В одном воплощении изобретения дополнительно предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые)(ые):

а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11* и

б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*, где сниженную или прекращенную экспрессию и/или функцию сравнивают с гонококковой бактерией штамма FA1090, содержащей гены *lpx11* и *rmp* дикого типа.

В одном воплощении гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая *lpx11* и *rmp* дикого типа, представляет собой немодифицированный гонококк штамма FA1090. Примером такого штамма может быть штамм гонококка FA1090, который можно приобрести в ATCC (#700825).

В одном воплощении ген *lpx11* содержит последовательность, по меньшей мере на

80% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и ген *rmp* содержит последовательность по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1.

В одном воплощении ген *lpx11* содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Ген *lpx11* (также обозначаемый *msbB*) кодирует полипептид биосинтезалипида А лауроилацилтрансферазу (Lpx11). Lpx11 играет роль в биосинтезе липида А. Организмы нейссерий, генетически модифицированные для обеспечения сниженного уровня или не обнаруживаемого функционального белка, кодируемого *lpx11*, продуцируют OMV с пониженной эндотоксичностью. Это связано с тем, что степень ацилирования липида А и характер ацилирования являются основными факторами, влияющими на токсичность LOS [Makda Fisseha et al. *Infection and Immunity* Jun 2005, 73 (7) 4070-4080]. Lpx11 (полипептид) может также обозначаться ферментом Lpx11.

В одном воплощении ген *rmp* содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1. Ген *rmp* кодирует полипептид модифицируемого восстановлением белка (Rmp).

В одном воплощении ген *lpx11* содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и ген *rmp* содержит последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1. В одном воплощении ген *lpx11* содержит SEQ ID NO 3, и ген *rmp* содержит SEQ ID NO: 1.

В одном воплощении изобретения генетически модифицированная гонококковая бактерия по изобретению содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- a) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и
- b) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *rmp*.

В одном воплощении изобретения генетически модифицированная гонококковая бактерия по изобретению содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- a) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию полипептида Lpx11; и
- b) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию полипептида Rmp.

В одном воплощении изобретения генетически модифицированная гонококковая бактерия по изобретению содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- a) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Lpx11; и
- b) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Rmp.

В одном воплощении изобретения генетически модифицированная гонококковая бактерия по изобретению содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- a) прекращает(ют) экспрессию полипептида Lpx11; и
- b) прекращает(ют) экспрессию полипептида Rmp.

В одном воплощении полипептид Lpx11 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 4, и полипептид Rmp содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 2.

В одном воплощении полипептид Lpx11 содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4. В одном воплощении полипептид Rmp содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2.

В одном воплощении полипептид Lpx11 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 4, и полипептид Rmp содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении полипептид Lpx11 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и полипептид Rmp содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению экспрессирует менее 10%, менее 5% или менее 1% полипептида Lpx11 по сравнению с экспрессией полипептида Lpx11 в немодифицированном (например, дикого типа) гонококковом штамме FA1090 и менее 10%, менее 5% или менее 1% полипептида Rmp по сравнению с экспрессией полипептида Rmp в немодифицированном (например, дикого типа) гонококковом штамме FA1090. В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению экспрессирует менее 10%, менее 5% или менее 1% полипептида Lpx11 по сравнению с экспрессией полипептида Lpx11 в гонококковом штамме FA1090, содержащем ген *lpx11* дикого типа, и менее 10%, менее 5% или менее 1% полипептида Rmp по сравнению с экспрессией полипептида Rmp в гонококковом штамме FA1090, содержащем ген *rmp* дикого типа.

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению экспрессирует минимальный уровень полипептида Lpx11 по сравнению с уровнем полипептида Lpx11 в немодифицированном (дикого типа) гонококковом штамме FA1090 и минимальный уровень полипептида Rmp по сравнению с уровнем полипептида Rmp в немодифицированном (дикого типа) гонококковом штамме FA1090.

В одном воплощении изобретения гонококковая бактерия по изобретению не экспрессирует полипептид Lpx11 или полипептид Rmp. В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению не экспрессирует полипептид Lpx11 и/или полипептид Rmp на детектируемом уровне при измерении, например, при помощи иммуноанализа. В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению не экспрессирует полипептид Lpx11 и/или полипептид Rmp на детектируемом уровне при измерении, например, при помощи вестерн-блоттинга или ИФА.

В контексте настоящего описания «Сниженная экспрессия» означает, что гонококковая бактерия по изобретению экспрессирует меньше мРНК *lpx11* и *rmp* и/или белка Lpx11 и Rmp по сравнению с немодифицированным (дикого типа) гонококковым штаммом FA1090 или гонококковым штаммом FA1090, содержащим гены *lpx11* / *rmp* дикого типа. Экспрессию можно считать сниженной, если наблюдается любое снижение экспрессии мРНК и/или белка по сравнению с немодифицированным (дикого типа) гонококковым штаммом FA1090 или гонококковым штаммом FA1090, содержащим гены *lpx11* / *rmp* дикого типа. Экспрессию можно считать сниженной, если наблюдается снижение экспрессии мРНК и/или белка более чем на 5%, более чем на 10%, более чем на 25%, более чем на 50%, более чем на 60%, более чем на 70%, более чем на 80%, более чем на 90% или более чем на 95% по сравнению с немодифицированным (дикого типа)

гонококковым штаммом FA1090 или гонококковым штаммом FA1090, содержащим гены *lpx11* / *rmp* дикого типа. В контексте настоящего описания «прекращенная экспрессия» означает, что мРНК и/или белок *Lpx11* и мРНК и/или белок *Rmp* не обнаруживаются в гонококковой бактерии по изобретению при помощи методики, используемой специалистом в данной области техники для измерения экспрессии.

Уровень экспрессии генов *lpx11* и *rmp* может быть измерен с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например, с использованием методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) (например, с использованием Q/RT-PCR). Уровень экспрессии полипептидов *Lpx11* и *Rmp* может быть измерен с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, уровень экспрессии полипептидов *Lpx11* и *Rmp* может быть измерен с использованием вестерн-блоттинга или ИФА. Уровень экспрессии полипептида *Rmp* может быть измерен с использованием электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC/MS-MS) с применением методики, по существу описанной в Примере 11.

Генетическая(ые) модификация(и) может(гут) уменьшать или прекращать экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*. Таким образом, указанная(ые) генетическая(ые) модификация(и) может(гут) привести к сохранению экспрессии полипептида *Lpx11*, но при этом полипептид является нефункциональным. Функцию *Lpx11* можно определить, например, путем изучения степени пентаацилирования компонента липида А липоолигосахарида везикул наружной мембраны (например, с применением способа, описанного в Примере 6), по сравнению с гексаацилированием. Если генетически модифицированная гонококковая бактерия содержит генетическую модификацию, которая снижает или прекращает функцию белка *Lpx11*, липид А будет пентаацилирован (например, он будет по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% пентаацилирован), несмотря на данные, свидетельствующие о наличии мРНК *lpx11* и/или белка.

В одном воплощении снижение или прекращение экспрессии и/или функции полипептида *Lpx11* приводит к гонококку штамма FA1090, характеризующемуся соотношением пентаацилированного липида А к гексаацилированному липиду А от 50:50

до 99:1 (где процент пентаацилированного липида А по сравнению с общим липидом А составляет от 50% до 100%).

В одном воплощении снижение или прекращение экспрессии и/или функции полипептида *Lpx11* приводит к пентаацилированному липиду А, возможно, где ацилирование липида А определяют при помощи времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией / ионизацией (MALDI-TOF). В одном воплощении генетически модифицированная гонококковая бактерия по изобретению содержит липоолигосахарид (LOS) с пентаацилированным липидом А. Ацилирование липида А можно определить, например, путем экстракции липида А с последующим анализом с помощью MADI-TOF-спектрометрии, например, по существу как описано в Примере 6. В частности, снижение или прекращение экспрессии и/или функции полипептида *Lpx11* приводит к липоолигосахариду (LOS), содержащему липид А, лишенный лауриновой кислоты, которую добавил бы *LpxL1*, если бы он экспрессировался функциональным. Снижение или прекращение экспрессии и/или функции полипептида *Lpx11* приводит к тому, что LOS содержит липид А, лишенный вторичной лауроильной цепи на невозстанавливаемом конце дисахарида GlcN липида А. Результатом является снижение или прекращение экспрессии и/или функции полипептида *Lpx11* в LOS, содержащем липид А, в котором отсутствует ацилоксиацильная цепь C12 (на невозстанавливаемом конце). Снижение или прекращение экспрессии и/или функции полипептида *Lpx11* приводит к тому, что LOS содержит липид А, лишенный лауриновой кислоты во вторичном 2'-О-положении дистального невозстанавливающего концевое глюкозамина димера β -(1--> 6)D- глюкозамина (следовательно, одиночная 3-гидроксимиристиловая группировка существует в амидной связи на дистальном глюкозамине липида А).

В одном воплощении снижение или прекращение экспрессии и/или функции полипептида *lpx11* приводит к пентаацилированию липида А более чем на 50%, например, более чем на 60%, более чем на 70%, более чем на 80%, более чем на 90%, более чем на 95% или более чем на 99%. В воплощении снижение или прекращение экспрессии и/или функции полипептида *Lpx11* приводит к 100% пентаацилированию липида А. В воплощении генетически модифицированная гонококковая бактерия по изобретению имеет сниженную способность активировать Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) по сравнению с гонококком штамма FA1090, содержащим ген *lpx11* дикого типа.

Аналогичным образом, генетическая(ие) модификация(и) может(гут) уменьшать или прекращать экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*. Таким

образом, указанная(ые) генетическая(ие) модификация(и) может(гут) привести к сохранению экспрессии полипептида Rmp, но при этом полипептид является нефункциональным. Функцию Rmp можно определить, например, путем изучения степени блеббинга гонококка. Если генетически модифицированная гонококковая бактерия содержит генетическую модификацию, которая снижает или прекращает функцию белка Rmp, гонококк может характеризоваться «гиперблеббингом» по сравнению с гонококковой бактерией, которая содержит ген *rmp* дикого типа, несмотря на данные, свидетельствующие о наличии мРНК *rmp* и /или белка Rmp. Соответственно, в некоторых воплощениях генетически модифицированный FA1090 может быть протестирован на предмет того, продуцирует ли он больше OMV (например, является ли он штаммом с гиперблеббингом) по сравнению с теми же показателями гонококковой бактерии, которая содержит ген *rmp* дикого типа, то есть путем сравнения выхода OMV, полученного из одного штамма, с выходом OMV из другого (с использованием того же протокола блеббинга OMV). Такие способы изложены, например, в [Maharjan et al. (2016). Dissection of the function of the RmpM periplasmic protein from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, 162(), 364-375]. Пример такого эксперимента можно найти в Примере 18.

В одном воплощении генетически модифицированный гонококк FA1090 по данному изобретению (двойной мутант FA1090 $\Delta Lpx11$, Δrmp) демонстрирует повышенную продуктивность OMV (с точки зрения повышения продуктивности OMV по сравнению с одинарным мутантом $\Delta Lpx11$) по сравнению со штаммами сравнения, например, GC_0817560.

В одном воплощении сниженная или прекращенная экспрессия и/или функция полипептида Rmp приводит к гонококку, который характеризуется гиперблеббингом по сравнению с блеббингом гонококкового штамма FA1090, содержащего ген *rmp* дикого типа. Таким образом, гонококковые бактерии по данному изобретению характеризуются гиперблеббингом по сравнению с их соответствующими штаммами дикого типа (или штаммами, содержащими ген *rmp* дикого типа), то есть они выделяют в свою культуральную среду большее количество пузырьков, чем штаммы дикого типа или штаммы, содержащие ген *rmp* дикого типа. В одном воплощении сниженная или прекращенная экспрессия и/или функция полипептида Rmp приводит к тому, что гонококк образует на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% больше OMV по сравнению с гонококковым штаммом FA1090, содержащим ген *rmp* дикого типа. В одном воплощении сниженная или прекращенная экспрессия и/или функция полипептида Rmp приводит к тому, что гонококк образует от 80% до 120% больше OMV по сравнению с гонококковым

штаммом FA1090, содержащим ген *rmp* дикого типа. В одном воплощении гонококковый штамм FA1090, содержащий ген *rmp* дикого типа, содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 100% идентична SEQ ID NO: 1.

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению содержит генетическую(ие) модификацию(и), где генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой или содержит(ат);

- a) разрушение или делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*; или
- b) подавление экспрессии полипептида *lpx11* и *rmp* в штамме, содержащем гены *lpx11* и *rmp* дикого типа.

В одном воплощении генетически модифицированную гонококковую бактерию по изобретению получают либо а) разрушением или делецией эндогенных генов *lpx11* и *rmp*; либо б) подавлением экспрессии полипептидов *Lpx11* и *Rmp* в штамме, содержащем гены *lpx11* и *rmp* дикого типа.

В одном воплощении генетическая(ые) модификация(и) (то есть уменьшающая или прекращающая экспрессию и/или функцию *lpx11* и *rmp*) достигается путем подавления экспрессии полипептида *Lpx11* и *Rmp* в штамме, содержащем гены *lpx11* и *rmp* дикого типа. В указанном воплощении гонококковый штамм FA1090 содержит последовательности генов *lpx11* и *rmp* дикого типа (то есть немодифицированные), и указанная(ые) генетическая(ие) модификация(и), внесенная(ые) в бактерию, приводит к снижению или прекращению экспрессии белков *Lpx11* и *Rmp*. Методы подавления экспрессии белков *Lpx11* и *Rmp* в штамме, содержащем гены *lpx11* и *rmp* дикого типа, включают, например, антисмысловое ингибирование и ингибиторную РНК (то есть малую интерферирующую РНК [siRNA], микроРНК [miRNA], короткую шпилечную РНК [shRNA] и так далее), хотя эти методы чаще используются у эукариотических хозяев. В полученной бактерии мРНК, кодирующая супрессированный белок, будет по существу отсутствовать и/или ее трансляция будет существенно подавлена (например, до менее чем 90%, менее чем 80%, менее чем 70%, менее чем 60%, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 25 %, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5% или менее чем 1% от уровня экспрессии, который наблюдался бы в отсутствие подавления). Указанное подавление экспрессии белков *Lpx11* и *Rmp* в штамме, содержащем гены *lpx11* и *rmp* дикого типа, измеряют по сравнению со штаммом, который не был модифицирован таким образом, что экспрессия белков *Lpx11* и *Rmp* была подавлена.

Однако эндогенные гены *lpx11* и *rmp* предпочтительно разрушать или удалять. Таким образом, в воплощении генетическая модификация(и) состоит из или включает разрушение

и/или делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*.

Когда генетические модификации включают разрушение эндогенного гена *lpx11* и *rmp*, это может привести к снижению или прекращению экспрессии белка Lpx11 и/или Rmp, например, если указанное разрушение относится к промоторной области. Однако, разрушение эндогенного гена *lpx11* и/или *rmp* может привести к экспрессии мутантных белков Lpx11 и/или Rmp, например белков Lpx11 и/или Rmp с другой аминокислотной последовательностью, нежели у белков Lpx11 и/или Rmp дикого типа. В одном воплощении разрушение эндогенного *lpx11* и/или *rmp* приводит к экспрессии нефункциональных полипептидов Lpx11 и/или Rmp.

В одном воплощении разрушение эндогенного гена *lpx11* и/или *rmp* включает добавление, делецию или замену последовательности эндогенного гена *lpx11* и/или *rmp*. «Добавление» относится к вставке одного или нескольких не являющихся нативными нуклеотидов в последовательность гена. Добавления могут быть сделаны в кодирующие или не кодирующие области, включая расположенные в направлении против хода транскрипции промоторные области, и могут быть сделаны к концевым и/или неконцевым остаткам. В некоторых воплощениях добавление осуществляется в промоторную область, так что транскрипция кодирующей области не происходит или снижается, или добавление происходит в кодирующую область, так что появляется сдвиг кодона или преждевременный стоп-кодон. «Замена» относится к замене одного нуклеотидного основания на другое. Замены имеют возможность изменить кодон на тот, который кодирует другую аминокислоту, что приводит к незначительным (но функциональным) изменениям в продуцируемом белке. В качестве альтернативы, замены могут изменять кодон, кодирующий аминокислоту, на «стоп-кодон», что приводит к неполному (нефункциональному) белку. «Делеция» в контексте разрушения эндогенных генов относится к удалению одного или более нуклеотидов из полинуклеотидной последовательности гена. В некоторых воплощениях делеция включает делецию промоторной области (или ее части), так что транскрипция кодирующей области не происходит или снижается, или делеция находится внутри кодирующей области, так что появляется сдвиг кодона или преждевременный стоп-кодон.

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению содержит генетическую(ие) модификацию(и), включающую(ие) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*. В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению содержит генетическую(ие) модификацию(и), включающую(ие) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*, приводящую к двойному мутантному гонококку FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$). В одном

воплощении генетически модифицированная гонококковая бактерия по изобретению представляет собой двойной мутантный гонококк FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$).

Таким образом, в данном изобретении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

а. снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и

б. снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*,

где генетическая(ие) модификация(и) содержит(ат) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*, приводящую к двойному мутантному гонококку FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$).

В одном воплощении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *lpx11* и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *rmp*, при этом генетическая(ие) модификация(и) включает(ют) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*, приводящую к двойному мутантному гонококку FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$).

В одном воплощении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) снижает или прекращает экспрессию полипептида *Lpx11* и снижает или прекращает экспрессию полипептида *rmp*, при этом генетическая(ие) модификация(и) включает(ют) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*, приводящую к двойному мутантному гонококку FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$).

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению содержит генетическую(ие) модификацию(и), представляющую(ие) собой делеции гена.

В одном воплощении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию гена *lpx11*, мРНК и/или полипептида *Lpx11* и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию гена *rmp*, мРНК и/или полипептида *Rmp*, при этом генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой делеции генов. В одном воплощении делеция гена является результатом добавления, замены последовательности или модификации в виде делеции в локусах *lpx11* и *rmp*. Делеция гена может быть результатом указанной модификации (модификаций) или может быть достигнута указанной модификацией (модификациями).

В одном воплощении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию гена *lpx11*, мРНК и/или полипептида Lpx11 и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию гена *rmp*, мРНК и/или полипептида Rmp, при этом генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой делеции генов, при этом делеция гена является результатом замены части (или частей) генов *lpx11* и *rmp* гетерологичными последовательностями, необязательно где указанные гетерологичные последовательности кодируют гены устойчивости к антибиотикам. В другом воплощении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию гена *lpx11*, мРНК и/или полипептида Lpx11 и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию гена *rmp*, мРНК и/или полипептида Rmp, где генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой делеции генов, при этом делеция гена является результатом добавления последовательностей гетерологичных генов в кодирующие области *lpx11* и *rmp*, возможно где указанные гетерологичные последовательности кодируют гены устойчивости к антибиотикам.

В одном воплощении предложена генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Lpx11 и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида rmp, при этом генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой делеции генов, приводящие к двойному мутантному гонококку FA1090 ($\Delta lpx11$, Δrmp).

Любая подходящая методика может быть использована для делеции эндогенных генов *lpx11* и *rmp* (то есть для нокаута гена). Нокауты генов в гонококках можно, например, осуществлять путем мутагенеза транспозонов, генной инженерии *in vitro* для модификации генов, содержащихся в плаزمиде или бактериальных искусственных хромосомах (BAC), и переноса модифицированной конструкции в интересующий организм, а также путем гомологичной рекомбинации *in vivo*. В одном воплощении гены нокаутированы путем отключения эндогенного промотора, оперона или регуляторного элемента, который необходим для транскрипции или трансляции генов. В другом воплощении гены удалены с использованием технологии CRISPR-Cas9.

В одном воплощении делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp* осуществляют посредством гомологичной рекомбинации. Гомологическую рекомбинацию можно осуществить, например, как описано в WO01/09350A2, или с использованием методов,

описанных в [Dillard J. P. (2011). *Genetic Manipulation of Neisseria gonorrhoeae. Current protocols in microbiology, Chapter 4, Unit4A.2*]. В процессе гомологичной рекомбинации делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp* осуществляют либо путем добавления другого гена в кодирующую последовательность генов *lpx11* и *rmp*, либо путем замены гена или его фрагмента другим геном (например, гетерологичным геном, или нефункциональным геном) путем рекомбинации. В одном воплощении гетерологичный ген представляет собой ген устойчивости к антибиотику.

В одном воплощении генетическая(ие) модификация(и) может(гут) затрагивать кодирующие и/или не кодирующие области. Кодирующая область - это часть последовательности ДНК гена, которая кодирует белок. Не кодирующая область (например, интронная ДНК) представляет собой компоненты ДНК организма (то есть *N. gonorrhoea*), не кодирующие белковые последовательности. В одном воплощении генетическая(ие) модификация относится к кодирующей области, не кодирующей области или их комбинации гена *lpx11* и к кодирующей области, не кодирующей области или их комбинации гена *rmp*. Идентификация кодирующих и не кодирующих областей в заданной последовательности ДНК находится в компетенции специалиста.

В одном воплощении изобретения генетически модифицированная гонококковая бактерия по изобретению является изогенной с гонококковым штаммом FA1090, за исключением генетической(их) модификации(й), которая(ые):

- а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и
- б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*,

Используемый здесь термин «изогенный» относится к по существу идентичному геному. Таким образом, в одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению является изогенной с гонококковым штаммом FA1090 дикого типа (то есть по существу немодифицированным), за исключением указанной генетической(их) модификации(й). В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению является изогенной с гонококковым штаммом FA1090, содержащим гены *lpx11* и *rmp* дикого типа, за исключением указанной генетической модификации(й).

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению идентична гонококковому штамму FA1090, за исключением генетической(их) модификации(й), которая(ые):

- а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или

полипептида гена *lpx11*; и

б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*,

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению идентична гонококковому штамму FA1090 дикого типа (то есть по существу немодифицированному), за исключением указанной генетической модификации(й). В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению является изогенной с гонококковым штаммом FA1090, содержащим гены *lpx11* и *rmp* дикого типа, за исключением указанной генетической модификации(й).

Примером гонококкового штамма FA1090 дикого типа (или гонококкового штамма FA1090, содержащего гены *lpx11* и *rmp* дикого типа) является гонококковый штамм FA1090, который можно получить из ATCC (#700825).

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению дополнительно содержит дополнительную(ые) генетическую(ие) модификацию(и), которые приводят к сверхэкспрессии и/или снижению или прекращению экспрессии до 3, до 5, до 10 или до 20 дополнительных антигенов *Neisseria*. Под «дополнительными» антигенами *Neisseria* подразумевают «в дополнение» к модификациям *Lpx11* и *Rmp* (то есть, не включая их). В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению содержит дополнительные генетические модификации, которые приводят к сверхэкспрессии и/или снижению или прекращению экспрессии 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительных антигенов нейссерий, то есть в дополнение к генетической модификации(ям), которая(ые) а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*.

В одном воплощении указанные дополнительные генетические модификации приводят к сверхэкспрессии и/или снижению или прекращению экспрессии дополнительных антигенов *Neisseria*, при этом указанная сверхэкспрессия и/или пониженная экспрессия сравнивается с гонококком штамма FA1090, который не был генетически модифицирован, или с гонококком штамма FA1090, содержащим соответствующий ген дикого типа. В случае, когда дополнительные генетические модификации приводят к сверхэкспрессии дополнительных антигенов *Neisseria*, указанные антигены предпочтительно присутствуют в наружной мембране бактерий, так что они экспонируются на поверхности OMV, полученных или получаемых из генетически модифицированного гонококка. В таком воплощении дополнительные антигены *Neisseria*

могут быть в форме отдельных полипептидов или могут присутствовать в том же полипептиде, что и слитый белок.

Квалифицированному специалисту известны способы сверхэкспрессии антигенов, в частности способы сверхэкспрессии антигена(ов), так что повышенные уровни присутствуют на поверхности OMV (см., например, способы, обобщенные в WO 2012/032498A2). OMV могут быть получены из бактерий, которые были генетически модифицированы для сверхэкспрессии конкретного(ых) антигена(ов). Бактерия уже может экспрессировать антиген(ы), но может включать генетическую модификацию, которая по сравнению с бактерией без указанной модификации увеличивает экспрессию антигена. Эту модификацию обычно вводят с использованием рекомбинантных методов, например, сайт-специфического мутагенеза или направленной гомологичной рекомбинации. В результате сверхэкспрессии везикулы наружной мембраны, полученные из модифицированной бактерии, содержат более высокие уровни сверхэкспрессированного антигена(ов).

Указанные антигены *Neisseria* могут быть антигенами, полученными из любого представителя рода *Neisseria*, например, *N. animalis*, *N. animaloris*, *N. bacilliformis*, *N. canis*, *N. cinerea*, *N. dentiae*, *N. elongata*, *N. flava*, *N. flavescens*, *N. gonorrhoeae*, *N. iguanae*, *N. lactamica*, *N. macacae*, *N. meningitidis*, *N. mucosa*, *N. oralis*, *N. perflava*, *N. pharyngis*, *N. polysaccharea*, *N. shayeganii*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. wadsworthii*, *N. weaveri* или *N. zoodegmatis*. В одном воплощении указанные антигены *Neisseria* представляют собой антигены, полученные из *Neisseria meningitidis*. В другом воплощении указанные антигены *Neisseria* представляют собой антигены, полученные из *Neisseria gonorrhoea*.

В одном воплощении гонококковая бактерия по изобретению содержит дополнительную(ые) генетическую(ие) модификацию(и), которые приводят к сверхэкспрессии до 3, до 5, до 10 или до 20 дополнительных антигенов *Neisseria*.

Способы получения генетически модифицированной бактерии

В следующем аспекте данного изобретения предложен способ получения гонококковой бактерии по изобретению, включающий либо:

а) снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpx11* в гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090; либо

б) снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением первой

гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpx11* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090.

В способе, описанном в (а), первая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой одиночный мутант ($\Delta lpx11$), а вторая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой двойной мутант ($\Delta lpx11, \Delta rmp$). В способе, описанном в б), первая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой одиночный мутант (Δrmp), а вторая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой двойной мутант ($\Delta lpx11, \Delta rmp$).

В предпочтительном воплощении способ по изобретению включает снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpx11* в гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090. В указанном предпочтительном воплощении первая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой одиночный мутант ($\Delta lpx11$). Одиночный мутант ($\Delta lpx11$) представляет собой гонококк штамма FA1090, который был генетически модифицирован таким образом, что была осуществлена делеция его гена *lpx11*. В одном воплощении вторая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой двойной мутант ($\Delta lpx11, \Delta rmp$).

В одном воплощении способ по изобретению включает стадии снижения или прекращения экспрессии мРНК и/или полипептида гена *lpx11* в гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090. В одном воплощении способ по изобретению включает стадии снижения или прекращения экспрессии полипептида *Lpx11* в гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии полипептида *Rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090.

В одном воплощении указанная(ые) генетическая(ие) модификация(и), снижающая(ие) или прекращающая(ие) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептидов генов *lpx11* и *rmp*, может представлять собой или содержать

- a) разрушение или делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*; или
- b) снижение или прекращение экспрессии *lpx11* и *rmp* в штамме, содержащем гены *lpx11* и *rmp* дикого типа.

Однако, предпочтительно, чтобы генетическая(ые) модификация(и) включала(и)

разрушение или делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*. Наиболее предпочтительно осуществлять делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*. В предпочтительном воплощении генетические модификации представляют собой делеции генов.

Специалисту в данной области известны обычные способы нокаута гена, с помощью которых можно получить «вторую гонококковую бактерию FA1090» (то есть двойной мутантный штамм $\Delta lpxL1, \Delta rmp$). Способы нокаута гена хорошо известны, и ранее сообщалось о мутантах *Neisseria* с нокаутом [см., например, *Makda Fisseha et al. Infection and Immunity Jun 2005, 73 (7) 4070-4080*]. Например, нокаут может быть достигнут путем делеции по меньшей мере части кодирующей области, но можно использовать любой другой подходящий способ, например, делецию или мутацию промотора, делецию или мутацию стартового кодона и так далее. Бактерия может содержать маркерный ген вместо нокаутированного гена, например, маркер устойчивости к антибиотику. Какой бы способ (или комбинация способов) ни был выбран, полученная бактерия будет по существу свободна от *Lpx11* и *Rmp*.

В предпочтительном воплощении снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* осуществляют путем геномной рекомбинации. В одном воплощении геномная рекомбинация представляет собой гомологичную рекомбинацию, при которой заменены гены *lpx11* и *rmp* или их часть. В одном воплощении снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* осуществляется путем замены кодирующих последовательностей *lpx11* и *rmp* или их части последовательностью гетерологичного гена. Однако в предпочтительном воплощении снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* осуществляют путем замены кодирующих последовательностей *lpx11* и *rmp* или их части кассетами устойчивости к антибиотику или генами устойчивости к антибиотику.

В одном воплощении снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* представляют собой делеции генов, возможно, при этом указанные делеции генов являются результатом модификаций в виде добавления, замены или делеции последовательности в локусах *lpx11* и *rmp*. В одном воплощении уменьшение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* осуществляется путем добавления или вставки последовательности гетерологичного гена (или гетерологичной последовательности) в кодирующие последовательности *lpx11* и *rmp* и/или замены последовательности генов *lpx11* и *rmp* или их части последовательностью гетерологичного гена. В одном воплощении последовательность гетерологичного гена представляет собой ген устойчивости к антибиотику, содержащийся в кассете, причем указанная кассета также

содержит сайт рекомбинации.

В одном воплощении снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* осуществляют путем добавления кассет устойчивости к антибиотикам в кодирующие последовательности *lpx11* и *rmp* и/или замены кодирующих последовательностей *lpx11* и *rmp* или их части на кассеты устойчивости к антибиотику. Кассета устойчивости к антибиотику представляет собой генную кассету, которая несет сайт рекомбинации и ген устойчивости к антибиотику, например, KanMX, который придает бактериям устойчивость к канамицину.

Добавление гена, придающего устойчивость к антибиотику, к генам *lpx11* и/или *rmp*, или замена последовательностей генов *lpx11* и/или *rmp* (например, кодирующих областей) или их части геном, придающим устойчивость к антибиотику, позволяет проводить селекцию трансформантов, несущих встроенный ген устойчивости к антибиотику (в отличие от гена, делецию которого осуществляют). Успешные трансформанты (то есть успешно полученные мутанты), таким образом, являются чувствительными при посеве штрихом на чашку в присутствии указанного антибиотика или при выращивании в его присутствии. Любые бактерии, которые не были успешно трансформированы, не выживают. Тем не менее, трансформанты должны быть впоследствии протестированы: а) чтобы убедиться, что достигнуто снижение или прекращение экспрессии и/или функции указанного гена, и б) чтобы убедиться, что не осталось остаточных бактерий дикого типа (то есть нетрансформированных).

При желании для замены кассеты антибиотика может применяться последующая трансформация с использованием безмаркерной конструкции с мутацией. Таким образом, в воплощении кассета устойчивости к антибиотику впоследствии заменяется.

Везикулы наружной мембраны

В еще одном аспекте изобретения предложено применение гонококковой бактерии по изобретению (то есть генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где генетическая(ие) модификация(и) а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*) при получении OMV.

В случаях, когда Lpx11 экспрессируется в везикулах наружной мембраны:

В следующем аспекте предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококка штамма FA1090, где указанная везикула наружной мембраны содержит либо пониженные уровни, либо неопределяемый уровень как полипептида Lpx11,

так и полипептида Rmp. В одном воплощении предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококка штамма FA1090, где указанная везикула наружной мембраны содержит либо пониженные уровни, либо неопределяемый уровень Lpx11 и Rmp. В одном воплощении пониженные уровни либо неопределяемый уровень как полипептида Lpx11, так и полипептида Rmp измеряют относительно OMV из бактерии FA1090 дикого типа. В другом воплощении пониженные уровни либо неопределяемый уровень как полипептида Lpx11, так и полипептида Rmp измеряют относительно OMV из гонококковой бактерии штамма FA1090, указанный штамм содержит гены *lpx11* и *rmp* дикого типа (то есть немодифицированные). В одном воплощении пониженные уровни либо неопределяемый уровень как полипептида Lpx11, так и полипептида Rmp измеряют при помощи иммуноанализа (например, Вестерн-блоттинга или ИФА).

В еще одном аспекте изобретения предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококковой бактерии по изобретению. Таким образом, предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где генетическая(ие) модификация(и) а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*. В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению получена или может быть получена из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где генетическая(ие) модификация(и) а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *rmp*. Генетическая(ые) модификация(и), выполненная(ые) в геноме гонококка, приводит(ят) к получению OMV из указанной генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090 со сниженной или прекращенной экспрессией и/или функцией полипептида Lpx11 и сниженной или прекращенной экспрессией и/или функцией полипептида Rmp по сравнению с уровнями экспрессии и/или функцией полипептидов Lpx11 и Rmp в сравнительной OMV, причем указанная приведенная для сравнения OMV происходит из штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации (или содержатся гены *lpx11* и *rmp* дикого типа).

В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению имеет пониженную или прекращенную экспрессию и/или функцию полипептида Lpx11 и пониженную или прекращенную экспрессию и/или функцию полипептида Rmp. В другом воплощении везикула наружной мембраны по изобретению имеет пониженную или

прекращенную экспрессию полипептида *Lpx11* и пониженную или прекращенную экспрессию полипептида *Rmp*. В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению имеет пониженную или прекращенную экспрессию полипептида *Lpx11* и пониженную или прекращенную экспрессию полипептида *Rmp* на поверхности OMV. Указанная пониженная или прекращенная экспрессия и/или функция сравнивается с OMV из гонококковой бактерии штамма FA1090, содержащей гены *lpx11* и *rmp* дикого типа.

В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению не экспрессирует *Lpx11* или *Rmp*. В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению не экспрессирует *Lpx11* или *Rmp* на поверхности OMV.

В одном воплощении предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где генетическая(ие) модификация(и) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида *Lpx11* и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида *rmp*, при этом генетическая(ие) модификация(и) включает(ют) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*. В одном воплощении предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где генетическая(ие) модификация(и) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида *Lpx11* и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида *rmp*, при этом генетическая(ие) модификация(и) включает(ют) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*, приводящую к двойному мутантному гонококку FA1090 ($\Delta lpx11$, Δrmp).

В одном воплощении предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где генетическая(ие) модификация(и) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида *Lpx11* и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида *Rmp*, при этом генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой делеции генов, где указанные делеции генов являются результатом модификаций в виде добавления, замены или делеции последовательности в локусах *lpx11* и *rmp*, возможно, где указанная делеция гена является результатом замены части или частей генов *lpx11* и *rmp* с гетерологичными последовательностями, возможно, где указанные гетерологичные последовательности кодируют гены устойчивости к антибиотику.

В случаях, когда *Lpx11* не экспрессируется в везикулах наружной мембраны:

В другом аспекте изобретения предложена везикула наружной мембраны (OMV) из генетически модифицированного гонококка штамма FA1090, где указанный генетически модифицированный гонококк штамма FA1090 содержит генетическую(ие)

модификацию(и), которая(ые): а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *lpx11*, мРНК *lpx11* и/или полипептида Lpx11; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *rmp*, мРНК *rmp* и/или полипептида Rmp,

Причем указанная OMV содержит:

I. пониженные уровни полипептида Rmp по сравнению с уровнями полипептида Rmp в сравнительной OMV из указанного приведенного для сравнения штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации; и

II. пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной OMV.

В одном воплощении OMV содержит липополисахарид (LOS) с пониженными уровнями гексаацилированного липида А. В воплощении OMV содержит липополисахарид (LOS) с компонентом липид А, указанный компонент липид А имеет пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной OMV (где в приведенной для сравнения OMV из *N. gonorrhoeae* штамма FA1090 отсутствует генетическая(ие) модификация(и), которая а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *lpx11*, мРНК *lpx11* и/или полипептида Lpx11; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *rmp*, мРНК *rmp* и/или полипептида Rmp).

В одном воплощении указанная OMV дополнительно содержит

iii. повышенные уровни пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, по сравнению с уровнями пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, из сравнительной OMV.

В одном воплощении OMV дополнительно содержит липоолигосахарид (LOS) с повышенными уровнями пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота. В одном воплощении OMV дополнительно содержит липоолигосахарид (LOS) с компонентом липида А, причем указанный компонент липида А имеет повышенные уровни пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, по сравнению с уровнями пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, из сравнительной OMV. В одном воплощении в указанном пентаацилированном липиде А, в котором отсутствует лауриновая кислота, отсутствует вторичная лауроильная цепь с невозстанавливающим концом дисахарида GlcN.

Кроме того, предложена везикула наружной мембраны (OMV) из генетически модифицированного штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, причем OMV содержит:

I. пониженные уровни полипептида Rmp по сравнению с уровнями

полипептида Rmp в сравнительной OMV из штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации; и

II. пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной OMV.

III. повышенные уровни пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, по сравнению с уровнями пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, из сравнительной OMV;

Уровни гекса/пентаацилированного липида А можно определить, как описано ранее, пример такого способа представлен в Примере 6.

Везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из гонококковой бактерии по изобретению, содержат PofB, причем указанный белок PofB содержит восемь петлевых доменов (петлевые домены 1-8). Указанные петлевые домены представлены в настоящем документе как SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 и 33 (то есть петлевые домены PofB из штамма FA1090 2КО $\Delta lpx11$, Δrmp). В одном воплощении везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококковой бактерии по изобретению, содержит белок PofB, указанный белок PofB содержит SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33. В одном воплощении везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококковой бактерии по изобретению, содержит белок PofB, указанный белок PofB содержит восемь петлевых доменов, причем каждый петлевой домен имеет идентичность по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33, соответственно. Иными словами, 1 петлевой домен может содержать последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 26, 2 петлевой домен может содержать последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 27 и так далее.

В одном воплощении везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из

гонококковой бактерии по изобретению, содержат последовательность белка PrgB, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 25. В одном воплощении везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из гонококковой бактерии по изобретению, содержит последовательность белка PrgB SEQ ID NO: 25.

В одном воплощении везикулы наружной мембраны по изобретению демонстрируют сниженную активацию toll-подобного рецептора 4 (TLR4) по сравнению с активацией приведенных для сравнения OMV из гонококкового штамма FA1090, в котором отсутствуют генетические модификации. Способ, используемый для определения активации TLR4, раскрыт в Примере 13.

В еще одном аспекте изобретения предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококковой бактерии по изобретению. Таким образом, предложена везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где генетическая(ие) модификация(и) а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*. В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению получена или может быть получена из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где генетическая(ие) модификация(и) а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *rmp*. Генетическая(ие) модификация(и), выполненная(ые) в геноме гонококка, приводит(ят) к тому, что OMV из указанной генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090 содержат пониженные уровни полипептида Rmp по сравнению с уровнями полипептида Rmp в сравнительной OMV из штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации; и пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной OMV.

Таким образом, в изобретении предложены везикулы наружной мембраны гонококков. Везикулы наружной мембраны включают любые протеолипосомные везикулы, полученные при разрушении или шелушении наружной мембраны гонококка, с образованием из них везикул, которые сохраняют белковые антигены наружной мембраны. OMV могут быть получены любыми способами, известными специалистам в данной области техники. Например, OMV могут быть получены из бактерий искусственным путем,

и их можно получать посредством обработки детергентом (например, дезоксихолатом) или способами без детергентов. Предпочтительным способом получения OMV является, например, центрифугирование с последующей фильтрацией культуральной надосадочной жидкости и ее концентрированием с использованием тангенциальной проточной фильтрации (TFF) (например, как описано в Примере 10).

В предпочтительном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению представляет собой нативную везикулу наружной мембраны, то есть не экстрагированную детергентом. В предпочтительном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению получена путем экстрагирования без детергента. Везикулы наружной мембраны по изобретению получают в результате блеббинга или получают в результате разрушения наружной мембраны, при этом указанное разрушение по существу не включает экстракцию OMV детергентом из наружной мембраны. Таким образом, предпочтительные способы получения везикул наружных мембран по изобретению осуществляют по существу в отсутствие детергента с использованием таких способов, как обработка ультразвуком, гомогенизация, микрофлюидизация, кавитация, осмотический шок, измельчение, Френч-пресс, смешивание и так далее. Способы, в которых не используется детергент или используется малое количество детергента, могут сохранять полезные антигены, как описано в [W02004/019977].

В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению обладает перекрестным бактерицидным действием при введении субъекту. В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению при введении субъекту способна индуцировать перекрестно-бактерицидные титры антител. В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению при введении субъекту обладает перекрестным бактерицидным действием против гетерологичного и гомологичного штамма(ов) *N. gonorrhoeae*, где гомологичный штамм представляет собой штамм гонококка FA1090, а гетерологичный(е) штамм(ы) являются штаммами гонококка, отличными от FA1090, например, WHO-M, F62, MS11, WHO-N, BG27, BG8, WHO-F, WHO-G и GC14.

Везикулы наружной мембраны по изобретению имеют диаметр от 40 нм до 120 нм по данным электронной микроскопии (например, от 60 нм до 80 нм по данным электронной микроскопии). Кроме того, OMV по изобретению по существу не имеют цитоплазматического загрязнения.

OMV высвобождаются спонтанно во время роста бактерий и могут быть выделены из культуральной среды. Выделение в идеале включает отделение OMV от живых и/или интактных бактерий *N. gonorrhoea*, например, с помощью низкоскоростного

центрифугирования для осаждения клеток, оставляя пузырьки в суспензии, и/или путем фильтрации по размеру с использованием фильтра, такого как фильтр 0,22 мкм, который пропускает пузырьки, но не позволяет проходить интактным бактериям. Таким образом, в отличие от культуральной среды, содержащие OMV композиции по настоящему изобретению, как правило, по существу не содержат целых бактерий, как живых, так и мертвых. Размер пузырьков означает, что их можно легко отделить от целых бактерий путем фильтрации, например, которая обычно применяется для стерилизации фильтрованием. Хотя пузырьки будут проходить через стандартные фильтры 0,22 мкм, они могут быстро засориться другим материалом, поэтому может быть полезно выполнить последовательные стадии стерилизации фильтрованием через серию фильтров с уменьшающимся размером пор перед использованием фильтра 0,22 мкм. Примерами пред-фильтров могут быть фильтры с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и так далее. В одном воплощении везикула наружной мембраны по изобретению очищается фильтрованием через стерильный фильтр с размером пор менее 0,5, 0,4 или 0,3 мкм.

Эффективный процесс для получения OMV описан в [W02005/004908] и включает ультрафильтрацию неочищенных OMV вместо высокоскоростного центрифугирования. Способ может включать стадию ультрацентрифугирования после проведения ультрафильтрации.

В полученных везикулах могут полностью отсутствовать LOS или могут отсутствовать гексаацилированные LOS, например, LOS в везикулах может иметь уменьшенное количество вторичных ацильных цепей на молекулу LOS. Например, OMV, полученные из генетически модифицированного гонококка по изобретению (то есть штамма, имеющего делецию или мутацию *lpx11*), приводят к продукции пентаацилированного LOS [Koeberling et al. (2008) *J Infect Dis* 198:262-70 and Zollinger et al. (2010) *Vaccine* 28:5057-67]. Полученные OMV могут содержать LOS, содержащий липид А, в котором отсутствует вторичная лауроильная цепь с невозстанавливающего конца дисахарида GlcN липида А. Полученные OMV обладают пониженной активностью эндотоксина.

В одном воплощении везикулы наружной мембраны по изобретению имеют белковый профиль двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$), где белковый профиль двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$) измеряют с помощью масс-спектрометрического анализа (например, как описано в Примере 12). В одном воплощении белковый профиль двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$) включает *PorB*, *Opa*, *PilQ*, *VamA*, *VamD* и *Ton-B* зависимый рецепторный белок (NGO0952). В одном воплощении белковый профиль

двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpxL1, \Delta rmp$) включает *PorB 1B, PilQ, BamA* и *BamD*.

Иммуногенные композиции и вакцины

В еще одном аспекте изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны по изобретению.

Так, в данном аспекте изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из гонококка штамма FA1090, где указанная везикула наружной мембраны содержит либо пониженные уровни, либо неопределяемый уровень как полипептида *Lpx11*, так и полипептида *Rmp*.

Так, в данном аспекте изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны (OMV) из генетически модифицированного гонококка штамма FA1090, указанный генетически модифицированный гонококк штамма FA1090 содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые): а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *lpx11*, мРНК *lpx11* и/или полипептида *Lpx11*; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *rmp*, мРНК *rmp* и/или полипептида *Rmp*, указанная OMV содержит:

I. пониженные уровни полипептида *Rmp* по сравнению с уровнями полипептида *Rmp* в сравнительной OMV из указанного приведенного для сравнения штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации; и

II. пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной OMV.

В одном воплощении указанная OMV дополнительно содержит

III. повышенные уровни пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, по сравнению с уровнями пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, из сравнительной OMV.

В данном аспекте изобретения также предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где указанная бактерия содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и

б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию мРНК и/или полипептида гена *rmp*,

В одном воплощении предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из генетически модифицированной

гонококковой бактерии штамма FA1090, где указанная бактерия содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- a) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *lpx11*; и
- b) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию мРНК и/или полипептида гена *rmp*.

В одном воплощении предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где указанная бактерия содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- a) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Lpx11; и
- b) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Rmp.

В одном воплощении предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где указанная бактерия содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- a) прекращает(ют) экспрессию полипептида Lpx11; и
- b) прекращает(ют) экспрессию полипептида Rmp.

В одном воплощении предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где указанная бактерия содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Lpx11 и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Rmp, при этом генетическая(ие) модификация(и) включает(ют) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*. В одном воплощении предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из генетически модифицированной гонококковой бактерии штамма FA1090, где указанная бактерия содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Lpx11 и снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию полипептида Rmp, где генетическая(ые) модификация(и) представляет(ют) собой делеции гена, при этом указанные делеции гена являются результатом модификации в виде добавления, замены или делеции последовательности в локусах *lpx11* и *rmp*, возможно где указанная делеция гена является результатом замены части или частей генов *lpx11* и *rmp* гетерологичными последовательностями, возможно где указанные гетерологичные последовательности кодируют гены устойчивости к антибиотику.

Термин «иммуногенный» применительно к композиции, содержащей OMV, используется для обозначения того, что антигены, присутствующие на поверхности (или по существу экспонированные на поверхности), способны вызывать иммунный ответ, такой как клеточно-опосредованный и/или гуморальный ответ, например, при использовании для иммунизации субъекта. Иммуногенные композиции по изобретению могут найти применение в вакцинах. Таким образом, иммуногенные композиции и вакцины могут быть фармацевтически приемлемыми. Термин «полученный или получаемый» означает OMV, которые выделены из генетически модифицированного гонококка по изобретению, при этом указанное выделение приводит к обогащенной популяции OMV. Указанные OMV также могут быть очищены для удаления примесей, например, для удаления примесей цитоплазматических белков.

В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению не содержит живых и/или целых бактерий. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению является фармацевтически приемлемой.

В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению дополнительно содержит адъювант. Композиции по данному изобретению могут дополнительно содержать адъювант, так что при введении субъекту в сочетании с везикулами наружной мембраны по данному изобретению наблюдается повышенный или усиленный иммунный ответ на антиген или антигены, присутствующие на поверхности OMV. Композиции по данному изобретению могут дополнительно содержать адъювант, так что при введении субъекту в сочетании с везикулами наружной мембраны по данному изобретению наблюдается пониженная реактогенность.

Композиция по изобретению может содержать адъювант на основе соли алюминия. Подходящий адъювант на основе соли алюминия включает гидроксиды, фосфаты или их смеси. Соли могут принимать любую подходящую форму (например, гелевую, кристаллическую, аморфную и так далее), при этом предпочтительна адсорбция антигена на соли. В одном воплощении адъювант представляет собой адъювант на основе соли алюминия, например гидроксид алюминия. В одном воплощении адъювант представляет собой гидроксид алюминия. В одном воплощении OMV по изобретению адсорбированы на гидроксиде алюминия. В одном воплощении адъювант не имеет гелевую основу. В одном воплощении адъювант не представляет собой ALHYDROGEL.

Адъюванты, известные как «гидроксид алюминия», обычно представляют собой соли метагидроксида алюминия, которые обычно являются, по меньшей мере, частично кристаллическими. Метагидроксид алюминия, который может быть представлен формулой

$AlO(OH)$, можно отличить от других соединений алюминия, таких как гидроксид алюминия $Al(OH)_3$, с помощью инфракрасной (ИК) спектроскопии, в частности, по наличию полосы поглощения при 1070 см^{-1} и выраженного плеча при $3090\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ [*Chapter 9 of Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995]. Степень кристалличности адьюванта гидроксида алюминия отражается шириной полосы дифракции на половине высоты (WНН), при этом слабокристаллические частицы демонстрируют большее расширение линии вследствие меньшего размера кристаллов. Площадь поверхности увеличивается с увеличением WНН, и замечено, что адьюванты с более высокими значениями WНН способны лучше адсорбировать антиген. Адьювантам на основе гидроксида алюминия характерна волокнистая морфология (которая видна, например, на снимках, полученных с помощью электронного микроскопа). Значения рI адьювантов гидроксида алюминия обычно составляет приблизительно 11, т.е. поверхность самого адьюванта имеет положительный заряд при физиологических значениях рН. Для адьювантов гидроксида алюминия описана адсорбирующая способность от 1,8 до 2,6 мг белка на мг Al^{+++} при рН 7,4.

Композиции по изобретению можно изготавливать в различных формах. Композиции обычно вводят субъекту (например, млекопитающему) в водной форме, однако перед введением композиция может быть в неводной форме (например, в высушенном или лиофилизированном виде). Композиции могут быть изготовлены в жидкой форме в виде инъекций (либо в виде растворов, либо суспензий). Композиции по изобретению могут включать консервант, например мертиолят и/или 2-феноксиэтанол. Однако, предпочтительно, чтобы композиция по существу не содержала соединения ртути. Более предпочтительны вакцины, не содержащие ртути.

Композиции или вакцины по изобретению могут дополнительно содержать эксципиенты. Композиции по изобретению могут включать соли натрия (например, хлорид натрия) для придания тоничности. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, безводный динатрий фосфат, хлорид магния, хлорид кальция и так далее. Композиции по изобретению могут дополнительно содержать детергент, например, Твин (полисорбат).

Композиции могут включать один или более буферов. Типичные буферы включают: фосфатный буфер, Трис буфер, боратный буфер, сукцинатный буфер, гистидиновый буфер (в частности, с адьювантом гидроксидом алюминия) или цитратный буфер.

В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению при введении субъекту вырабатывает антитела против гомологичных и/или гетерологичных штаммов

Neisseria gonorrhoea, например, антитела, обладающие бактерицидным действием против гомологичных и/или гетерологичных штаммов *N. gonorrhoea*. Как правило, композиции по изобретению способны индуцировать сывороточный бактерицидный гуморальный ответ после введения субъекту. Эти ответы обычно измеряют, например, после введения мышам, и они являются стандартными показателями эффективности вакцины. Бактерицидная активность сыворотки (SBA) измеряет уничтожение бактерий, опосредованное комплементом, и ее можно исследовать с применением комплемента человека или кролика (приведенный в качестве примера способ измерения SBA можно найти в Примере 16 настоящего документа). Используемый здесь термин «гетерологичный(е) штамм(ы)» относится к штамму(ам) *N. gonorrhoeae*, который отличается от штамма *N. gonorrhoeae*, из которого были получены OMV, используемые для иммунизации субъекта. Поскольку OMV, используемые для иммунизации субъекта, здесь получены из гонококка штамма FA1090, гетерологичный(е) штамм(ы) относится к гонококку штамма, отличного от FA1090. Используемый здесь термин «гомологичный штамм(ы)» относится к штамму FA1090 *N. gonorrhoeae*. В воплощении иммуногенная композиция или вакцина по изобретению способна индуцировать перекрестные бактерицидные титры.

В еще одном аспекте изобретения предложена вакцина, содержащая либо везикулу наружной мембраны по изобретению, либо иммуногенную композицию по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Вакцины по изобретению могут быть либо профилактическими (то есть предупреждать инфекцию), либо терапевтическими (то есть лечить инфекцию), но обычно являются профилактическими. Вакцины по изобретению содержат иммунологически эффективное количество антигенов, при этом указанные антигены присутствуют на поверхности OMV по изобретению.

Лечение

В данном изобретении предложены иммуногенные композиции и вакцины для применения в качестве лекарственных средств. В изобретении также предложено применение везикул наружной мембраны по изобретению в качестве лекарственных средств в формате иммуногенных композиций и вакцин по изобретению. Так, в еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция по изобретению или вакцина по изобретению для применения в медицине.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция по изобретению или вакцина по изобретению для применения при иммунизации субъекта против инфекции *Neisseria*, например, инфекции *N. gonorrhoea*. Так, иммуногенная композиция по

изобретению или вакцина по изобретению может применяться для иммунизации субъекта против других бактерий рода *Neisseria*, наиболее конкретно, *N. meningitidis* и *N. gonorrhoea*.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция по изобретению или вакцина по изобретению для применения при лечении или предупреждении заболевания, вызванного *Neisseria*, например, *N. gonorrhoea*. В воплощении иммуногенная композиция или вакцина по изобретению применяется в лечении или профилактике гонореи в урогенитальной, аноректальной и/или ротоглоточной области. В другом воплощении иммуногенная композиция или вакцина по изобретению применяется в лечении или профилактике гонококкового воспалительного заболевания органов малого таза, диссеминированной гонококковой инфекции, внематочной беременности и/или бесплодия.

Эффективность профилактического и терапевтического воздействия можно оценить, наблюдая за инфекцией *N. gonorrhoea* после введения иммуногенной композиции или вакцины по изобретению. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предлагает в качестве показателя эффективности использовать такую конечную точку, как предупреждение заражения, которое оценивают при помощи диагностических тестов, а не возникновение заболевания; это обеспечит контроль за передачей также и в бессимптомном состоянии [Gottlieb SL et al. *Gonococcal vaccines: Public health value and preferred product characteristics; report of a WHO global stakeholder consultation, January 2019. Vaccine 2020 Jun 9;38(28):4362-4373*]. Защитный эффект вакцинации можно тестировать путем мониторинга иммунных ответов против иммуногенных белков в везикулах наружной мембраны или других антигенов после введения композиции или вакцины. Иммуногенность композиций по изобретению можно определять путем введения их испытуемым, а затем определения стандартных серологических параметров (например, уровней/концентрации анти-OMV IgG и наличия функциональных антител). Эти иммунные ответы обычно определяют после введения композиции и сравнивают со значениями, определенными до введения композиции. Когда вводят более одной дозы композиции, можно проводить более одного определения после введения. Иммуногенная композиция или вакцина по изобретению также считается эффективной, если гонококковая инфекция в определенных анатомических участках снижается/меньше у субъектов, которым вводили иммуногенную композицию или вакцину по изобретению, по сравнению с субъектами, которым вводили контрольную/плацебо-вакцину. В воплощении иммуногенная композиция или вакцина по изобретению защищает от инфекции *N. gonorrhoea* по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%,

по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%.

В еще одном аспекте предложен способ лечения или профилактики заболевания, вызванного *Neisseria* (например, *N. gonorrhoea*), у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению.

В еще одном аспекте предложен способ иммунизации субъекта, нуждающегося в этом, против *Neisseria* (например, *N. gonorrhoea*), включающий введение субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению.

В еще одном аспекте предложен способ выработки иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению. В еще одном аспекте предложен способ выработки иммунного ответа против инфекции *Neisseria* (например, инфекции *N. gonorrhoea*) у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению.

В еще одном аспекте предложено применение иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного *Neisseria*. В еще одном аспекте предложено применение иммуногенной композиции по изобретению или вакцины по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного *N. gonorrhoea*.

Дозированное лечение может представлять собой схему с однократным введением или схему с многократными введениями. В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, где субъекту вводят по меньшей мере 2 дозы композиции. Многократные введения можно осуществлять в схеме первичной иммунизации и/или в схеме бустерной иммунизации. За схемой первичной иммунизации может следовать схема бустерной иммунизации. Так, в следующем воплощении предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, где субъекту вводят по меньшей мере 2 дозы композиции, где по меньшей мере одна доза представляет собой бустерную дозу.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, где субъектами являются подростки и/или взрослые (например, молодые люди). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует проводить вакцинацию до первого полового контакта, обеспечивая при этом

максимальную защиту в период наибольшей заболеваемости, который обычно приходится на поздний подростковый возраст и молодость. ВОЗ определяет подростков как людей в возрасте от 10 до 19 лет [Rosen JE. *Adolescent health and development (AHD): a resource guide for World Bank operations staff and government counterparts. Washington, D.C., The World Bank, 2004*]. Таким образом, используемый здесь термин «подростки» означает субъектов в возрасте от 10 до 19 лет. Используемый здесь термин «взрослые» относится к субъектам в возрасте 20 лет или старше (например, 20-25 лет, 20-45 лет, 20-55 лет и так далее).

Для выявления субъектов для профилактики или лечения в соответствии со способами или применениями, изложенными в настоящем документе, могут применяться способы скрининга для определения факторов риска, связанных с таргетируемым или подозреваемым заболеванием или состоянием, или для определения статуса существующего заболевания или состояния у субъекта. Эти способы скрининга включают, например, определение экологических, семейных, профессиональных и других подобных факторов риска, которые могут быть связаны с гонококковой инфекцией или заболеваниями, связанными с гонококком, а также способы диагностики (например, бактериальный посев или методы иммуноанализа). Эти и другие рутинные способы позволяют клиницистам отбирать пациентов, нуждающихся в терапии. В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, в которых субъект подвержен повышенному риску инфицирования *N. gonorrhoea* относительно среднего риска в общей популяции. Примеры субъектов с повышенным риском заражения инфекцией *N. gonorrhoea* по сравнению со средним риском в общей популяции могут включать (без ограничения) секс-работников, мужчин, практикующих секс с мужчинами (МСМ), применяющих доконтактную профилактику (PrEP), лиц с текущим или прошлым диагнозом ИППП, ВИЧ-положительных лиц, которые участвуют в уходе, и лиц, которые обращаются или обращались за скринингом на ИППП или другими услугами, связанными с ИППП, в медицинском центре.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способа или применение по изобретению, где субъекта иммунизируют совместно против одного или нескольких дополнительных инфекционных агентов. Совместная иммунизация может включать иммунизацию против одного или более дополнительных инфекционных агентов в составе вакцины по изобретению (то есть вакцина по изобретению дополнительно содержит антигены против одного или более дополнительных инфекционных агентов). Однако совместная иммунизация может также включать иммунизацию против одного или более дополнительных инфекционных агентов,

при этом дополнительные вакцины вводят по существу в то же время, что и вакцину по изобретению (например, в ходе одного и того же приема в клинике). Например, иммуногенную композицию или вакцину по изобретению можно вводить субъекту вместе с другой иммуногенной композицией или вакциной, которая содержит антигены против одного или нескольких дополнительных инфекционных агентов. В воплощении один или более дополнительных инфекционных агентов представляют собой инфекционные агенты, вызывающие инфекции, передающиеся половым путем.

В еще одном аспекте предложена иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по изобретению, где указанную иммуногенную композицию или вакцину вводят внутримышечным или внутривнутрибрюшинным путем. В одном воплощении иммуногенную композицию или вакцину по изобретению вводят внутримышечным путем. В одном воплощении путь введения остается неизменным между первой и любой последующей иммунизацией. В одном воплощении путь введения не включает интраназальный путь.

Воплощения изобретения дополнительно описаны в следующих пронумерованных абзацах:

1. Генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):
 - a. снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена, мРНК и/или полипептида биосинтеза липида А лауроилацилтрансферазы (*lpx11*); и
 - b. снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена, мРНК и/или полипептида модифицируемого восстановлением белка (*rmp*).
2. Гонококковая бактерия по п. 1, где экспрессия и/или функция является сниженной или прекращенной по сравнению с гонококковой бактерией штамма FA1090, содержащей гены *lpx11* и *rmp* дикого типа.
3. Гонококковая бактерия по п. 2, где ген *lpx11* содержит последовательность по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и где ген *rmp* содержит последовательность по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1.
4. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 3, где ген *lpx11* содержит последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и где ген *rmp* содержит последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1.
5. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 4, где ген *lpx11* содержит SEQ ID NO: 3, и

где ген *rmp* содержит SEQ ID NO: 1.

6. Гонококковая бактерия по любому из предшествующих п.п., где генетическая(ие) модификация(и):

a. снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию полипептида Lpx11; и

b. снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию полипептида Rmp.

7. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 6, где полипептид Lpx11 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 4, и полипептид Rmp содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 2.

8. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 7, где полипептид Lpx11 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 4, и полипептид Rmp содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2.

9. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 7, где полипептид Lpx11 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и полипептид Rmp содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

10. Гонококковая бактерия по любому из предшествующих п.п., где бактерия экспрессирует менее 10%, менее 5% или менее 1% полипептида Lpx11 по сравнению с гонококковым штаммом FA1090, содержащим ген *Lpx11* дикого типа, и менее 10%, менее 5% или менее 1% гена Rmp по сравнению с гонококковым штаммом FA1090, содержащим ген *rmp* дикого типа.

11. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 10, где бактерия не экспрессирует полипептид Lpx11 и/или полипептид Rmp.

12. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 10, где сниженная или прекращенная экспрессия и/или функция полипептида lpx11 приводит к пентаацилированному липиду A, возможно, где ацилирование липида A определяют при помощи спектрометрии MALDI-TOF.

13. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 10, где сниженная или прекращенная экспрессия и/или функция полипептида Lpx11 приводит к более чем 50%, например, более чем 60%, более чем 70%, более чем 80%, более чем 90%, более чем 95% или более чем 99% пентаацилированию липида A.

14. Гонококковая бактерия по п. 12 или п. 13, где сниженная или прекращенная

экспрессия и/или функция полипептида *Lpx11* приводит к 100% пентаацилированию липида А.

15. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 14, где сниженная или прекращенная экспрессия и/или функция полипептида *Rmp* приводит к гонококку, который характеризуется усиленным блэббингом по сравнению с гонококковым штаммом FA1090, содержащим ген *rmp* дикого типа.

16. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 15, где генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой или включает(ют)

а) разрушение или делецию эндогенных генов *Lpx11* и *rmp* или

б) подавление экспрессии полипептида *Lpx11* и *Rmp* в штамме, содержащем гены *lpx11* и *rmp* дикого типа.

17. Гонококковая бактерия по п.п. 1 - 16, где генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой или включает(ют) разрушение или делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*.

18. Гонококковая бактерия по п. 17, где разрушение эндогенного *lpx11* и/или *rmp* приводит к экспрессии нефункциональных полипептидов *Lpx11* и/или *Rmp*.

19. Гонококковая бактерия по п. 17 или п. 18, где разрушение включает добавление, делецию или замену последовательности эндогенного гена *lpx11* и/или *rmp*.

20. Гонококковая бактерия по любому из предшествующих п.п., где генетическая(ие) модификация(и) включает(ют) делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*, то есть представляют собой делеции гена.

21. Гонококковая бактерия по п. 20, где делеция эндогенных генов *lpx11* и *rmp* приводит к двойному мутантному гонококку FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$).

22. Гонококковая бактерия по п. 20, где делеция эндогенных генов *lpx11* и *rmp* осуществляется посредством гомологичной рекомбинации.

23. Гонококковая бактерия по любому из предшествующих п.п., где генетическая модификация(и) могут затрагивать кодирующие и/или некодирующие области.

24. Гонококковая бактерия по любому из предшествующих п.п., где бактерия является изогенной с гонококковым штаммом FA1090, за исключением генетической модификации(й) по п.п. 1 - 23.

25. Гонококковая бактерия по любому из предшествующих п.п., содержащая дополнительную(ые) генетическую(ие) модификацию(и), которые приводят к сверхэкспрессии и/или снижению или прекращению экспрессии до 3, до 5, до 10 или до 20

дополнительных антигенов *Neisseria*.

26. Способ получения гонококковой бактерии по п.п. 1 - 25, включающий либо:

а) снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpx11* в гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерия FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090; или

б) снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpx11* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090.

27. Способ по п. 26, где а) первая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой одиночный мутант ($\Delta lpx11$), а вторая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой двойной мутант ($\Delta lpx11, \Delta rmp$), и где б) первая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой одиночный мутант (Δrmp), а вторая гонококковая бактерия FA1090 представляет собой двойной мутант ($\Delta lpx11, \Delta rmp$).

28. Способ по п. 26 или п. 27, где снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* осуществляют путем геномной рекомбинации.

29. Способ по пп. 26-28, где снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* представляют собой делеции генов, возможно, при этом указанные делеции генов являются результатом модификаций в виде добавления, замены или делеции последовательности в локусах *lpx11* и *rmp*.

30. Способ по пп. 26-29, где снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* осуществляется путем добавления последовательности гетерологичного гена в кодирующие последовательности *lpx11* и *rmp* и/или замены кодирующих последовательностей *lpx11* и *rmp* или их части последовательностью гетерологичного гена.

31. Способ по пп. 26-30, где снижение или прекращение экспрессии как гена *lpx11*, так и гена *rmp* осуществляют путем добавления кассет устойчивости к антибиотикам в кодирующие последовательности *lpx11* и *rmp* и/или замены кодирующих последовательностей *lpx11* и *rmp* или их части на кассеты устойчивости к антибиотику.

32. Применение гонококковой бактерии по любому из п.п. 1- 25 для получения везикул наружной мембраны.

33. Везикулы наружной мембраны, полученные или получаемые из гонококка штамма FA1090, где указанная везикула наружной мембраны содержит либо пониженные уровни, либо неопределяемый уровень как полипептида Lpx11, так и полипептида Rmp.

34. Везикула наружной мембраны по п. 33, где пониженные уровни либо неопределяемый уровень как полипептида Lpx11, так и полипептида Rmp измеряют относительно OMV из бактерии FA1090 дикого типа или бактерии FA1090, содержащей гены *Lpx11* и *Rmp* дикого типа.

35. Везикула наружной мембраны (OMV) из генетически модифицированного гонококка штамма FA1090, указанный генетически модифицированный гонококк штамма FA1090 содержит генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые): а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *lpx11*, мРНК *lpx11* и/или полипептида Lpx11; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *rmp*, мРНК *rmp* и/или полипептида Rmp,

указанная OMV содержит:

I. пониженные уровни полипептида Rmp по сравнению с уровнями полипептида Rmp в сравнительной OMV из штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации; и

II. пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной OMV.

36. Везикула наружной мембраны (OMV) по п. 35, где указанная OMV дополнительно содержит: III. повышенные уровни пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, по сравнению с уровнями пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, из сравнительной OMV.

37. Везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококковой бактерии по любому из п.п. 1 - 25.

38. Везикула наружной мембраны по п. 37, имеющая пониженную или прекращенную экспрессию полипептида Lpx11 и пониженную или прекращенную экспрессию полипептида Rmp.

39. В одном воплощении везикула наружной мембраны по п. 37, которая не экспрессирует Lpx11 или Rmp.

40. Везикула наружной мембраны по п. 37, имеющая пониженные уровни полипептида Rmp по сравнению с уровнями полипептида Rmp в сравнительной OMV из штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации; и пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с

уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной ОМV.

41. Везикула наружной мембраны по п. 40, которая дополнительно имеет повышенные уровни пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, по сравнению с уровнями пентаацилированного липида А, в котором отсутствует лауриновая кислота, из сравнительной ОМV.

42. Везикула наружной мембраны по любому из п.п. 33 - 41, где указанная везикула наружной мембраны представляет собой нативную везикулу наружной мембраны, то есть не экстрагированную детергентом.

43. Везикула наружной мембраны по любому из п.п. 33 - 42, которая очищена фильтрованием через стерильный фильтр с размером пор менее 0,5, 0,4 или 0,3 мкм.

44. Везикула наружной мембраны по любому из п.п. 33 - 43, где указанная везикула наружной мембраны имеет белковый профиль двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpxL1, \Delta rmp$), где указанный белковый профиль измеряют посредством масс-спектрометрического анализа.

45. Везикула наружной мембраны по п. 44, где белковый профиль двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpxL1, \Delta rmp$) включает *PorB 1B, PilQ, BamA* и *BamD*.

46. Иммуногенная композиция, содержащая везикулу наружной мембраны по любому из п.п. 33 - 45.

47. Иммуногенная композиция по п. 46, дополнительно содержащая адъювант.

48. Иммуногенная композиция по п. 47, где адъювант представляет собой адъювант на основе соли алюминия, например гидроксид алюминия.

49. Иммуногенная композиция по п.п. 46 -48, которая при введении субъекту вырабатывает антитела против гомологичных и/или гетерологичных штаммов *Neisseria gonorrhoea*, например, антитела, обладающие бактерицидным действием против гомологичных и/или гетерологичных штаммов *N. gonorrhoea*.

50. Вакцина, содержащая везикулу наружной мембраны по любому из п.п. 35 - 45 или иммуногенную композицию по п.п. 46 - 49 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

51. Иммуногенная композиция по п.п. 46 - 49 или вакцина по п. 50 для применения в медицине.

52. Иммуногенная композиция по п.п. 46 - 49 или вакцина по п. 50 для применения в иммунизации субъекта против инфекции *Neisseria*, например инфекции *N. gonorrhoea*.

53. Иммуногенная композиция по п.п. 46 - 49 или вакцина по п. 50 для

применения в лечении или профилактике заболевания, вызванного *Neisseria*, например, *N. gonorrhoea*.

54. Способ лечения или профилактики заболевания, вызванного *Neisseria* (например, *N. gonorrhoea*), у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по п.п.46 - 49 или вакцины по п. 50.

55. Способ иммунизации субъекта, нуждающегося в этом, против *Neisseria* (например, *N. gonorrhoea*), включающий введение субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по п.п.46 - 49 или вакцины по п. 50.

56. Способ выработки иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по п.п.46 - 49 или вакцины по п. 50.

57. Применение иммуногенной композиции по п.п. 46 - 49 или вакцины по п. 50 в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного *Neisseria*.

58. Применение иммуногенной композиции по п.п. 46 - 49 или вакцины по п. 50 в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного *N. gonorrhoea*.

59. Иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по любому из п.п. 51 - 58, где субъекту вводят по меньшей мере 2 дозы композиции.

60. Иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по любому из п.п. 51 - 58, где субъектами являются подростки и/или взрослые.

61. Иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по любому из п.п. 51 - 58, где субъект подвержен повышенному риску инфицирования *N. gonorrhoea* относительно среднего риска в общей популяции.

62. Иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по любому из п.п. 51 - 58, где субъекта совместно иммунизируют против одного или нескольких дополнительных инфекционных агентов.

63. Иммуногенная композиция или вакцина для применения, способ или применение по любому из п.п. 51 - 58, где указанную иммуногенную композицию или вакцину вводят внутримышечным или внутривентральным путем.

Следующие примеры предназначены только для иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Сравнение генома FA1090 с общемировым разнообразием гонококков

Для сравнительного геномного анализа отобрали два полных генома FA1090 следующим образом:

- (1) FA1090 – GenBank (см. идентификационный номер в GenBank AE004969.1)
- (2) FA1090 – штамм FA1090, предоставленный проф. Lee Wetzler, из Медицинской школы Бостонского университета.

Геном штамма FA1090 (1) скачали из GenBank (идентификационный номер: AE004969.1). Геном штамма FA1090 (2) секвенировали при помощи технологии Illumina Miseq (как описано в Примере 9). Осуществляли сборку секвенированного генома для установления полной хромосомной последовательности.

Идентичность между геномами (1) и (2) FA1090 подсчитывали с применением способа, описанного Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. *OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(2):1100-1103.*]. Геномы являлись идентичными на 99,97%.

Геномы этих двух штаммов FA1090 сравнивали с большим количеством других геномов гонококков, включая:

- 14 штаммов Всемирной организации здравоохранения (имеются в собственной коллекции),
- 12 штаммов, полученных из ATCC (имеются в собственной коллекции),
- 30 штаммов гонококков, входящих в состав собственной библиотеки гонококков, и
- 4000 общедоступных геномов штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, представляющих общемировую коллекцию видов.

Таким образом, для анализа было доступно в общей сложности 4058 геномов. В целом штаммы, рассматриваемые в данном анализе, были репрезентативными для разных стран и соответствовали надлежащим коллекциям циркулирующих штаммов гонококков (см. Фиг. 1).

Материалы и методы

Источники данных: Глобальная коллекция геномов гонококков (4000 общедоступных геномов) была загружена из базы данных PubMLST (по состоянию на март 2019). Геном штамма FA1090 GenBank (идентификационный номер AE004969.1) и геномы ВОЗ (идентификационный номер PRJEB14020) были загружены из баз данных GenBank и Европейского нуклеотидного архива (ENA), соответственно. Геномы FA1090 (2),

коллекции ATCC (12 штаммов) и собственной библиотеки гонококков (30 штаммов) получали с применением секвенирования нового поколения.

Сборка: Сборку секвенированных штаммов проводили с применением программы-сборщика *spades* (v. 3.6.2).

Обнаружение и сравнение однонуклеотидных полиморфизмов (snps): Геномные последовательности сравнивали с помощью программного обеспечения *kSNP3* (v.021). *kSNP3* позволяет обнаруживать коровые и не-коровые snp среди геномных последовательностей, предоставленных в качестве входных данных. Необработанный результат анализа представляет собой файл *multifasta* с выровненными snp, включая вставки и делеции. Этот файл *mfasta* может служить входными данными для любого программного конвейера для реконструкции филогении и структуры популяции. Для таких филогенетических анализов разработали специальный конвейер на языке программирования R (на основе пакетов *ape*, *Phangom*, *clValid* и *cluster R*) или выполняли его непосредственно с помощью программного обеспечения *splitstree* (v. 4.14).

Расширенное мультилокусное сиквенс-типирование (MLST): Геномные последовательности также характеризовали с помощью программного обеспечения *BigSdb* (v.1.20) для присвоения аллелей и идентификаторов белков перечню локусов, определенному с применением общедоступной схемы MLST на основе корового генома для рода *Neisseria* (*NM_cgMLST_v1.0*). Во всех случаях эти профили расширенного типирования MLST использовали для вычисления генетических расстояний между штаммами (на основе числа различных аллелей) и реконструкции филогении популяции.

Аннотация геномов: Кодировующие последовательности определяли и аннотировали с помощью программного конвейера *prokka* (v.1.13.3). Для генома (1) использовали исходную опубликованную аннотацию генома, но его также аннотировали повторно. Для генома (2) с помощью конвейера *mauve* контиги были упорядочены заново на геномный скаффолд (1), а затем слиты с линкерным мотивом стоп-кодона 6 рамок считывания с образованием виртуального единого контига (обозначенного *rlc*). Общие сведения о сборках представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Общие сведения о сборках FA1090. (а) это число равно 2201, если опубликованный геном AE004969 повторно аннотирован с помощью конвейера *prokka*, (б) эти числа относятся к единому виртуальному контигу аннотации FA1090_rlc.

	Штамм	Название сборки	Число контигов (длина)	Число плазмид (длина)	Число генов
--	-------	-----------------	------------------------	-----------------------	-------------

(1)	FA1090 AE004969	AE004969	1 (2153922)	-	2002 ^a
(2)	FA1090	FA1090 [FA1090_r1c] ^b	110 (2086558) [1 (2093390)] ^b	1 (4302) [-] ^b	2089 [2124] ^b

Полногеномные сравнения: Сравнение геномов проводили с использованием двух методов, основанных на обнаружении коровых и не-коровых однонуклеотидных полиморфизмов (snp) и расширенного мультилокусного присвоения аллелей (схема cgMLST_v1.0 из базы данных PubMLST).

Филогения однонуклеотидных полиморфизмов

Реконструкция филогении на основе snp представляет собой задачу, требующую вычислительных ресурсов, и для облегчения сравнения геномов и их визуализации проводили анализ на подмножестве выбранных геномов. Всего в анализ включали 369 геномов, которые были выбраны случайным образом из 4058 доступных геномов. Коровые и не-коровые snp определяли и выравнивали с применением конвейера kSNP.

Филогенетическая сеть, отображающая сходство штаммов, представлена на Фиг. 2. Геном FA1090 демонстрирует определенный уровень сходства с геномом штамма F62, но, в целом, он, по всей видимости, является очень отдаленным от всех геномов коллекции. В целом, сеть представляет собой звездообразную структуру с наличием примерно 6 компактных кластеров (черные стрелки на Фиг. 2).

Филогения cgMLST

Подробный геномный анализ всех 4058 штаммов проводили по схеме типирования для характеристики *Neisseria meningitidis* (NM cgMLST v1.0). Схема присваивает численные идентификаторы последовательности 1605 локусам генов в каждом геноме. Этот расширенный мультилокусный профиль (перечень численных идентификаторов) использовали для сравнения геномов друг с другом и для определения генетического расстояния (для реконструкции филогении штаммов).

Построили генетическую симметричную матрицу (показана на Фиг. 3), представляющую собой матрицу генетических расстояний, вычисленных между парами штаммов. В соответствии с реконструкцией, показанной на Фиг. 2, структура популяции характеризовалась хорошо выраженными кластерами, отделенными друг от друга. Иерархические отношения, основанные на парных расстояниях, представлены по обеим сторонам матрицы. В этом дереве кластеры хорошо разделены и определены.

Затем определяли оптимальное количество кластеров с помощью метода оптимизации силуэта (Фиг. 4). Эта процедура определяет разбиения в дереве, которые

максимизируют среднее расстояние между кластерами. Количество разбиений, которые максимизировали оценку, равнялось 24.

На основе матрицы генетических расстояний между парой штаммов, представленной на Фиг. 3, для каждого штамма также вычисляли среднее расстояние между ним и всеми другими штаммами. Этот анализ отражает «центральность» штаммов по отношению ко всей популяции и представлен на Фиг. 5 для всех проанализированных штаммов.

Показатель центральности, или близости к центру, измеряет, насколько каждый штамм является центральным или периферийным в гонокковой популяции с точки зрения генетического расстояния. Штаммы, расположенные ближе к центру, в среднем больше похожи на другие штаммы популяции. На основании этой оценки можно сделать вывод, что, в целом, периферийные штаммы не являются хорошими кандидатами на то, чтобы быть представителем характеристик, средних по популяции. Эти штаммы имеют тенденцию быть особенными и уникальными в популяции (то есть непохожими на другие). Показатели центральности для подмножества штаммов показаны в Таблице 2 ниже.

Таблица 2

Штамм	Показатель центральности
FA1090 (1) Genbank	965
FA1090 (2)	941
F62	944
SK92-679	803
GC_0817560	692

Как показано на Фиг. 5, штаммы (обведены) находятся в самой «центральной» области графика. Референсный штамм FA1090 находится в правом углу графика и находится среди самых периферийных штаммов. Это положение предполагает, что штамм FA1090 генетически отличается от других штаммов коллекции.

Вывод: Анализ всего генома FA1090 по сравнению с доступными геномами других штаммов гонокков показал, что среднее генетическое расстояние между этим штаммом и всеми другими штаммами гонокков намного выше, чем у других штаммов. Основываясь на этих анализах, вакцина на основе OMV (где OMV получены из штамма FA1090) не может в целом обеспечивать перекрестную защиту на основании геномного

сходства.

Пример 2: Бактериальные штаммы и условия культивирования

Гонококковый штамм FA1090 с 99,97% идентичностью штамму FA1090, представленному в Genbank под идентификационным номером AE004969.1), использовали в экспериментах, описанных ниже (то есть Штамм FA1090 (2) из Примера 1). Штаммы обычно культивировали в течение 18-24 часов на агаризованной среде для гонококков (GC) (Difco) с 1% изовиталексом при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

Пример 3. Конструирование плазмид и трансформация

Манипуляции с ДНК выполняли обычным образом, как описано для стандартных лабораторных методов [*Sambrook J FE, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 2012; 4th ed.*].

Lpx11: Плазмиду pBS- Δ *lpx11* kanR [см. *Oliver Koeberling, Anja Seubert, Dan M. Granoff. Bactericidal Antibody Responses Elicited by a Meningococcal Outer Membrane Vesicle Vaccine with Overexpressed Factor H-Binding Protein and Genetically Attenuated Endotoxin, The Journal of Infectious Diseases, Volume 198, Issue 2, 15 July 2008, Pages 262–270*], содержащую ген устойчивости к канамицину и расположенные в направлении против хода и по ходу транскрипции области для гомологичной рекомбинации использовали в качестве матрицы для амплификации ДНК, необходимой для трансформации. ПЦР проводили с использованием праймеров *lpx11_UP FW* (GGCATTTGTATTTTGCCGTCTG, SEQ ID NO: 9) и *lpx11_DO REV* (GCGAAATGTACGCCATTTTCTACGC, SEQ ID NO: 10) и общей реакционной смеси КАРА HiFi 2X (Roche) при следующих условиях реакции: 94°C в течение 5 мин, 40 циклов 94°C 30 сек, 60°C 30 сек и 72°C 3 мин, с финальной стадией при 72°C в течение 5 мин. Очистку ДНК осуществляли с применением набора для очистки QIAquick PCR (QIAGEN) согласно протоколу производителя.

Rmp: Амплификацию расположенных в направлении против хода и по ходу транскрипции областей гена *rmp* проводили с парами праймеров *UpIII-FOR/REV* и *DpIII-FOR/REV*, используя в качестве матрицы 50 нг геномной ДНК штамма FA1090. При этом амплификацию гена устойчивости к эритромицину (*eryR*) проводили с парой праймеров *EryR_gono_SmaI-Fw/Rev*, используя в качестве матрицы 10 нг плазмиды, несущей ген (Serruto *et al.*, 2010). См. Таблицу 3 ниже. Очищенные продукты ПЦР клонировали как *XbaI-SmaI* (UP *rmp*), *SmaI* (*eryR*) и *SmaI-XhoI* (DOWN *rmp*) в pBluescript KS+ (Agilent, #212207), расщепленный *XbaI-XhoI* (NEB). Правильность клонирования подтверждали двойным расщеплением и электрофорезом.

Таблица 3.

Название	Последовательность	Сайт рестрикции	SEQ ID NO
UpIII-FOR	gctctagaGGTCGTCTATCCGTTCCGTA	XbaI	11
UpIII-REV	tccccgggCTCAACGCCTGAAAACAACC	SmaI	12
DpIII-FOR	tccccgggTCAAGCGCAAATGACTCAAG	SmaI	13
DpIII-REV	cccgctcgagGGGAAAGGCGTGAATTTGTA	XhoI	14
EryR_gono_SmaI-Fw	ATTCGCCCGGGAAACTTAAGAGTGTGTTGATA GTG	SmaI	15
EryR_gono_SmaI-Rev	ATTCGCCCGGGACCTCTTTAGCTTCTTGG	SmaI	16

Трансформация: Для трансформаций использовали либо продукт ПЦР (для делеции *Lpx11*), либо линейаризованную XbaI плазмиду (для делеции *Rmp*). FA1090 дикого типа трансформировали продуктом ПЦР, описанным выше, с получением штамма FA1090 (1КО) *Lpx11*. Затем этот штамм 1КО трансформировали линейаризованной XbaI плазмидой с получением FA1090 (2КО) Δ *lpx11*, Δ *rmp*. Трансформации проводили, как описано ранее (Dillard JP. *Genetic Manipulation of Neisseria gonorrhoeae. Curr Protoc Microbiol. 2011;Chapter 4:Unit4A.2*), и отбирали трансформантов на чашках с агаром + 1% изовиталекс либо с канамицином 40 мкг/мл (Δ *lpx11*), либо с эритромицином 2 мкг/мл (Δ *rmp*).

Все трансформанты тестировали с помощью ПЦР-анализа с использованием полимеразы Accuprime Taq (Thermo Scientific) и с внешними праймерами (пары праймеров *lpx11* est FW/REV и UP_CHECK_NGO1577-Fw/DW_CHECK_NGO1577-Rev для Δ *lpx11* и Δ *rmp*, соответственно) для проверки правильности события двойной рекомбинации (см. Примеры 4 и 7 ниже).

Пример 4. Получение одиночного мутанта FA1090 (Δ *lpx11*)

Липополисахарид (LPS) обладает эндотоксинной активностью, в первую очередь за счет липида А. Его токсичность может привести к значительной реактогенности. Поэтому для снижения реактогенности вакцины на основе OMV против *N. gonorrhoeae* осуществляли делецию гена *lpx11* (NGO0154).

Штамм FA1090, содержащий аллель *PorB* IB, использовали в качестве исходного штамма для делеций.

FA1090 $\Delta lpxL1$ получали путем двойной гомологичной рекомбинации, при которой область кодирующей последовательности гена *lpxL1* заменяли на кассету устойчивости к антибиотику (канамицин).

Мутантные клоны $\Delta lpxL1$, устойчивые к канамицину, отбирали и амплифицировали, а их ДНК исследовали на наличие правильной мутации (Фиг. 6).

Осуществляли посев штрихом клона № 2 на чашки с канамицином и из производного клона (№ 2.1) готовили музейный образец в глицерине и получали лизат ДНК. С помощью праймеров, внешних по отношению к событию рекомбинации (Фиг. 6А), отобранные клоны подвергали скринингу на предмет утраты гена *lpxL1* и приобретения гена устойчивости к канамицину.

Все трансформанты исследовали с помощью ПЦР-анализа с использованием Taq-полимеразы Accuprime (Thermo Scientific) и с внешними праймерами (пары праймеров *lpxL1* est FW (CCGCCAAACTCAATCCTTCG, SEQ ID NO: 17) и *lpxL1* est REV (GCAAACSTTTGTTTCACCGTTCCG, SEQ ID NO: 18) для проверки правильности события двойной рекомбинации.

Ожидаемая длина ампликона у штамма дикого типа была короче (1703 п.н.), чем у мутанта с делецией (2344 п.н.). Как показано на Фиг. 7, продукт ПЦР из ДНК клона № 2 имеет две полосы, более короткую, которая соответствует дикому типу, и более длинную с ожидаемыми длинами для мутанта с делецией. Все другие клоны имеют более длинную полосу, включая субклон #2.1, что свидетельствует о том, что во всех этих клонах произошла рекомбинация и что эти клоны лишены гена *lpxL1*.

Пример 5. Исследование присутствия остаточного гоноккока дикого типа FA1090 в одиночном мутанте FA1090 ($\Delta lpxL1$)

При трансформации некоторые бактерии приобретают естественную устойчивость к используемому антибиотику, но не приобретают кассету, придающую устойчивость, в результате рекомбинации.

Для исследования присутствия остаточных клеток FA1090 (то есть дикого типа) (Фиг. 6С) проводили ПЦР с праймерами, специфичными в отношении генома дикого типа (Фиг. 6В). Поскольку праймеры специфичны для генома родительского штамма, наличие продукта указывает на присутствие клеток дикого типа в общей популяции. Напротив, отсутствие продукта указывает на гомогенную мутантную популяцию.

ПЦР-скрининги проводили с использованием Taq-полимеразы Accuprime (Thermo Scientific) с внутренними праймерами, специфичными для ДНК дикого типа (NGO_1pxL1wtcheck-Fw (CCGCGTTCGAGATGG, SEQ ID NO: 19) и NGO_1pxL1wtcheck-

Rev (GCGGAAGTGTGACGAG, SEQ ID NO: 20).

Для получения мутанта с делецией *lpx11* ожидаемая длина специфического для дикого типа ампликона составляла 176 п.н. Таким образом, в клонах FA1090 $\Delta lpx11$ №4 и №2.1, в которых полос не наблюдалось (Фиг. 8), мутантная популяция была чистой от примеси клеток дикого типа. Следовательно, для дальнейших экспериментов выбирали FA1090 $\Delta lpx11$ №2.1, который также имел надлежащий профиль амплификации, с использованием внешних праймеров.

Пример 6. Пентаацилирование LOS

Известно, что делеция *lpx11* приводит к липоолигосахаридам, содержащим пентаацилированную форму липида А. Таким образом, состояние ацилирования липида А оценивали с помощью спектрометрии MALDI-TOF, чтобы подтвердить потерю функции *Lpx11* в OMV, полученных из одиночного мутанта FA1090 ($\Delta lpx11$).

Способы:

Экстракция липида А: Липид А осаждали из 100 мкг OMV, высвобожденных штаммами гонококка FA1090 дикого типа и $\Delta lpx11$ (с одиночной мутацией), соответственно, и очищенных с использованием мягкого кислотного гидролиза с 1% (об./об.) уксусной кислотой в течение 3 ч при 100°C. Образцы центрифугировали при 14 000 g в течение 15 мин; осадки ресуспендировали в воде и дважды промывали водой. Затем осадки сушили в течение ночи с использованием SpeedVac, ресуспендировали в 20 мкл хлороформа/метанола (соотношение 4:1) и смешивали с равным объемом раствора Super DHB (Sigma), как описано ранее в [Rossi et al. *Modulation of endotoxicity of Shigella generalized modules for membrane antigens (GMMA) by genetic lipid A modifications: relative activation of TLR4 and TLR2 pathways in different mutants. J Biol Chem. 2014, 289(36):24922-35*].

Анализ MALDI TOF: 2 мкл экстракта липида А наносили на пластину-мишень (MTP 384, пластина-мишень из шлифованной стали BC, Bruker Daltonics) и анализировали с помощью Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) в режиме рефлектрона с регистрацией отрицательных ионов (см. Rossi et al. - ссылка предоставлена выше). Калибровочный стандарт пептида (Bruker Daltonics), смешанный с раствором Super DHB, включали в каждый анализ. Для MS/MS-анализа липида А основные пики из анализа в линейном режиме отбирали для диссоциации, индуцированной столкновением, и полученные фрагменты детектировали с помощью MALDI TOF-TOF в режиме регистрации отрицательных ионов. Спектры представляют собой сумму спектров, снятых с применением 50 одиночных импульсов лазера в 20 различных участках лунки.

Результаты: МС-анализ липида А: Структуры липида А из OMV дикого типа (то есть OMV, полученных из FA1090 дикого типа без генетических модификаций), и OMV $\Delta LpxII$ оценивали с помощью МС-анализа.

В случае липида А из OMV дикого типа наблюдался основной молекулярный ион с m/z 1632,03, что согласовалось с теоретической массой гексацильной, монофосфорильной структуры липида А (MPLA). В дополнение к этой основной форме также были идентифицированы дифосфорильные соединения (BPLA) с m/z 1711,97 (Фиг. 9А).

Основной компонент с молекулярным ионом с m/z 1449,84 наблюдался в спектре MALDI, полученном от липида А из OMV $\Delta LpxII$ (Фиг. 9В). Разница в массе в 182 Да, наблюдаемая с формой MPLA липида А дикого типа, согласуется с отсутствием одной цепи лауриновой кислоты (расчетная масса: 182,3 Да). Кроме того, спектр OMV $\Delta LpxII$ также выявил сигнал с m/z 1529,79, соответствующий дифосфорильной форме липида А, также лишенной цепи лауриновой кислоты. Сигнала МС, который можно было бы отнести к форме липида А дикого типа, не наблюдалось.

В результате с помощью MALDI TOF-анализа подтверждали, что OMV, полученные из FA1090 $\Delta LpxII$, имеют LOS, содержащий 100% моно- и дифосфорильных соединений в пентаацилированной форме (Фиг. 9).

Пример 7. Получение двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpxII$, Δrmp)

Было показано, что модифицируемый восстановлением белок (Rmp), ранее известный как РПП, индуцирует блокирующие антитела, которые могут ингибировать действие других бактерицидных антител [*Gulati S, et al. Antibody to reduction modifiable protein increases the bacterial burden and the duration of gonococcal infection in a mouse model. J Infect Dis. 2015;212(2):311-315*] [*Joiner KA, Scales R, Warren KA, Frank MM, Rice PA. Mechanism of action of blocking immunoglobulin G for Neisseria gonorrhoeae. J Clin Invest. 1985;76(5):1765-1772*].

Чтобы удалить Rmp из штамма FA1090 с одиночной мутацией $\Delta lpxII$ (и, таким образом, получить двойной мутант FA1090 $\Delta lpxII, \Delta rmp$), штамм FA1090 $\Delta lpxII$ #2.1 трансформировали линейаризованной конструкцией pBS Δrmp eryR.

FA1090 $\Delta lpxII, \Delta rmp$ получали путем двойной гомологичной рекомбинации, при которой область кодирующей последовательности гена *rmp* заменяли кассетой устойчивости к антибиотику (эритромицин).

Мутантные клоны $\Delta lpxII, \Delta rmp$, устойчивые к эритромицину, отбирали и амплифицировали, а их ДНК тестировали на наличие правильной мутации (Фиг. 10). Используя внешние по отношению к событию рекомбинации праймеры, отбирали клоны,

утратившие ген *rmp* и приобретшие ген устойчивости к эритромицину.

Все трансформанты тестировали с помощью ПЦР-анализа с использованием Taq-полимеразы Accuprime (Thermo Scientific) и внешних праймеров (UP_CHECK_NGO1577-Fw (GTGTGTCCAGTCGTAGCAGG, SEQ ID NO: 21) DW_CHECK_NGO1577-Rev (AGGGATGATGATAAAACCATATCC, SEQ ID NO: 22) для проверки правильности события двойной рекомбинации.

Ожидаемая длина ампликона у штамма дикого типа составляет 2089 п.н., а ожидаемая длина ампликона у мутанта с делецией составляет 2590 п.н. Как показано на Фиг. 10, продукты ПЦР всех клонов имели ожидаемую длину мутанта с делецией, в то время как полосы в контроле дикого типа имели меньший кажущийся размер, что позволяет предположить, что рекомбинация произошла во всех клонах и что в них произошла делеция гена *rmp*.

Пример 8. Исследование присутствия остаточного гонококка FA1090 с одиночной мутацией ($\Delta lpx11$)

Осуществляли посев штрихом клона № 1 (из Примера 7) на чашку с эритромицином и из производного клона (№ 1.1) готовили музейный образец в глицерине и лизат ДНК.

Для исследования присутствия остаточных клеток FA1090 $\Delta lpx11$ в созданном двойном мутанте проводили ПЦР с праймерами, специфичными для исходного генома (см. Фиг. 11). ПЦР-скрининги проводили с использованием Taq-полимеразы Accuprime (Thermo Scientific) и внутренних праймеров, специфичных для ДНК дикого типа (INTwt_NGO1577-Fw (TCGTACGCAACAACSTATGGAG, SEQ ID NO: 23) и INTwt_NGO1577-Rev (CATCAACATATTGAGGAGCCTG, SEQ ID NO: 24))

Ожидаемая длина ампликона, специфического для дикого типа, составляла 150 п.н. При использовании в качестве матрицы исходного FA1090 $\Delta lpx11$ №2.1 наблюдалась полоса.

В агарозном геле можно было наблюдать слабую полосу ДНК клона FA1090 $\Delta lpx11\Delta rmp$ №1, в то время как у клона FA1090 $\Delta lpx11\Delta rmp$ №1.1 полосы не наблюдалось, что позволяет предположить, что мутантная популяция не была контаминирована исходными клетками.

Для дальнейших экспериментов выбирали FA1090 $\Delta lpx11\Delta rmp$ №1.1.

Пример 9. Подтверждение делеции *lpx11* и *rmp* при помощи секвенирования нового поколения

Способы: Из замороженных музейных образцов FA1090 дикого типа (дикий тип), $\Delta lpx11$ (одиночный мутант, 1КQ) и $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (двойной мутант, 2КО) набирали бактерии

микробиологической петлей и высевали штрихом на чашку с агаризованной средой GC + 1% изовиталекс и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов. Бактерии ресуспендировали в 5 мл PBS до оптической плотности 0,6 при 600 нм (измеритель плотности клеток Ultrospec 10 GE Healthcare). Два миллилитра бактериальной суспензии центрифугировали в двух повторностях в течение 5 минут при 13000 об/мин при 4°C, супернатант отбрасывали, а полученный осадок использовали для очистки ДНК с использованием наборов GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich Cat #NA2110) в соответствии с инструкцией производителя для грамотрицательных бактерий. Элюирование проводили 100 мкл предварительно нагретой (70°C) воды, не содержащей нуклеаз (ThermoFisher, кат. № 10977-035). Концентрацию очищенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 UV-Vis, а целостность ДНК проверяли электрофорезом в 0,8% агарозном геле в буфере TAE.

Библиотеки для секвенирования следующего поколения готовили с помощью *Nextera XT DNA Library Prep* в соответствии с протоколом производителя (документ № 15031942, v02 апрель 2017, Illumina). Время тагментации (фрагментации ДНК и присоединения последовательностей адаптеров) составляло 8 минут, и к библиотеке присоединяли адаптеры для секвенирования (набор Nextera XT Index, 24 индекса — 96 образцов; REF 15055294; LOT 10026832). Библиотеку нормализовали и разводили до 1:25. Другие библиотеки конструировали с использованием набора *Nextera DNA Flex Library Prep* в соответствии с протоколом производителя (документ № 1000000025416 v07; май 2019; Illumina, США). 300 нг ДНК тагментировали, очищали с применением магнитных частиц и амплифицировали в течение 5 циклов ПЦР с использованием Illumina Enhanced PCR Mix и адаптеров с двойным индексом. Индексы выбирали в соответствии с *Index Adapter Pooling guide, Nextera DNA CD Indexes*, Illumina (Документ # 1000000041074 v09). Амплифицированные ДНК очищали и отбирали по размеру, средний размер фрагментов составлял 500-600 пар оснований. Готовые библиотеки проверяли на биоанализаторе Agilent 2100 с применением набора High Sensitivity DNA. Библиотеки объединяли и разбавляли до концентрации 4 нМ. Пул денатурировали и добавляли 1% неиндексированной контрольной библиотеки PhiX согласно MiSeq System (*Denature and Dilute Libraries Guide* Документ # 15039740 v10, Illumina). Денатурированные библиотеки загружали в концентрации 12 пМ. Все библиотеки загружали в секвенатор Illumina MiSeq для проведения секвенирования с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 на 500 циклов (Illumina, кат. № MS-103-1003) с парно-концевым прочтением по 250 пар оснований (2×250).

Результаты: Выделяли геномную ДНК штамма FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ #1.1 и осуществляли сборку полного генома. Из него извлекали последовательность двух локусов, подвергнутых делеции.

Секвенирование нового поколения использовали для подтверждения:

- а) наличия локуса *lpx11* в штамме изолята FA1090 (2) дикого типа (Фиг. 12),
- б) ожидаемой делеции *lpx11* в мутанте FA1090 $\Delta lpx11 \Delta rmp$ (Фиг. 13).
- в) наличие локуса *rmp* в изоляте штамма FA1090 (2) дикого типа (Фиг. 14) и
- г) ожидаемой делеции *rmp* у мутанта FA1090 $\Delta lpx11 \Delta rmp$ (Фиг. 15).

Пример 10. Получение OMV

OMV получены в отсутствие детергента и поэтому являются нативными OMV (nOMV).

Чтобы получить OMV для представленных здесь анализов, 500 мл бактериальной культуры центрифугировали при 12000 g в течение 30 минут. Осадок отбрасывали.

500 мл надосадочной жидкости инкубировали с 100 мкл бензоназы (1000 ЕД/мл) в течение 24-72 часов при 4°C. Инокулят фильтровали через фильтр 0,22 мкм, а затем выполняли серию стадий концентрирования и промывания с использованием тангенциальной проточной фильтрации (TFF) с отсечением 300 кДа. После первого концентрирования до 250 мл осуществляли замену буфера на 5 л PBS (20CV). После второго концентрирования до 50 мл осуществляли вторую замену буфера на 2 л PBS (40CV). Затем осуществляли последнюю стадию концентрирования до 5-15 мл.

Затем получали очищенные OMV в PBS путем фильтрования через фильтр 0,22 мкм.

Пример 11. Подтверждение делеции белка Rmp

SDS-PAGE и способ пептидного масс-фингерпринтинга: OMV, выделенные из гонококка FA1090 дикого типа, FA1090 $\Delta lpxL1$ (с одиночной мутацией) и FA1090 $\Delta lpxL1, \Delta rmp$ (с двойной мутацией), соответственно, денатурировали в течение 5 минут при 95°C в буфере для образцов SDS, содержащем SDS в конечной концентрации 2%. Затем 10 мкг каждого препарата наносили на 4-12% полиакриламидные гели (Bio-Rad). Гель окрашивали кумасси синим и интересующие полосы вырезали из геля, промывали один раз 50 mM бикарбонатом аммония и ацетонитрилом (50:50, об./об.), один раз чистым ацетонитрилом и высушивали на воздухе. К высушенным полосам добавляли 50 мкл 0,012 мкг/мкл модифицированного трипсина для секвенирования (Promega, Madison, WI) в 50 mM бикарбонате аммония, и оставляли для расщепления в течение ночи при 37°C. Раствор, содержащий смеси пептидов, загружали в колонку для обращенно-фазовой хроматографии C18 Acquity UPLC peptide CSH C18 130Å, 1,7 мкм, 1 x 150 мм, и разделяли линейным

градиентом 28–85% буфера В (0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в АСН) при скорости потока 50 мкл/мин и 50°C. Данные МС получали в режиме регистрации положительных ионов на масс-спектрометре Q-Exactive bioPharma plus с использованием режима сбора данных, зависящего от данных (DDA), с динамическим выбором для высокоэнергетичной фрагментации\столкновительной диссоциации (HCD) пяти ионов-предшественников, преобладающих при обзорном сканировании (300-1600 m/z) при разрешении 70 000. Устанавливали автоматическую регулировку усиления (AGC) 3 x 10⁶. Для регистрации МС/МС осуществляли выделение предшественников с использованием окна 3 m/z и регистрировали сканы МС/МС с разрешением 17 500 при 200 m/z с нормализованной энергией столкновения 26 эВ.

Анализировали спектры МС для идентификации белков с использованием программного обеспечения Peaks X (Bioinformatics solution) с использованием базы данных, содержащей белковые последовательности, полученные из секвенированного генома *Neisseria gonorrhoeae* FA1090.

Результаты: ОМВ, полученные из гонококка FA1090 дикого типа, $\Delta lpx11$ (одиночный мутант) и $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (двойной мутант), анализировали с помощью SDS-PAGE. После окрашивания геля кумасси определяли содержание белка в полосе, которая мигрировала с кажущейся молекулярной массой ~28 кДа. Белки расщепляли трипсином в геле и полученные пептиды анализировали при помощи LC-MS/MS. В полосах, наблюдаемых в ОМВ дикого типа и ОМВ $\Delta lpx11$ (одиночного мутанта), обнаруживали Rmp и белки мутности В и D. В полосе, наблюдаемой в ОМВ $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (двойного мутанта), обнаруживали только белки мутности В и D (см. Фиг. 16).

Пример 12. Сравнение генетической вариабельности между глобальными штаммами гонококков на основании белковых компонентов, присутствующих в ОМВ, полученных из двойного мутанта FA1090

По существу, такие же геномные сравнения (как указано в Примере 1) выполняли с учетом только белковых компонентов везикул наружной мембраны, полученных из гонококка FA1090 с двойной мутацией $\Delta lpx11, \Delta rmp$.

Перечень белковых компонентов ОМВ получали с помощью масс-спектрометрической характеристики продуктов ОМВ следующим образом.

Четыре различных продукта ОМВ из штамма FA1090 с двойной мутацией $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (2КО) рассматривали для масс-спектрометрического (МС) анализа. Три из этих четырех продуктов анализировали дважды с использованием двух разных протоколов расщепления. Всего методом МС было анализировали 7 препаратов. Данные МС каждого

образца анализировали независимо для идентификации белков и их относительного содержания. Для предсказания клеточной локализации белки аннотировали в сравнении с общедоступной аннотацией генома FA1090 и с помощью программного обеспечения PSORTb. Перечень белков каждого независимого МС-анализа фильтровали путем удаления белков, предсказанных как цитоплазматические и имеющих относительное содержание ниже 0,05%. Наконец, определяли результирующий окончательный перечень из 59 белков путем объединения семи прошедших фильтрацию перечней, выявленных в каждом эксперименте МС.

Из 59 белков, которые были идентифицированы с помощью МС, ряд белков был идентифицирован во всех продуктах ОМV (обозначены в Таблице 4 ниже) и наблюдался в концентрациях более 0,6% (масс./масс.) от общего белка ОМV.

Таблица 4.

Код Uniprot	Описание	Клеточная локализация ^(б)	<i>Количество белка (% масс./масс.) в каждом из семи проанализированных образцов</i>							Среднее значение	Станд. отклон
			TRD4	TRD5	TRD6	TRD7	TRD8	TRD9	TRD10		
Q5F5V7	Основной белок наружной мембраны (PorB 1B)	Наружная мембрана	72,2	72,4	79,1	64,0	60,2	77,1	70,4	70,8	6,7
-	Семейство белков мутности (Ora) ^(а)	Наружная мембрана	9,1	6,9	5,7	4,8	9,0	6,5	6,7	7,0	1,6
Q5FAD2	Секретин пилей IV типа (PilQ)	Наружная мембрана	1,7	2,0	1,6	1,3	1,8	2,1	1,6	1,7	0,3
Q5F5W8	Фактор сборки белков наружной мембраны (BamA)	Наружная мембрана	1,6	1,6	1,4	1,3	1,7	1,6	1,5	1,5	0,1
Q5F845	ТопВ-зависимый рецепторный белок	Наружная мембрана	0,7	0,6	0,4	0,6	0,9	0,3	0,8	0,6	0,2
Q5F9W0	Фактор сборки белков наружной мембраны (BamD)	Липопротеин	0,6	0,7	0,6	0,7	0,9	0,8	0,6	0,7	0,1

Таблица 4. Представлены известные белки, количественно определенные в каждой партии со средним содержанием >0,6% масс./масс. и обычно идентифицируемые во всех 7 партиях. ^(а) Из-за избыточности первичной последовательности количество белков Ora

является репрезентативным для семейства. ⁽⁶⁾ Локализация клеток, предсказанная с помощью PSORTb версии 3.0.2 и перепроверенная вручную для предсказания липопротеинов

59 белков, идентифицированных с помощью МС характеристики, использовали для определения схемы мультилокусного типирования (на уровне последовательности белка). Типировали все 4058 штаммов коллекции для присвоения идентификаторов аллелям белков для каждого штамма.

Как описано в Примере 1, эти расширенные профили использовали для измерения вариаций между штаммами и для измерения генетического расстояния. Оптимальное количество кластеров, полученных в результате анализа метрики силуэта, составляло 22 группы.

Как описано ранее, показатель центральности измеряет, насколько каждый штамм является центральным или периферийным в гонокковой популяции с точки зрения генетического расстояния. Центральность композиции OMV двойного мутанта FA1090 на основе генетического расстояния представлена на Фиг. 17). Показатели центральности для подмножества штаммов показаны в Таблице 5 ниже.

Таблица 5.

Штамм	Показатель центральности
FA1090 (1) Genbank	33,9
FA1090 (2)	32,2
F62	31
SK92-679	28,3
GC_0817560	25,1

Этот анализ согласуется с предыдущим анализом, проведенным на уровне всего генома (см. Пример 1). Более того, анализ также подтверждает, что по белковым компонентам OMV FA1090 FA1090 генетически удален от других штаммов коллекции.

Пример 13. Исследование способности OMV из мутантов FA1090 активировать TLR-4

Делеция гена *lpxII* приводит к появлению бактерий, которые продуцируют только пентаацилированный липид A и проявляют сниженную передачу сигналов toll-подобного рецептора 4 (TLR4) [Zhou X, Gao X, Broglie PM, et al. Hexa-acylated lipid A is required for host inflammatory response to *Neisseria gonorrhoeae* in experimental gonorrhoea. *Infection and*

Immunity. 2014 Jan;82(1):184-192].

Для оценки способности пентаацилированной формы липида А, экспрессируемой мутантом FA1090 $\Delta lpx11$ и мутантом FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$, активировать TLR4, OMV (обозначенные как GMMA на Фиг. 18), полученные из этих мутантов, а также OMV из штамма FA1090 дикого типа тестировали на клетках HEK293, стабильно трансфицированных человеческим TLR4 и репортерной плазмидой, экспрессирующей люциферазу под контролем NF- κ B.

Эти данные подтверждают, что и мутант FA1090 $\Delta lpx11$ (одиночный мутант или 1КО), и мутант FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (двойной мутант или 2КО) экспрессируют мутантную форму липида А, которая обладает сильно сниженной способностью активировать TLR4 по сравнению с той, которая экспрессируется штаммом FA1090 дикого типа. (см. Фиг. 18).

Пример 14: Сравнение роста в жидкой среде двойного мутанта FA1090 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$) с ростом в жидкой среде двойных мутантов ($\Delta lpx11, \Delta rmp$), полученных в других штаммах гонококков

Задачей данного эксперимента было прямое сравнение профилей роста ряда штаммов $\Delta lpx11, \Delta rmp$ в жидких культурах из чашек (не адаптированных к культивированию в жидкой среде). Способность двойных мутантных штаммов расти в жидких культурах была важна для оценки потенциала выбранного вакцинного штамма к масштабированию.

Двойные мутанты ($\Delta lpx11, \Delta rmp$) были созданы в штаммах FA1090, F62, SK92-679, BG13, BG17 и BG27, как описано в Примерах 3-4 и 7.

Осуществляли посев штрихом следующих штаммов на чашки со средой GC + изовиталекс 1% из музейных образцов, замороженных в глицерине.

1. FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (FA1090 $\Delta\Delta$)
2. F62 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (F62 $\Delta\Delta$)
3. SK92-679 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (SK92-679 $\Delta\Delta$)
4. BG13 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (BG13 $\Delta\Delta$)
5. BG17 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (BG17 $\Delta\Delta$)
6. BG27 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (BG27 $\Delta\Delta$)

Бактерии из музейного образца в глицерине набирали в микробиологическую петлю и осуществляли посев штрихом, чтобы получить отдельные колонии. Для каждого штамма готовили по 4 чашки. Чашки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 30 часов.

Для этого эксперимента готовили две разные среды:

1. GC + изовиталекс 1% + лактат 7,5 г/л (или GC + лактат): 3 г Na-(DL)лактат

(Sigma Aldrich) растворяли в 400 мл среды GC + изовиталекс 1% и стерилизовали фильтрованием с использованием 500 мл флакона с фильтром 0,22 мкм (Millipore).

2. MCDMI-mod (или MCDMI-5 г/л лактат): 1 л среды получали согласно прописи, приведенной ниже (Таблица 6): pH доводили до 7 при помощи NaOH и затем среду стерилизовали фильтрованием с использованием 1 л флакона с фильтром 0,22 мкм (Millipore)

Таблица 6.

<u>Состав среды (MCDMI-mod)</u>	
Компонент	Флакон (г/л)
Пептон соевый (BBL Phytone*)	15,00
NaCl	5,80
MgSO ₄ -7H ₂ O	2,56
K ₂ HPO ₄ -3H ₂ O	5,24
L-глутаминовая кислота	3,00
L-аргинин	0,20
L-серин	0,50
L-цистеин	0,30
L-глицин	0,25
Цитрат Fe(III)	0,01
CaCl ₂	0,02
Na-(DL)лактат	5,00
Бетаин-H ₂ O	0,34
Смесь витаминов – 0,5 г/л тиамин, 0,5 г/л рибофлавин, 0,5 г/л пиридоксин, 0,5 г/л ниацинамид (500x)	5x

Все штаммы ресуспендировали из чашек с агаром в 6 мл GC + лактат. Использовали только одиночные колонии.

Затем суспензии разбавляли в 50 мл среды GC+лактат и среды MCDMI-mod в одноразовых 250 мл колбах для встряхивания с дефлекторами с вентилируемой крышкой (Coming) до OD_{600nm} (оптическая плотность при 600 нм) приблизительно 0,3. Регистрировали начальную OD_{600nm} и инкубировали колбы при 37°C и встряхивании со скоростью 160 об/мин.

Мониторировали OD_{600nm} до достижения стационарной фазы.

В двух разных средах наблюдались разные характеристики роста (данные показаны на Фиг. 19).

- В GC с добавлением лактата плохой рост наблюдался только у F62ΔΔ и SK92-679ΔΔ. Рост других штаммов был успешным. В MCDMI F62ΔΔ показал лучшие результаты. В целом среда MCDMI оказалась подходящей для роста штаммов с двойными

мутациями F62 и FA1090 («ΔΔ» обозначает двойные мутанты), в то время как BG13ΔΔ и BG27ΔΔ были способны расти, но были ограничены с точки зрения скорости роста и выхода биомассы. Для BG17ΔΔ среда MCDMI-mod, по-видимому, не подходит для культивирования в жидкой среде. SK92-679ΔΔ показал нарушение роста в обеих протестированных средах.

Подводя итог,

- BG13ΔΔ и BG27ΔΔ можно культивировать в обеих средах, с решительным предпочтением среды на основе GC. Противоположная ситуация наблюдалась для F62 ΔΔ (решительное предпочтение среды MCDMI).
- BG17ΔΔ можно культивировать исключительно в среде на основе GC.
- SK92-672 ΔΔ демонстрирует нарушение роста в обеих протестированных средах, при этом небольшой рост наблюдается только в среде на основе GC.
- FA1090 ΔΔ можно культивировать в обеих средах, что делает его гибким штаммом для возможного масштабирования в будущем. Он показывает сопоставимую скорость роста в обеих протестированных средах. Однако, в зависимости от среды, другие двойные мутантные штаммы демонстрируют сопоставимый рост (F62ΔΔ в MCDMI-mod и BG13ΔΔ, BG17ΔΔ и BG27ΔΔ в GC + лактат).

Пример 15: Оценка продуктивности OMV прямым количественным определением OMV из культуральной надосадочной жидкости

С использованием шести штаммов $\Delta px11, \Delta rmp$ (использованных в Примере 14) оценивали продуктивность OMV:

Культуры осаждали при 4000 об/мин в течение 30 мин и надосадочную жидкость фильтровали с помощью фильтров stericup 0,22 мкм.

Продуктивность OMV оценивали для каждого штамма при двух условиях культивирования (описанных в Примере 14) с использованием флуоресцентного красителя FM4-64. Краситель флуоресцирует при интеркалировании в бислой мембраны. Интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству мембран в культуральной надосадочной жидкости (OMV) в диапазоне линейности, определяемом с помощью стандартной кривой. Для каждого образца краситель разбавляли 1:100 непосредственно в надосадочной жидкости образца. Стандартную кривую строили путем последовательного разведения очищенных OMV из FA1090 в той же среде, которая использовалась для культивирования, и с красителем FM4-64, разбавленным 1:100.

Для каждого образца регистрировали флуоресценцию с добавлением и без добавления красителя, а фоновую флуоресценцию надосадочной жидкости без красителя

вычитали из значений образцов, обработанных красителем. Также вычитали контрольный образец только со средой. Концентрацию OMV в культуральной надосадочной жидкости оценивали путем экстраполяции значения из стандартной кривой и представляли на Фиг. 20 как среднее значение двух биологических повторов для каждого штамма и условия культивирования.

Как показано на Фиг. 20А, объемная продуктивность OMV была выше в среде на основе GC, за исключением штамма F62 $\Delta\Delta$, что отражает достижение разными штаммами в двух средах различной биомассы. Неожиданно высокие значения были получены также для штамма SK92-679 $\Delta\Delta$, несмотря на очень слабый рост, наблюдаемый, в частности, в среде MCDMI. Наибольшей продуктивности достигал FA1090 $\Delta\Delta$ в среде на основе GC.

Для сравнения удельной продуктивности вычисленные значения также нормализовали к различным значениям OD₆₀₀нм, достигаемым каждым штаммом в каждом условии (см. Фиг. 20В). Что касается удельной продуктивности, штамм SK92-679 $\Delta\Delta$ показывает очень высокое значение, как и ожидалось, учитывая низкую OD₆₀₀нм, достигавшуюся в обеих средах, и относительно высокую зарегистрированную объемную продуктивность OMV. Однако неясно, обусловлены ли эти значения продуктивности фактическим высвобождением OMV или только клеточным дебрисом, неспецифически высвобождаемым в культуральную надосадочную жидкость.

Что касается других штаммов в среде на основе GC, диапазон продуктивности составляет 20-30 мг/л/OD для FA1090 $\Delta\Delta$, BG13 $\Delta\Delta$ и BG17 $\Delta\Delta$, в то время как он несколько выше для F62 $\Delta\Delta$ и ниже для BG27 $\Delta\Delta$. Аналогичная ситуация наблюдалась в среде MCDMI-mod, где большинство штаммов демонстрируют диапазон продуктивности 10-20 мг/л/ОП и несколько ниже для BG27 $\Delta\Delta$.

Поскольку мутанты FA1090 и F62 с двойной мутацией продемонстрировали хорошие показатели роста и были признаны наиболее продуктивными штаммами с точки зрения производства OMV (за исключением аномальных результатов SK92-679, которые были следствием низкой биомассы), OMV от этих двух штаммов отбирали для анализа иммуногенности.

Пример 16: Оценка иммуногенности OMV из мутантов FA1090

OMV получали из двойного мутанта FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (2KO), а также из аналогичных двойных мутантов $\Delta lpx11, \Delta rmp$ штамма F62 *N. gonorrhoeae*.

Иммуногенность этих OMV исследовали *in vivo* на мышах CD1.

Самок мышей CD1 в возрасте 7 недель иммунизировали два раза в дни 1 и 29 через внутрибрюшинный (в/б) путь введения указанными препаратами OMV (10 мкг),

приготовленными на квасцах (3 мг/мл), или только квасцами. Сыворотки собирали перед введением первой дозы вакцины (сыворотка до введения вакцины) и после введения второй дозы вакцины (сыворотка после введения второй дозы).

Функциональные антитела определяли при помощи бактерицидного теста с сывороткой человека (hSBA) и ингибирования бактериальной адгезии (BAI).

Метод hSBA

Осуществляли посев штрихом бактерий из замороженной аликвоты в круглую чашку с агаром GC+1% изовиталекс и инкубировали в течение 16 (± 2) часов при 37°C при 5% CO₂.

После инкубации колонии собирали, используя стерильную бактериальную петлю 10 мкл, и инокулировали в 10 мл бульона GC, содержащего 1% изовиталекс (предварительно нагретого до 37°C), с получением начального уровня оптической плотности (OD, 600 нм) 0,1. Затем бактериальную суспензию инкубировали при 37°C при легком встряхивании (180 об/мин) до достижения культурой OD_{600нм} $\approx 0,3-0,4$. Затем бактерии разводили 1:10000 в буфере SBA (DPBS, 1% BSA, 0,1% глюкозы).

Затем сыворотку мышей, инактивированную нагреванием, разбавляли буфером SBA до конечного объема в планшете 25 мкл/лунку. Затем добавляли 17 мкл/лунку разведенных бактерий и 8 мкл/лунку нормальной человеческой сыворотки. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°C при легком встряхивании. После проведения реакции по 7 мкл из каждой лунки высевали в плоскодонные планшеты с GC + 1% изовиталекс и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи.

После инкубации количество колоний в каждой лунке планшета подсчитывали вручную и регистрировали (колониеобразующие единицы, КОЕ) в каждой лунке каждого планшета. Планшеты анализировали с помощью прибора MACROLAB.

Отрицательные контроли представляли собой бактерии, исследуемые в присутствии инактивированного нагреванием комплемента и образца сыворотки для выявления потенциальной токсичности сыворотки, и бактерии, исследуемые в присутствии активного человеческого комплемента без образца сыворотки, для выявления потенциальной токсичности комплемента.

Бактерицидный титр рассчитывали как обратную величину разведения сыворотки, обеспечивающего 50% цитолиз по сравнению с контролем без сыворотки.

Метод BAI

День -4: Клетки SV-HUC-1 высевали (35000 клеток/лунку) в 96-луночный планшет в питательной среде F-12 +10% FBS.

День -1: Осуществляли посев штрихом бактерий из замороженной аликвоты на круглую чашку с агаром GC+1% изовиталекс и инкубировали в течение ночи при 37°C.

День 0:

Стадия 1) Получение бактерий: Бактерии выращивали до $A_{600\text{нн}} = 0,5$ в среде GC 1% изовиталекс. Затем бактерии окрашивали красителем oregon green, с достижением итоговой $A_{600} = 0,05$.

Для проведения окрашивания бактерии центрифугировали в течение 5 минут при 8000 об/мин, а затем ресуспендировали в 1 мг/мл oregon green, разбавленного 1:200 в PBS. Затем окрашенные бактерии инкубировали в течение 15 минут при 37°C, промывали в PBS и ресуспендировали в 1 мл PBS/2% BSA.

Стадия 2) Разведения сыворотки: В 96-луночном круглодонном планшете сыворотку разводили 1:100, а затем последовательно разбавляли (в зависимости от гомологичных или гетерологичных штаммов) для получения 10 точек разведения (от 1:100 до 1:51200 или от 1:100 до 1:1968300).

Стадия 3) Нейтрализация: Затем 60 мкл сыворотки + 60 мкл бактерий инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре.

Клетки промывали 3 раза в PBS перед добавлением сыворотки + бактерий (100 мкл/лунку) и затем инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После второй промывки (3 раза в PBS) клетки ресуспендировали в 4% формальдегиде в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте. После очередной промывки (1 раз в PBS) их ресуспендировали в 100 мкл H₂O на лунку.

Планшеты считывали на Opera Phenix (или хранили при +4°C в темноте). ВАИ рассчитывали как процент ингибирования бактериальной адгезии, индуцированного каждым разведением образца сыворотки, по сравнению с бактериями в отсутствие сыворотки следующим образом;

Для каждого образца j рассчитывали % ингибирования бактериальной адгезии при каждом разведении i следующим образом:

$$100 - \frac{\text{Объем всех бактерий [мкм}^3\text{]}_{ji}}{\text{средний объем бактерий, квасцы}} * 100$$

0% объем бактерий, равный среднему объему бактерий, наблюдаемому для образцов сыворотки при иммунизации квасцами.

100% объем бактерий, равный 0 – адгезии не наблюдается.

Результаты:

Измеряли hSBA в отношении штаммов FA1090, WHO-M, F62, MS11, WHO-N и

SK92-679 с использованием объединенных сывороток, собранных после двух иммунизаций, и человеческой сыворотки в качестве источника комплемента (Фиг. 21).

Результаты показывают, что в случае пяти из шести исследованных штаммов OMV (обозначены GMMA на Фиг. 21) из двойных мутантов FA1090 неожиданно оказались способны индуцировать более высокие титры SBA, по сравнению с титрами, которые были индуцированы OMV, полученными из аналогичного двойного мутанта $\Delta lpx11, \Delta rmp$ штамма F62. OMV из двойных мутантов как FA1090, так и F62 ($\Delta lpx11, \Delta rmp$) не были способны индуцировать бактерицидные титры в отношении штамма SK92-679.

BAI исследовали в отношении штаммов FA1090 (Фиг. 22A), SK-92-679 (Фиг. 22B) и WHO-M (Фиг. 22C) в объединенных сыворотках, собранных после двух иммунизаций.

Результаты показывают, что в случае всех протестированных штаммов OMV (обозначенные как GMMA на Фиг. 22) из FA1090 2КО индуцируют функциональные антитела, способные ингибировать адгезию бактерий к клеткам.

Пример 17. Оценка индукции антител против gmp с помощью OMV из мутантов FA1090

Самок мышей CD1 в возрасте 7 недель иммунизировали два раза в дни 1 и 29 IP 1 партией OMV из мутанта FA1090 $\Delta lpxL1$ (или 1КО) и двумя партиями OMV из FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$, двойного мутанта (или 2КО), приготовленными на квасцах (как описано выше).

Анти-gmp IgG измеряли с помощью анализа Luminex в объединенной сыворотке.

Результаты, показанные на Фиг. 23, демонстрируют, что хотя OMV (обозначенные как GMMA на Фиг. 23) из одиночного мутанта FA1090 $\Delta lpxL1$ (1КО) способны индуцировать продукцию антител против gmp, OMV из двойного мутанта FA1090 (2КО) не индуцируют анти-gmp IgG, дополнительно демонстрируя отсутствие этого белка в FA1090 2КО.

Пример 18. Делеция Rmp приводит к гонококку с усиленным блеббингом

Проводили десять ферментаций в масштабе 2 л. Три с FA1090 $\Delta lpxL1$ (прогоны №1–3) и семь со штаммом FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (2КО) (прогоны №4–10). Выход OMV рассчитывали на стадии концентрированной массы (CB), которая соответствует фракции OMV, полученной после последней стадии фильтрации (в способе, описанном в Примере 10). Данные представлено ниже в Таблице 7.

Таблица 7.

<u>Прогон</u>	<u>Штамм гонокка</u>	<u>OD590</u> <u>при</u> <u>сборе</u>	<u>Выход процесса</u> <u>на стадии</u> <u>концентрированн</u> <u>ой массы</u> <u>мг TP / л SNF</u>	<u>Продуктивность</u> <u>на OD</u>	<u>Средняя</u> <u>продуктивность</u> <u>на OD (STDEV)</u>
1	1KO FA1090 Δ lpx11	6,7	16	2,39	2,26 (0,14)
2	1KO FA1090 Δ lpx11	6,6	15	2,27	
3	1KO FA1090 Δ lpx11	7,1	15	2,11	
4	2KO FA1090 Δ lpx11, Δ Rmp	4,8	36	7,5	11,93 (3,86)
5	2KO FA1090 Δ lpx11, Δ Rmp	3,9	56	14,36	
6	2KO FA1090 Δ lpx11, Δ Rmp	4,3	36	8,37	
7	2KO FA1090 Δ lpx11, Δ Rmp	4,4	52	11,82	
8	2KO FA1090 Δ lpx11, Δ Rmp	3,0	57	19,00	
9	2KO FA1090 Δ lpx11, Δ Rmp	4,1	45	10,98	
10	2KO FA1090 Δ lpx11, Δ Rmp	5,5	63	11,45	

Δ lpx11 (одиночный мутант) достигает более высокой итоговой OD590 при сборе по сравнению с Δ lpx11, Δ rmp (двойной мутант), то есть $6,8 \pm 0,3$ в сравнении с $4,3 \pm 0,8$. Однако выход OMV, определенный в концентрированной массе, более чем удваивается для Δ lpx11, Δ rmp (двойной мутант) (49 ± 11 против 15 ± 1 мг белков/л отфильтрованного супернатанта). Следовательно, продуктивность (на OD) в 5,28 (2 dp) раза выше у двойного мутанта.

Пример 19. Последующее исследование иммуногенности на мышях CD1

Схема исследования: Самок мышей CD1 в возрасте от 7 до 8 недель (по 10 на группу) иммунизировали внутривенно (в/б) 3 раза в дни 1, 29 и 57 семью различными партиями OMV (обозначенными TRD4-TRD10) FA1090 2KO (Δ lpx11, Δ rmp) (10 мкг в 200 мкл), адсорбированных на квасцах (3 мг/мл), или только квасцами (200 мкл), или вакциной сравнения Вехсеро (200 мкл).

Вехсеро использовали в качестве вакцины сравнения благодаря наблюдениям, что

компонент везикул наружной мембраны менингококка группы В Bexsero способен перекрестно защищать от гонококковой инфекции (*Petousis-Harris H et al. Lancet 2017; 390:1603–1610*).

Партии OMV готовили, как описано ранее (см. Пример 10), за исключением того, что ферментации проводили в масштабе 2 л и в каждом прогоне для очистки OMV использовали аликвоту, соответствующую 400-550 мл отфильтрованной надосадочной жидкости.

Образцы крови брали перед 1-й вакцинацией (день 0), через 4 недели после 2-й вакцинации (4wp2) и через 2 недели после 3-й вакцинации (2wp3). Вагинальные смывы брали на 2wp3.

Анализ иммунного ответа проводили на объединенных сыворотках животных, иммунизированных всеми семью партиями OMV FA1090 2КО, исследуя 4wp2 и 2wp3. Более подробный и статистически мощный анализ иммунного ответа выполняли на одной сыворотке 2wp3 и вагинальных смывах 2wp3 от животных, иммунизированных тремя (TRD4, TRD5 и TRD9) из семи партий. TRD4, TRD5 и TRD9 выбирали на основе их чистоты (меньшее загрязнение белком GROEL) по результатам вестерн-блоттинга (данные не показаны).

Методы:

- **hSBA** измеряли, как описано в Примере 16. На основании генетического анализа, проведенного в Примере 12, отбирали десять гетерологичных штаммов (то есть выбирали панель штаммов, репрезентативных для различных генетических кластеров). Также отбирали штаммы, экспрессирующие различные варианты PorB следующим образом:

- **Штаммы PorB 1a** – SK92-679, WHO-F, WHO-G, WHO-N
- **Штаммы PorB 1b** – FA1090, F62, MS11, BG27, WHO-M, BG8. GC14

- Количественное определение IgG в сыворотке и вагинальных смывах или IgA в вагинальных смывах в ответ на вакцину-кандидата FA1090 2КО проводили с использованием **Luminex**, по существу, как описано ниже.

- Гранулы Luminex Magplex уравнивали при комнатной температуре и готовили к применению в соответствии с инструкциями производителя. Активированные и промытые гранулы инкубировали в течение 2 часов с 40 мкг/мл OMV FA1090 2КО (TRD9), суспендированных в 50 мМ MES, pH 5. В конце связанные гранулы дважды промывали PBS/0,05% Tween и хранили в 500 мкл PBS/0,05% Tween/0,5% BSA (буфер для анализа) при 4°C.

- При тестировании отдельных сывороток каждый планшет рассматривался как независимый тест и содержал 8 холостых лунок, 2 повтора стандартной сыворотки (STD) и 9 тестируемых сывороток. При тестировании отдельных вагинальных смывов каждый планшет рассматривался как независимый тест и содержал 10 холостых лунок, 2 повторения стандартной сыворотки (STD) и 10 тестируемых вагинальных смывов.

- Сыворотки и STD предварительно разбавляли в буфере для анализа, затем выполняли 8 последовательных стадий 3-кратных разведений в 96-луночном планшете для микротитрования (конечный объем 50 мкл/лунку). В случае вагинальных смывов анализировали 7 последовательных 3-кратных разведений.

- Готовили гранулы, связанные с OMV FA1090 2KO TRD9, для внесения по 3000 гранул/лунку. Непосредственно перед внесением в планшет гранулы перемешивали на вортексе в течение приблизительно 20 секунд, затем добавляли 50 мкл к предварительно разбавленной сыворотке в конечном объеме 100 мкл на лунку.

- Планшеты инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте на встряхивателе для планшетов при 700 об/мин и после инкубации несвязавшиеся антитела удаляли путем трехкратного промывания планшетов 200 мкл PBS (промывочный буфер).

- Для детекции специфических анти-OMV IgG в каждую лунку затем загружали 50 мкл 2,5 мкг/мл R-Phycoerythrin-AffiniPure F(ab')₂ фрагмента козьего антитела к IgG мыши, специфичного к фрагменту Fc γ (Jackson Immunoresearch 115-116-071), в PBS pH 7,2, 0,05% Tween 20, 0,5% BSA и планшеты инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте на встряхивателе для планшетов при 700 об/мин.

- Для специфического обнаружения анти-OMV IgA в каждую лунку затем загружали 50 мкл 5 мкг/мл R-Phycoerythrin козьего антитела к IgA мыши (Southern Biotech 1040-09) в PBS, pH 7,2, 0,05% Tween 20, 0,5% BSA и планшеты инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте на встряхивателе для планшетов при 700 об/мин.

- После промывания гранулы суспендировали в 100 мкл PBS и встряхивали перед анализом с применением Bioplex 200. Данные получали в режиме реального времени с помощью программного обеспечения Bioplex Manager 6.2 (BioRad), которое также использовали для подбора модели стандартной кривой.

Результаты: Иммунизация мышей CD1 кандидатной вакциной OMV FA1090 2KO, адсорбированных на квасцах, приводила к индукции:

- Сопоставимых титров hSBA против гомологичного штамма FA1090 в объединенных сыворотках 4wp2 и 2wp3 в случае всех исследованных партий вакцины OMV

FA1090 2КО (7 партий) — см. **Фиг. 24**.

- Титров SBA с человеческим комплементом (hSBA) против гомологичного штамма FA1090 и 8 из 10 исследованных гетерологичных штаммов в отдельных сыворотках 2wp3, которые были статистически значимо выше в случае всех исследуемых партий OMV FA1090 2КО (3 партии) по сравнению с квасцами и Vexsero — см. **Фиг. 25**.

- Сопоставимых титров специфических анти-OMV IgG в объединенных сыворотках 4wp2 и 2wp3 в случае всех исследуемых партий вакцины OMV FA1090 2КО (7 партий) — **Фиг. 26**

- Титров анти-OMV IgG в отдельных сыворотках 2wp3 (**Фиг. 27**) и в вагинальных смывах (**Фиг. 28А** и **Фиг. 28В**), которые были статистически значимо выше в случае всех 3 исследуемых партий OMV FA1090 2КО по сравнению с квасцами и Vexsero;

- Титров анти-OMV IgA в вагинальных смывах, которые были статистически значимо выше в случае всех 3 исследуемых партий OMV FA1090 2КО по сравнению с квасцами и Vexsero — **Фиг. 29А** и **Фиг. 29В**

Вывод: Демонстрация функционального иммунного ответа, способного блокировать различные иммунологические механизмы, и превосходство по сравнению с коммерческой вакциной Vexsero является важным доказательством в поддержку вакцины-кандидата OMV FA1090 2КО (*Δlpx11, Δrmp*).

Вакцина OMV FA1090 2КО была способна индуцировать статистически более высокие бактерицидные титры (по сравнению как с квасцами, так и с Vexsero) против гомологичного штамма FA1090 и большинства исследованных гетерологичных штаммов.

Иммуногенный ответ по результатам анализа сыворотки мышей и вагинальных смывов с применением Lumiplex продемонстрировал значительную индукцию специфических антител к OMV. В частности, вакцина OMV FA1090 2КО была способна индуцировать более высокие титры анти-OMV IgG с GMR >2 (LL 95% CI) по сравнению с квасцами и Vexsero как в сыворотке, так и в вагинальных смывах, а также титры анти-OMV IgA с GMR >2 (LL 95% CI) по сравнению с квасцами и Vexsero в вагинальных смывах.

Наконец, данные на мышцах (представленные в Примере 16) продемонстрировали способность вакцины-кандидата OMV FA1090 2КО индуцировать антитела, которые ингибируют адгезию трех различных штаммов гонококков (гомологичный штамм FA1090 и два выбранных гетерологичных штамма) к первичным клеткам мочевого пузыря линии SVHUC-1, репрезентативным для эпителия мочевыводящих путей.

В совокупности эти доклинические результаты подтверждают иммуногенность вакцины-кандидата OMV FA1090 2КО, адсорбированной на квасцах.

Пример 20: Сравнение вакцинного штамма FA1090 и GC_0817560

Задача: Получение белковой последовательности из общедоступных и секвенированных собственными силами геномов наиболее распространенных белков, присутствующих в OMV FA1090 2КО (см. Пример 12), и сравнение белковой последовательности и разнообразия наиболее распространенных белков, присутствующих в OMV из штамма FA1090 2КО (*Δlpx11, Δrmp*) и штамма GC_0817640, и характеристика фазово-вариабельных путей, контролирующей экспрессию функционального OpaB.

Материалы и методы

Сборка генома FA1090_2КО: Геном штамма FA1090 2КО, использованного в Примерах, представленных в настоящем документе (*Δlpx11, Δrmp*), секвенировали, как описано в Примере 9. Необработанные данные из двух циклов секвенирования объединяли и собирали вместе для получения окончательной, закрытой и полной сборки хромосомы и дополнительной короткой плазмиды, всего 2 161 273 п.н.

Сборка генома GC_0817560: Последовательность генома (на уровне контигов) штамма *Neisseria gonorrhoeae* GC_0817560 была общедоступна в базе данных PubMLST. Доступная последовательность не является закрытой и состоит из 151 контига общей длиной 2 154 632 п.н. База данных также ссылалась на исходные необработанные данные Illumina, доступные в Европейском архиве нуклеотидов (ENA) с идентификационным номером ERR349896.

Идентификация белковой последовательности наиболее распространенных белковых компонентов GMMA: Как описано в Примере 12, основные белковые компоненты составляли >80% белковой массы OMV. Наиболее распространенными белками были: **PorB** и белки семейства **Opa**.

Идентификация гена PorB в FA1090 2КО, GC_0817560 и других общедоступных геномах: Последовательность белка PorB извлекали с помощью поиска гомологии BLAST на уровне последовательности ДНК и белка. Поиски проводились с помощью программного обеспечения Bigsdb на основе поиска гомологии BLAST. Предполагаемые положения начала и конца последовательности генов для PorB соответствуют положениям, аннотированным в базе данных PubMLST (локус гена NEIS2020, геномный идентификатор FA1090 NGO1812).

Программное обеспечение Bigsdb позволяло идентифицировать положение локусов в последовательностях генома и присваивать уникальные идентификаторы генов и белков для этих локусов в каждом геноме. Множественное выравнивание белковой последовательности всех гонококковых штаммов, доступных на сегодняшний день в базе

данных PubMLST, осуществляли для PorB с помощью программного обеспечения MUSCLE. Реконструкции филогении белков выполняли с применением программного обеспечения MEGA методом NJ и р-расстояния между последовательностями.

Графическое изображение белковых последовательностей, извлеченных из геномов FA10902КО и GC_0817560, получали с помощью программного обеспечения BioEdit. Варибельные кодоны выделяли цветом согласно матрице расстояний идентичности/сходства Blosum62 (варибельные кодоны отмечали черным цветом, варибельные кодоны со схожими физико-химическими свойствами отмечали прямоугольниками, как было установлено с применением матрицы Blosum62 и программного обеспечения BioEdit).

Идентификация генов Ора в геноме FA1090 2КО: Аннотацию генома штамма *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 (идентификационный номер NC_002946 в базе данных GenBank Refseq) использовали для аннотации генов на закрытый геном FA1090 2КО (*Δlpx11, Δrmp*), который секвенировали собственными силами. Последовательности генов извлекали с помощью функции Bedtools getfasta, а затем для получения наиболее близких совпадений использовали BLAST.

Идентификация генов Ора в геноме GC_0817560: Идентификацию локусов в геноме GC_0817560 проводили по существу так же, как и для генома FA1090 2КО, начиная с последовательностей, извлеченных из генома FA1090 2КО, плюс их фланкирующие области (1000 нуклеотидов в направлении против хода и по ходу транскрипции). Эти последовательности использовали для определения точного местоположения генов при помощи BLAST. Этот подход также дополняли поиском в геноме GC_0817560 положения фланкирующих генов, которые были аннотированы в направлении против хода и по ходу транскрипции относительно каждого гена Ора.

Количественная оценка популяции для ораВ: Процесс анализа, который использовали для оценки количества бактерий в популяции, имеющих последовательность, которая транслировалась в полную версию белка, начинается с картирования прочтений, полученных путем секвенирования Illumina, на закрытую геномную последовательность генома FA1090 2КО.

В данном Примере использовали следующие образцы:

- FA1090_wild-type (штамм FA1090 дикого типа без генетических модификаций)
- FA1090_2КО_adapted (*(Δlpx11, Δrmp)*)
- Прочтения GC_0817560, загруженные из ENA (id: ERR349896)

- Другие штаммы: включая последовательности F62, SK92-679, WHO-F и WHO-G, а также общедоступные последовательности WHO-M и WHO-N, загруженные из ENA (id: ERR352751 и ERR388420 для WHO-M и ERR363586 для WHO-N)

Для картирования применяли алгоритм Burro ws-Wheeler Aligner (BWA) mem с параметрами по умолчанию, поскольку в нем автоматически используются парноконцевые прочтения с длинными вставками и каждому прочтению присваивается единственное положение в геноме. Эти две характеристики особенно важны для точного выравнивания прочтений в генах, которые имеют очень похожие паралоги. После выравнивания полученные файлы отсортировывали и индексировали с помощью пакета samtools. Для извлечения всех прочтений, совпадающих с интересующими областями, использовали R скрипт посредством итерации samtools tview до тех пор, пока референсная последовательность (после удаления пробелов) не достигала длины короткой повторяющейся последовательности (SSR) в закрытом геноме плюс два фланкирующих основания. После этого скрипт удалял прочтения, которые не полностью покрывали область, а затем суммировал длину SSR, наблюдаемую в каждом прочтении.

Скрипт трансляции осуществлял сборку последовательности этого локуса, путем объединения:

- Последовательности, извлеченной из генома FA1090 2КО, от стартового кодона до начала SSR.
- Последовательности SSR, вырезанной из каждого выровненного прочтения, охватывающей всю SSR.
- Последовательности, извлеченной из генома FA1090 2КО от конца SSR до стоп-кодона.

Каждая собранная последовательность затем транслировалась с использованием специальной функции из пакета seqinR, и вычислялось процентное соотношение популяции в фазе ON/OFF.

Результаты

PorB : PorB является наиболее распространенным белком в OMV штамма FA1090_2КО (см. Пример 12). Общее разнообразие молекулы PorB *Neisseria gonorrhoeae* представлено в филогенетическом дереве на Фиг. 30.

Прямое сравнение белковых последовательностей PorB из FA1090_2КО и GC_0817560 представлено в выравнивании белковых последовательностей на Фиг. 31, где внеклеточные переменные петли (1-8) идентифицированы по классификации PubMLST.

Молекулы, содержащиеся в двух штаммах, классифицировали как аллельные формы

PorB IV. На Фиг. 31 показано, что разнообразие PorB между двумя штаммами в основном сосредоточено во внеклеточной петле 5, 6 и 7. Функциональная роль внеклеточных петель для молекулы PorB гонококка глубоко изучалась (Infect Immun. 2013 Dec; 81(12): 4383–4391) и, в частности, было показано, что петли 4-7 связывают регуляторный фактор комплемента C4bp и играют роль в вариациях устойчивости к опосредованному сывороткой цитолизу.

Ора: В штамме FA1090 2КО идентифицировали 11 локусов Ора (см. Таблицу 8). Большинство из них находились в состоянии OFF фазовой вариации в консенсусной последовательности. Для ораD, последовательность которого в общедоступных базах данных имеет состояние ON, в образце, который секвенировали собственными силами, последовательность имела состояние OFF. В штамме 2КО FA1090 преобладает ораВ.

Таблица 8. Идентифицированные координаты локусов Ора в геноме FA1090 2КО

Хромосома	Старт	Конец	Ген	Цепь
1	69142	69956	ораА	-
1	74894	75692	ораВ	-
1	1000502	1001347	ораС	-
1	1483931	1484763	ораD	+
1	1833181	1834022	ораЕ	-
1	925679	926526	ораF	+
1	2039329	2040161	ораG	-
1	1533814	1534603	ораH	+
1	1428325	1429157	ораI	-
1	1035967	1036736	ораJ	+
1	1232206	1233036	ораK	+

Этот анализ успешно оценил долю бактерий в секвенированной популяции, в результате чего получали полные аминокислотные последовательности ораВ.

ораВ является вторым наиболее распространенным антигеном в OMV гонококка FA1090, и почти вся популяция экспрессирует последовательность, которая может быть транслирована в полный белок как в FA1090 WT (89%), так и в 2КО (медиана 96%). Напротив, GC_0817560, а также другие штаммы, о которых сообщалось в этом анализе, имеют более низкое количество полного белка, составляющее 20% и медианное значение 19%, соответственно (см. Фиг. 32).

Заключение

Эти данные показывают, что последовательности PorB двух проанализированных штаммов различаются областями петель, и ожидается, что функциональный белок OraB будет менее распространен в штамме GC_0817560 по сравнению с FA1090 2КО (*Alpx11, Armp*).

PorB и OraB являются двумя наиболее распространенными белками, присутствующими в ОМV гонококка.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 – нуклеотидная последовательность *Rmp* FA1090

ATGACCAAACAGCTGAAATTAAGCGCATTATTCGTTGCATTGCTCGCTTCCGGCACTGCT
GTTGCGGGCGAGGCGTCCGTTACAGGGTTACACCGTAAGCGGCCAATCGAACGAAATCGT
ACGCAACAACSTATGGAGAATGCTGGAAAAACGCCTACTTTGATAAAGCAAGCCAAGGT
CGCGTAGAATGCGGCGATGCGGTTGCCGTCCCGGAGCCCGAACCCGCGCCTGTGCGCCGT
TGTGGAGCAGGCTCCTCAATATGTTGATGAAACCATTTCCCTGTCTGCCAAAACCCTGTT
CGGTTTCGATAAGGATTCATTGCGCGCCGAAGCTCAAGACAACCTGAAAGTATTGGCGC
AACGCCTGAGTCGAACCAATGTCCAATCTGTCCGCGTCGAAGGCCATACCGACTTTATG
GGTTCTGAAAAATACAATCAGGCTCTGTCCGAACGCCGCGCATAACGTAGTGGCAAACAA
CCTGGTCAGCAACGGCGTACCTGCTTCTAGAATTTCTGCTGTGCGGCTTGGGGCAATCTCA
AGCGCAAATGACTCAAGTTTGTCAAGCCGAAGTTGCCAAACTGGGTGCGAAAGCCTCTA
AAGCCAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCATGTATCGAACCTGACCGCCGCGTAGATGTG
AAAATCCGCAGCATCGTAACCCGTCAGGTTGTGCCGGCACGCAATCATCACCAACAATA
A

SEQ ID NO: 2 – белковая последовательность *Rmp* FA1090

MTKQLKLSALFVALLASGTAVAGEASVQGYTVSGQSNEIVRNNYGECWKNAYFDKASQGR
VECGDAVAVPEPEPAPVAVVEQAPQYVDETISLSAKTLFGFDKDSLRAEAQDNLKVLQRL
SRTNVQSVRVEGHTDFMGSEKYNQALSERRAYVVANNLVSNGVPASRISAVGLGESQAQM
TQVCQAEVAKLGAKASKAKKREALIACIEPDRRVDVKIRSIVTRQVVPARNHHQH

SEQ ID NO: 3 - нуклеотидная последовательность *lpx11* FA1090

ATGAAATTTATATTTTTTGTACTGTATGTTTTGCAGTTTCTGCCGTTTGCCTGCTGCACA
AGATTGCCGGCCTGATCGGTTGCTTGCCTACCTTCTGGTCAAACCGCGCCGCGTATCG
GCGAAATCAATTTGGCAAAATGTTTTCCCGAATGGGACGAAGAAAAGCGTAAAACCGT
GTTGAAACAGCATTTCAAACACATGGCAAAACTGATGCTCGAATACGGCTTATATTGGT
ACGCGTCTGCCAAATGCCTGAAATCGCTGGTGCCTACCGCAATAAGCATTATTTGGAC
GACGCGCTGGCGGCGGGGAAAAAGTCATCATCCTGTACCCGCACTTTACCGCGTTCGA
GATGGCGGTGTACGCGCTTAATCAGGATGTCCCGCTGATCAGTATGTATTTCCACAAA
AAAACAAGATATTGGACGAACAGATTTTGAAGGCCGCAACCGCTATCACAACGTCTTC

CTTATCGGGCGCACCGAAGGGCTGCGCGCCCTCGTCAAACAGTTCGCGAAAAGCAGTGC
 GCCGTTCTGTATCTGCCCGATCAGGATTTCCGACGCAACAATTCGGTTTTTGTGGATTT
 TTTCGGCATTACAGACGGCAACGATTACCGGCTTGAGCCGCATTGCCGCGCTTGCAAATG
 CAAAAGTGATAACCCGCCATTCCCGTCCGCGAGGCGGACAATACGGTTACATTGCAATTC
 TATCCCGCTTGGAATCCTTTCCGAGTGAAGACGCGCAAGCCGACGCGCAACGTATGAA
 CCGCTTTATCGAAGAACGCGTGCGCGAACACCCGGAACAATATTTCTGGCTGCACAAGC
 GTTCAAACCCGTCCGGAAGGCAGCCCCGATTTTTACTGA

SEQ ID NO: 4 – белковая последовательность *Lpx11* FA1090

MKFIFFVLYVLQFLPFALLHKIAGLIGSLAYLLVKPRRRIGEINLAKCFPEWDEEKRKTVLKQ
 HFKHMAKLMLEYGLYWYASAKCLKSLVRYRNKHYLDDALAAGEKVIIYPHFTAFEMAV
 YALNQDVPLISMYSHQKNKILDEQILKGRNRYHNVFLIGRTEGLRALVKQFRKSSAPFLYLP
 DQDFGRNNSVFDFFGIQTATITGLSRIAALANAKVIPAIPVREADNTVTLQFYPAWKSFPSE
 DAQADAQRMNRFIEERVREHPEQYFWLHKRFKTRPEGSPDFY

SEQ ID NO: 5 – локус *Lpx11* (соответствующий Фиг. 12)

CCGGCATCGACGCTGATGCTCGGTCAGGCGCGCGGAGCGGCATTGGCGGCTTTGGTCAG
 CCATAAGCTGCCCGTTTCGGAATACACGGCCTTGCAAGTCAAACAGGCGGTGGTCCGGCA
 AAGGCAAGGCGGCGAAAGAACAGGTGCAGCATATGGTGGTGCAAATGCTGGGACTTTC
 GGGAACGCCGAGGCGGATGCGGCGGACGGTCTTGCCGTCGCGCTGACCCACGCCTTAC
 GCAACCACGGGCTTGCCGCCAAACTCAATCCTTCGGGGATGCAGGTCAAGCGCGGAAG
 GTTCAATAGTTTCAGACGGCATTGTATTTTGCCGCCTGAAAAGAAAATGTGTACCGAG
 ATGAAATTTATATTTTTGTACTGTATGTTTTGCAGTTTCTGCCGTTTGCCTGCTGCACA
 AGATTGCCGGCCTGATCGGTTTCGCTTGCCCTACCTTCTGGTCAAACCGCGCCGCGTATCG
 GCGAAATCAATTTGGCAAATGTTTTCCCGAATGGGACGAAGAAAAGCGTAAAACCGT
 GTTGAACAGCATTTCAAACACATGGCAAACACTGATGCTCGAATACGGCTTATATTGGT
 ACGCGTCTGCCAAATGCCTGAAATCGCTGGTGCCTACCGCAATAAGCATTATTTGGAC
 GACGCGCTGGCGGCGGGGAAAAGTCATCATCCTGTACCCGCACTTTACCGCGTTCGA
 GATGGCGGTGTACGCGCTTAATCAGGATGTCCCGCTGATCAGTATGTATTTCCACAAA
 AAAACAAGATATTGGACGAACAGATTTTGAAGGCCGCAACCGCTATCACAACGTCTTC
 CTTATCGGGCGCACCGAAGGGCTGCGCGCCCTCGTCAAACAGTTCGCGAAAAGCAGTGC
 GCCGTTCTGTATCTGCCCGATCAGGATTTCCGACGCAACAATTCGGTTTTTGTGGATTT
 TTTCGGCATTACAGACGGCAACGATTACCGGCTTGAGCCGCATTGCCGCGCTTGCAAATG
 CAAAAGTGATAACCCGCCATTCCCGTCCGCGAGGCGGACAATACGGTTACATTGCAATTC
 TATCCCGCTTGGAATCCTTTCCGAGTGAAGACGCGCAAGCCGACGCGCAACGTATGAA
 CCGCTTTATCGAAGAACGCGTGCGCGAACACCCGGAACAATATTTCTGGCTGCACAAGC
 GTTCAAACCCGTCCGGAAGGCAGCCCCGATTTTTACTGACTACATAAAATTACAAA
 CAAATCAGGCGTTTCAGATCAAAAACCCCGATTGTTTTTGGGAATTTGAAACCCGGT

GTACAAACAGGATTTGCCGGACGGTTTTAACGGTTCAGTTGTTTGTAAAAACAATGCTTT
 TTTAAAATTGACAAAAACGAAATCGGTTTTAAAGGCTTATTCCGAGAACAAAGGGGAG
 TGGATGCCGAAAACCCGGTTAATATATTATAGTGGATTAACAAAAACCAATACGGCGTT
 GCTTCGCCTTAGCTCAAAGAGAACGATTCCCTAAGGTGCTGAAGCACCAAGCGAATCGG
 TTCCGTAATAATTTGTAAGTGTCTGCGGCTTCGCCGCCTTGTCTGATTTTTGTTAATCCACT
 ATAAAATTAATTTGTTTAAAAACATAAAGTTGTAACAAGTATCTCATATAAGCCTTTT
 TCATTAACAGATAGTCAGATATTTTGTGCTAAAAATTTATATAATTTAAATTAATAT
 CAAGTTATAAAAAATATATGGAATTTTATTTTGTTTATTTATAATTTTAAGCA

SEQ ID NO: 6 – локус *Lpx11*, извлеченный из штамма FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (соответствующий Фиг. 13)

CCGGCATCGACGCTGATGCTCGGTCAGGCGCGCGGAGCGGCATTGGCGGCTTTGGTCAG
 CCATAAGCTGCCCGTTTCGGAATACACGGCCTTGCAGGTCAAACAGGCGGTGGTCGGCA
 AAGGCAAGGCGGCGAAAGAACAGGTGCAGCATATGGTGGTCAAATGCTGGGACTTTC
 GGGAACGCCGCAGGCGGATGCGGCGGACGGTCTTGCCGTCGCGCTGACCCACGCCTTAC
 GCAACCACGGGCTTGCCGCCAAACTCAATCCTTCGGGGATGCAGGTCAAGCGCGGAAG
 GTTCAATAGTTTCAGACGGCATTGTATTTTGCCGTCTGAAAAGAAAATGTGTATCGAG
 ATGAAATTTATATTTTTTGTACTGTATGTTTTGCAGTTTCTGCCGTTTGCCTGCTGCACA
 AGATTGCCGACCTGACGGGTTTGCTTGCTACCTTCTGGTCAAACCGCGCCGCGTATCG
 GCGAAATCAATTTGGCAAAATGTTTTTCCGAATGGAGTGAGGAAAAGCGTAAAACCGTG
 TTGAAACAGCATTTCAAACACATGGCGAAACTGATGTTGGAATACGGTTTATATTGGTA
 CGCGCCTGCCGGACGTTTGAAATCGCTGGTGCGCTACCGCAATAAGCATTATTTGGACG
 ACGCGCTGGCGGCGGGGAAAAGTCATCATCCTGTATCCGCACTTCACCGCTGCAGTT
 GCAGTGACTAACTAGGAGGAATAAATGGCTAAAATGAGAATATCACCGGAATTGAAAA
 AACTGATCGAAAAATACCGCTGCGTAAAAGATACGGAAGGAATGTCTCCTGCTAAGGTA
 TATAAGCTGGTGGGAGAAAATGAAAACCTATATTTAAAAATGACGGACAGCCGGTATA
 AAGGGACCACCTATGATGTGGAACGGGAAAAGGACATGATGCTATGGCTGGAAGGAAA
 GCTGCCTGTTCCAAAGGTCCTGCACTTTGAACGGCATGATGGCTGGAGCAATCTGCTCAT
 GAGTGAGGCCGATGGCGTCCTTTGCTCGGAAGAGTATGAAGATGAACAAAGCCCTGAA
 AAGATTATCGAGCTGTATGCGGAGTGCATCAGGCTCTTCACTCCATCGACATATCGGAT
 TGTCCTTATACGAATAGCTTAGACAGCCGCTTAGCCGAATTGGATTACTTACTGAATAAC
 GATCTGGCCGATGTGGATTGCGAAAACCTGGGAAGAAGACACTCCATTTAAAGATCCGCG
 CGAGCTGTATGATTTTTTAAAGACGGAAAAGCCCAGAGGAACTTGTCTTTTCCACG
 GCGACCTGGGGGACAGCAACATCTTTGTGAAAGATGGCAAAGTAAGTGGCTTTATTGAT
 CTTGGGAGAAGCGGCAGGGCGGACAAGTGGTATGACATTGCCTTCTGCGTCCGGTTCGAT
 CAGGGAGGATATCGGGGAAGAACAGTATGTCGAGCTATTTTTTACTTACTGGGGATCA
 AGCCTGATTGGGAGAAAATAAATACTATATTTTACTGGATGAATTGTTTTAGTACCTGG
 AAGGAATAATGAGTCGACAGGATTTCCGGACGCAACGATTCGGTTTTTGTGGATTTTTTCG

GTATTCAGACGGCAACGATTACCGGATTGAGCCGCATTGCCGCGCTTGCAAATGCAAAA
GTGATACCCGCCATTCCCGTCCGCGAGGCAGACAATACGGTTACATTGCATTTCTATCCC
GCTTGAAATCCTTTCCGGGTGAAGACGCGAAAGCCGACGCGCAGCGCATGAACCGTTT
TATCGAAGACAGGGTGCGCGAACATCCGGAACAATATTTTTGGCTGCACAAGCGTTTTA
AAACCCGTCCGGAAGGCAGCCCCGATTTTTACTGACTACATAAAAATTACAAAACAATC
AGGCGTTTCAGATCAAAAACCCCGATTGTTTTTGGGAATTTGAAACCCGGGTTGTACAA
ACAGGATTTGCCGGACGGTTTTAACGGTTCAGTTGTTTGTAAAAACAATGCTTTTTTAA
ATTGACAAAAACGAAATCGGTTTTAAAGGCTTATTCGAGAACAAGGGGAGTGGAT
GCCGAAAACCCGGTTAATATATTATAGTGGATTAACAAAAACCAATACGGCGTTGCTTC
GCCTTAGCTCAAAGAGAACGATTCCCTAAGGTGCTGAAGCACCAAGCGAATCGGTTCCG
TACTATTTGTA CTGTCTGCGGCTTCGCCGCTTGTCTGATTTTTGTTAATCCACTATAAA
ATTAATTTGTTTTAAAAACATAAAGTTGTAACAAGTATCTCATATAAGCCTTTTTTATT
AAACAGATAGTCAGATATTTTGTGCTAAAAATTTATATAATATTTAAATTAATATCAAGT
TATAAAAAATATATGGAATTTTATTTTGTATTATTTATAATTTTAAGCA

SEQ ID NO: 7 – локус Rmp (соответствующий Фиг. 14)

CAACGGCAATCGTGCGATATGGAAAAATCCCCCTAAAGTAATGACACGGAATTGATTT
TTCGGCATGATAGACTATCAGGAAACAGGCTGTTTTACGGTTGTTTTACGGCGTTGAGTA
TTGACAGTCCGCCCCCTGTTTCTTTATAGTGGAGACTGAAATATCCGATTTGCCGCCATG
TTTTCTACAGCGGCCTGTATGTTGGCAATTCAGCAGTTGCTTCTGTATCTGCTGTACAAAT
CTAATGAGGGAATAAAATGACCAAACAGCTGAAATTAAGCGCATTATTCGTTGCATTGC
TCGCTTCCGGCACTGCTGTTGCGGGCGAGGCGTCCGTTACAGGGTTACACCGTAAGCGGC
CAATCGAACGAAATCGTACGCAACAACCTATGGAGAATGCTGGAAAAACGCCTACTTTGA
TAAAGCAAGCCAAGGTCGCGTAGAATGCGGCGATGCGGTTGCCGTCCCCGAGCCCGAA
CCC GCGCTGTGCGCGTTGTGGAGCAGGCTCCTCAATATGTTGATGAAACCATTTCCCTG
TCTGCCAAAACCCTGTTGCGTTTCGATAAAGGATTCATTGCGCGCCGAAGCTCAAGACAA
CCTGAAAGTATTGGCGCAACGCCTGAGTCGAACCAATGTCCAATCTGTCCGCGTCAAG
GCCATAACCGACTTTATGGGTTCTGAAAAATACAATCAGGCTCTGTCCGAACGCCGCGCA
TACGTAGTGGCAAACAACCTGGTCAGCAACGGCGTACCTGCTTCTAGAATTTCTGCTGTC
GGCTTGGGCGAATCTCAAGCGCAAATGACTCAAGTTTGTCAAGCCGAAGTTGCCAAACT
GGGTGCGAAAGCCTCTAAAGCCAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCATGTATCGAACCTG
ACCGCCGCGTAGATGTGAAAATCCGCAGCATCGTAACCCGTCAGGTTGTGCCGGCACGC
AATCATCACCAACACTAAGGCTAGGTAATATCTTGCCGATGCATGAGGTTAGCGGATTT
TGTAACCGGGTACTGTTGCAATATTCGTGAAACGTCGGCCGGTATCGATGATGTGAAACA
AACCCCGCTTTTGCGGGGTTTTGTTTTTTTTGGGTGGTTTTCTGAAACGGCTATCGTCAGAA
TCGGGGTGCAGGTTCCGATTCGGATTCAGATTCATGTTTGTGTCCCATTTGCCGCGCTTTA
TAGTGGATTAACAAAAATCAGGACAAGGCGACGAAGCCGCAGACAGTACAATAGTACG
GCAAGGCGAGGCAACGCCGTACCGGTTTAAATTTAATCCACTATATCGGTTGAAACTCT

GATTTTAAGGCGGTAGGATGTGGGTTTGCCCATAGCAAGGGAATCCTTTCTGTATCAAG
CCCCGAAAGGGATAATTCATACAAATTCACGCCTTTCCCCTCATTGGGAAATGGATGG
AATCGTGCCCGATGTGTGCGGCACTGTATGCCGGATATGGTTTTATCATCATCCCT

SEQ ID NO: 8 – локус *Rmp*, извлеченный из штамма FA1090 $\Delta lpx11, \Delta rmp$ (соответствующий Фиг.15)

CAACGGCAATCGTGCGATATGGAAAAAATCCCCCTAAAGTAATGACACGGAATTGATTT
TTCGGCATGATAGACTATCAGGAAACAGGCTGTTTTACGGTTGTTTTACAGGCGTTGAGCC
CGGGACCTCTTTAGCTTCTTGGAAGCTGTCAGTAGTATATCTAATAATTTATCTCCATTC
CCTTTAGTAACGTGTAACCTTTCCAAATTTAAAAAAGCGACTCATAGAATTAATTCCTCCC
GTAAATAATAGATAACTATTA AAAATAGACAATACTTGCTCATAAGTAATGGTACTTA
AATTGTTTACTTTGGCGTGTTCATTGCTTGATGAACTGATTTTTAGTAAACAGTTGAC
GATATTCTCGATTGACCCATTTTGAAACAAAGTACGTATATAGCTTCCAATATTTATCTG
GAACATCTGTGGTATGGCGGGTAAGTTTTATTAAGACACTGTTTACTTTTGGTTTAGGAT
GAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGCAATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGC
AACCTAGTGTTCCGGTGAATATCCAAGGTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGA
TAGATGTCAGACGCATGGCTTTCAAAAACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGG
TAAGGAATACTCCCAACAATTTTATACCTCTGTTTGTTAGGGAATTGAAACTGTAGAATA
TCTTGGTGAATTAAGTGACACGAATGTTCAAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAAT
AGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTTACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCGTTA
AATGCCCTTTACCTGTTCCAATTTTCGTAACGGTATCGGTTTCTTTTAAATTC AATTGTTT
TATTATTTGGTTGAGTACTTTTTCACTCGTTAAAAAGTTTTGAGAATATTTTATATTTTG
TTCATGTAATTA CTCTGAAGTGATTACATCTGTAATAAATACAGAAGTTAAACGATTT
GTTTGTAATTTTAGTTATCTGTTTAAAAAGTCATAAGATTAGTCACTGGTAGGAATTAAT
CTAACGTATTTATTTATCTGCGTAATCACTGTTTTTAGTCTGTTTCAAACAGTAGATGTT
TTATCTACATTACGCATTTGGAATACCAACATGACGAATCCCTCCTTCTTAATTACAAAT
TTTTAGCATCTAATTTAACTTCAATTCCTATTATACACAAAATTTTAAGATACTGCACTAT
CAACACACTCTTAAGTTTCCC GGGTCAAGCGCAAATGACTCAAGTTTGTCAAGCCGAAG
TTGCCAAACTGGGTGCGAAAGCCTCTAAAGCCAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCATGT
ATCGAACCTGACCGCCGCGTAGATGTGAAAATCCGCAGCATCGTAACCCGTCAGGTTGT
GCCGGCACGCAATCATCACAACACTAAGGCTAGGTAATATCTTGCCGATGCATGAGGT
TAGCGGATTTTGTACCGGGTACTGTTGCAATATTCGTGAAACGTCGGCCGGTATCGATG
ATGTGAAACAAACCCCGCTTTTGC GGGGTTTTGTTTTTTTTGGGTGGTTTTCTGAAACGGCT
ATCGTCAGAATCGGGGTGCAGGTTCCGGATTCGGATTCAGATTCATGTTTGTGTCCCATTG
CCGCGCTTTATAGTGGATTAACAAAAATCAGGACAAGGCGACGAAGCCGCAGACAGTA
CAATAGTACGGCAAGGCGAGGCAACGCCGTACCGGTTTAAATTTAATCCACTATATCGG
TTGAAACTCTGATTTTAAGGCGGTAGGATGTGGGTTTGCCCATAGCAAGGGAATCCTTTC
TGATCAAGCCCCGAAAGGGATAATTCATACAAATTCACGCCTTTCCCCTCATTGGGA

AATGGATGGAATCGTGCCCGATGTGTGCGGCACTGTATGCCGGATATGGTTTTATCATC
ATCCCT

SEQ ID NO: 9: lpx11_UP FW
GGCATTGTATTTTGCCGTCTG

SEQ ID NO: 10 -lpx11_DO REV
GCGAAATGTACGCCATTTTCTACGC

SEQ ID NO: 11 - UpIII-FOR
gctctagaGGTCGTCTATCCGTTCCGTA

SEQ ID NO:12 - UpIII-REV
tccccgggCTCAACGCCTGAAAACAACC

SEQ ID NO: 13 - DpIII-FOR
tccccgggTCAAGCGCAAATGACTCAAG

SEQ ID NO: 14 - DpIII-REV
cccgctcgagGGGAAAGGCGTGAATTTGTA

SEQ ID NO: 15 - EryR_gono_SmaI-Fw
ATTCGCCCGGGAACTTAAGAGTGTGTTGATAGTG

SEQ ID NO: 16 - EryR_gono_SmaI-Rev
ATTCGCCCGGGACCTCTTTAGCTTCTTGG

SEQ ID NO: 17 - lpx11 est FW
CCGCCAAACTCAATCCTTCG

SEQ ID NO: 18 - lpx11 est REV
GCAAACCTTTGTTTCACCGTTTCCG

SEQ ID NO: 19 - NGO_lpxL1wtcheck-Fw
CCGCGTTCGAGATGG

SEQ ID NO: 20 - NGO_lpxL1wtcheck-Rev
GCGGAACTGTTTGACGAG

SEQ ID NO: 21 - UP_CHECK_NGO1577-Fw
GTGTGTCCAGTCGTAGCAGG

SEQ ID NO: 22 - DW_CHECK_NGO1577-Rev
AGGGATGATGATAAAACCATATCC

SEQ ID NO: 23 - INTwt_NGO1577-Fw
TCGTACGCAACAACCTATGGAG

SEQ ID NO: 24 - INTwt_NGO1577-Rev
CATCAACATATTGAGGAGCCTG

SEQ ID NO: 25 - белок PorB FA1090 2КО
MKKSLIALTLAALPVAAMADVTLYGAIKAGVQTYRSVEHTDGKVSKVETGSEIADFGSKI
GFKGQEDLGNLKA VVWQLEQGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTG
ANVNAWESGKFTGNVLEISGMAQREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSNGESY
HVGLNYQNSGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDGQTY SIPS L FVEKLQVHRLVGGYDNNAL
YVSVA AQQQDAKLYGAMSGNSHNSQTEVAATAAYRFGNVT PRVSYAHGFKGTVDSANHD
N
TYDQVVVGAEYDFSKRTSALVSAGWLQEGKGADKIVSTASAVVLRHKF

SEQ ID NO: 26 – белок PorB FA1090 2КО (петля 1)
TYRSVEHTDGKVS KVETGSEIA

SEQ ID NO: 27 – белок PorB FA1090 2КО (петля 2)
ASVAGTNTGWG

SEQ ID NO: 28 – белок PorB FA1090 2КО (петля 3)
LNSPLKNTGANVNAWESGKFTGNVLEISGMAQREHRY

SEQ ID NO: 29 – белок PorB FA1090 2КО (петля 4)
APKDNSGSNGE

SEQ ID NO: 30 - белок PorB FA1090 2КО (петля 5)
RYGEGTKKIEYDGQTY SIPS L FVEKL

SEQ ID NO: 31 – белок PorB FA1090 2КО (петля 6)

DAKLYGAMSGNSHN

SEQ ID NO: 32 – белок PcrB FA1090 2КО (петля 7)

FKGTVDSANHDNT

SEQ ID NO: 33 – белок PcrB FA1090 2КО (петля 8)

GWLQEGKGADKIVSTA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически модифицированная гонококковая бактерия штамма FA1090, содержащая генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые):

- а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена, мРНК и/или полипептида лауроилацилтрансферазы биосинтеза липида А (*lpx11*); и
- б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена, мРНК и/или полипептида модифицируемого восстановлением белка (*rmp*).

2. Гонококковая бактерия по п. 1, где ген *lpx11* содержит последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, и где ген *rmp* содержит последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1.

3. Гонококковая бактерия по любому из п.п. 1-2, где генетическая(ие) модификация(и):

- а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию полипептида Lpx11;
- и
- б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию полипептида Rmp.

4. Гонококковая бактерия по любому из п.п. 1 – 3, где полипептид Lpx11 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 4, и полипептид Rmp содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 2.

5. Гонококковая бактерия по любому из п.п. 1 – 4, где генетическая(ие) модификация(и) представляет(ют) собой или включает(ют)

- а) разрушение или делецию эндогенных генов *lpx11* и *rmp*; или
- б) подавление экспрессии полипептида Lpx11 и Rmp в штамме, содержащем гены *lpx11* и *rmp* дикого типа.

6. Способ получения гонококковой бактерии по любому из п.п. 1 – 5, включающий либо:

- а) снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpx11* в гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090; или

б) снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *rmp* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением первой гонококковой бактерии FA1090 и снижение или прекращение экспрессии и/или функции мРНК и/или полипептида гена *lpx11* из первой гонококковой бактерии FA1090 с получением второй гонококковой бактерии FA1090.

7. Везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококка штамма FA1090, где указанная везикула наружной мембраны содержит либо пониженные уровни, либо неопределяемый уровень полипептидов Lpx11 и Rmp, возможно, где указанные пониженные уровни или неопределяемый уровень полипептидов Lpx11 и Rmp измерены по сравнению с везикулой наружной мембраны, полученной из бактерии FA1090 дикого типа.

8. Везикула наружной мембраны (OMV) из генетически модифицированного гонококка штамма FA1090, содержащего генетическую(ие) модификацию(и), которая(ые): а) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *lpx11*, мРНК *lpx11* и/или полипептида Lpx11; и б) снижает(ют) или прекращает(ют) экспрессию и/или функцию гена *rmp*, мРНК *rmp* и/или полипептида Rmp,

где указанная OMV содержит:

1. пониженные уровни полипептида Rmp по сравнению с уровнями полипептида Rmp в сравнительной OMV из штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанные генетические модификации; и

2. пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из указанной сравнительной OMV.

9. Везикула наружной мембраны, полученная или получаемая из гонококковой бактерии по любому из п.п. 1 - 5.

10. Везикула наружной мембраны по п. 9, имеющая пониженную или прекращенную экспрессию полипептида Lpx11 и пониженную или прекращенную экспрессию полипептида Rmp.

11. Везикула наружной мембраны по п. 9, имеющая пониженные уровни полипептида Rmp по сравнению с уровнями полипептида Rmp в сравнительной OMV из штамма *N. gonorrhoeae* FA1090, в котором отсутствуют указанная(ые) генетическая(ие) модификация(и); и пониженные уровни гексаацилированного липида А по сравнению с уровнями гексаацилированного липида А из сравнительной OMV.

12. Везикула наружной мембраны по п. 7, п. 8 или п.п. 9 - 11, представляющая собой нативную везикулу наружной мембраны, то есть не экстрагированную детергентом.

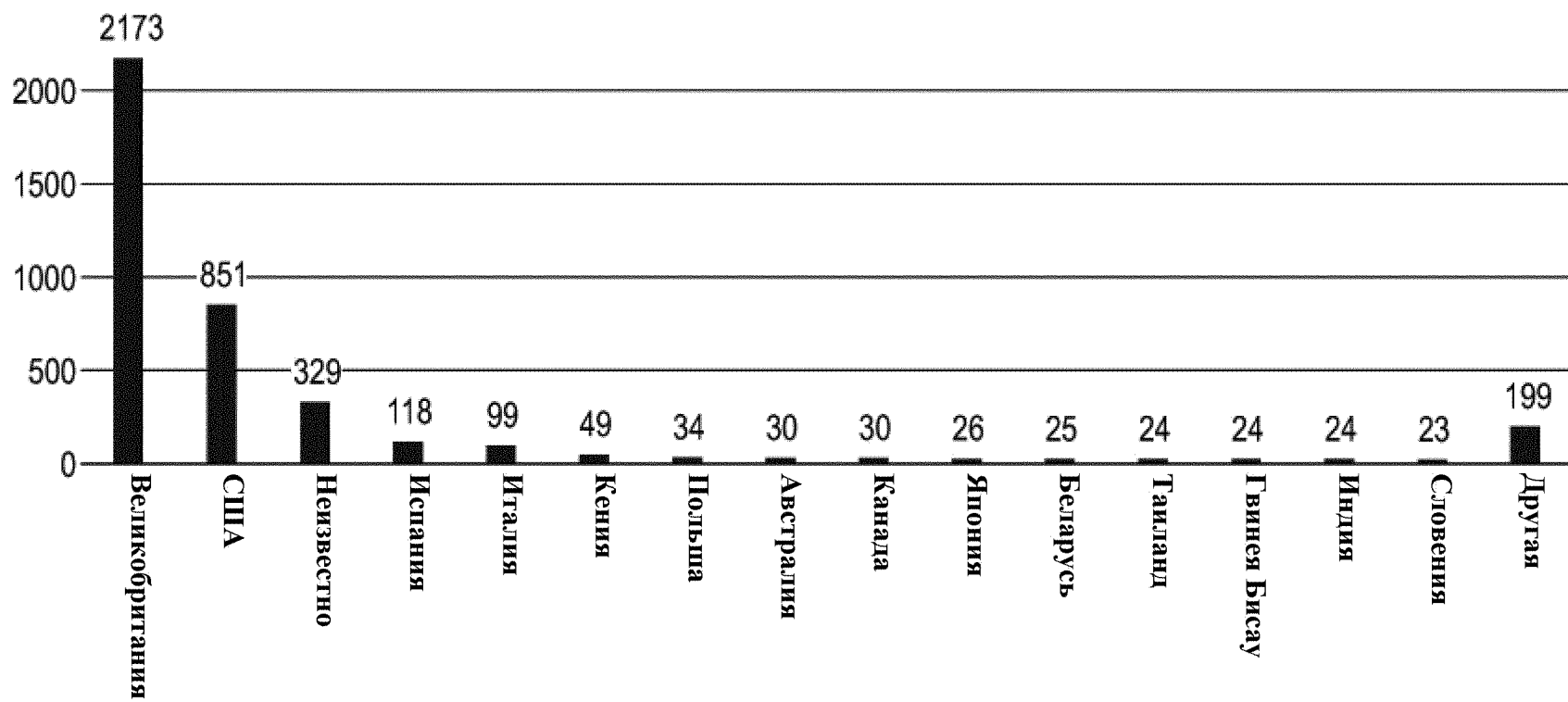
13. Иммуногенная композиция, содержащая везикулу наружной мембраны по любому из пп. 7 - 12, возможно, дополнительно содержащая адъювант, возможно, где адъювант представляет собой адъювант на основе соли алюминия, например гидроксид алюминия.

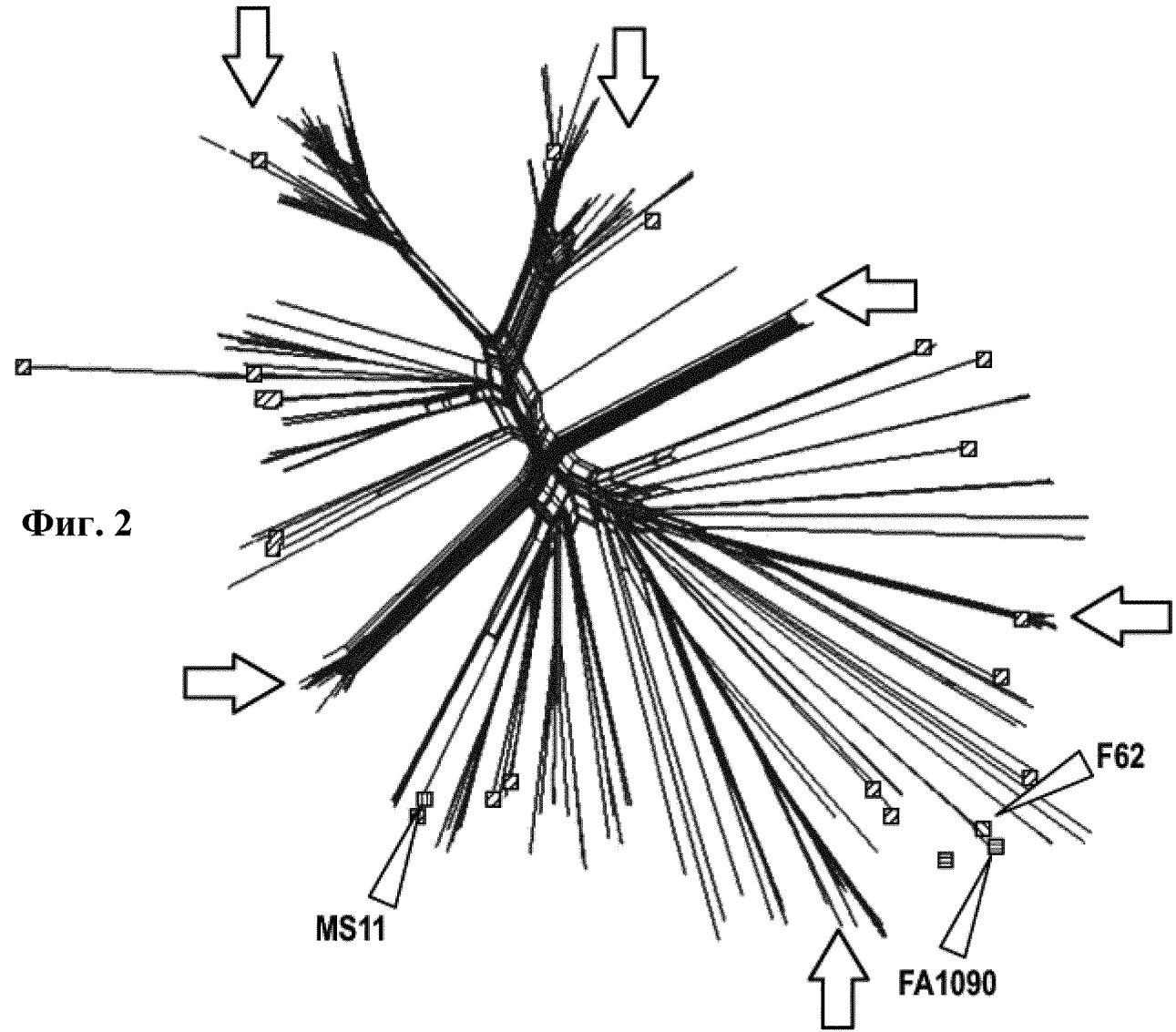
14. Вакцина, содержащая везикулу наружной мембраны по любому из п.п. 7 - 12 или иммуногенную композицию по п. 13 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

15. Иммуногенная композиция по п. 13 или вакцина по п. 14 для применения в медицине.

16. Иммуногенная композиция по п. 13 или вакцина по п. 14 для применения в лечении или профилактике заболевания, вызванного *Neisseria*, например, *N. gonorrhoea*.

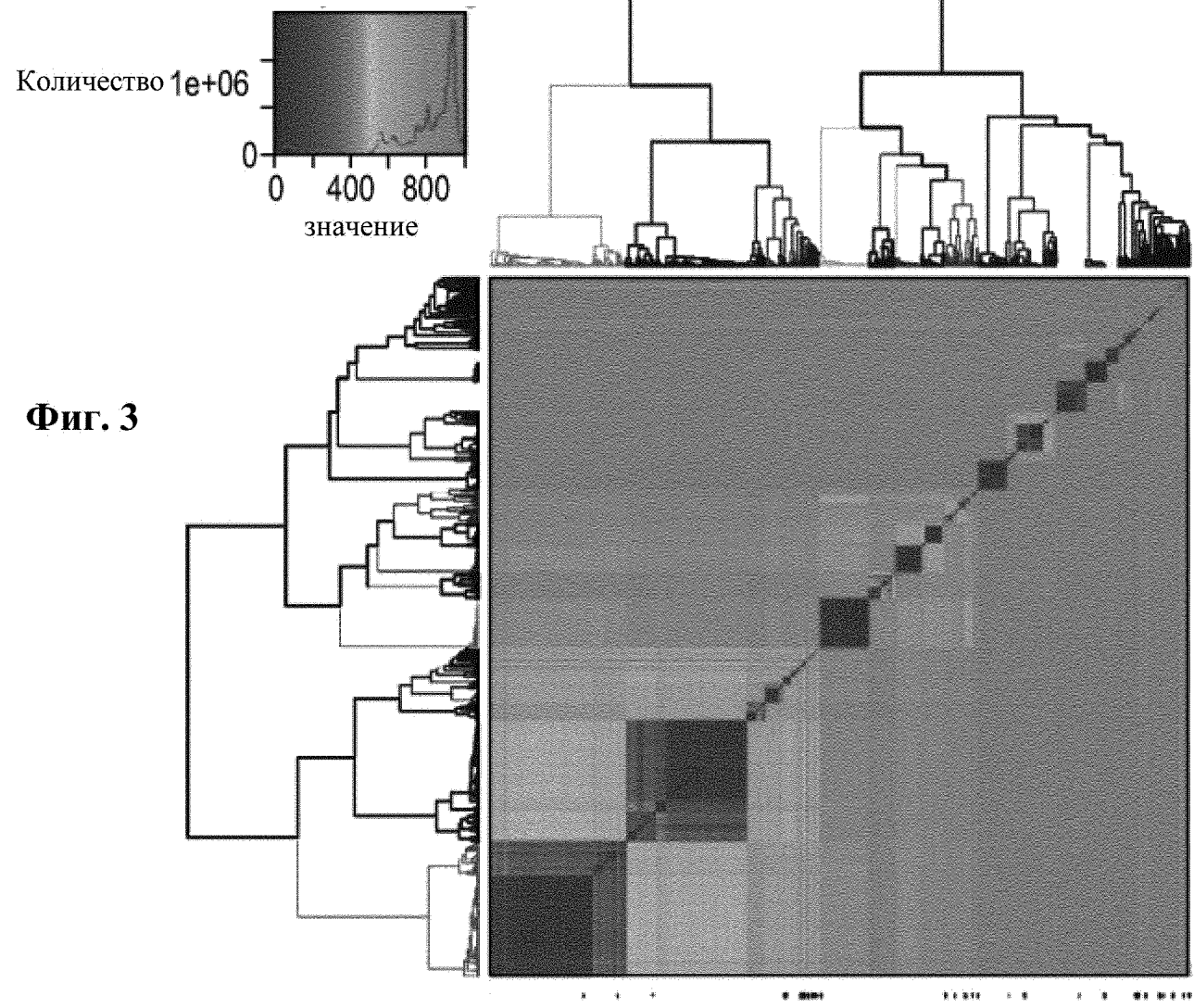
Фиг. 1
Распределение по странам





Фиг. 2

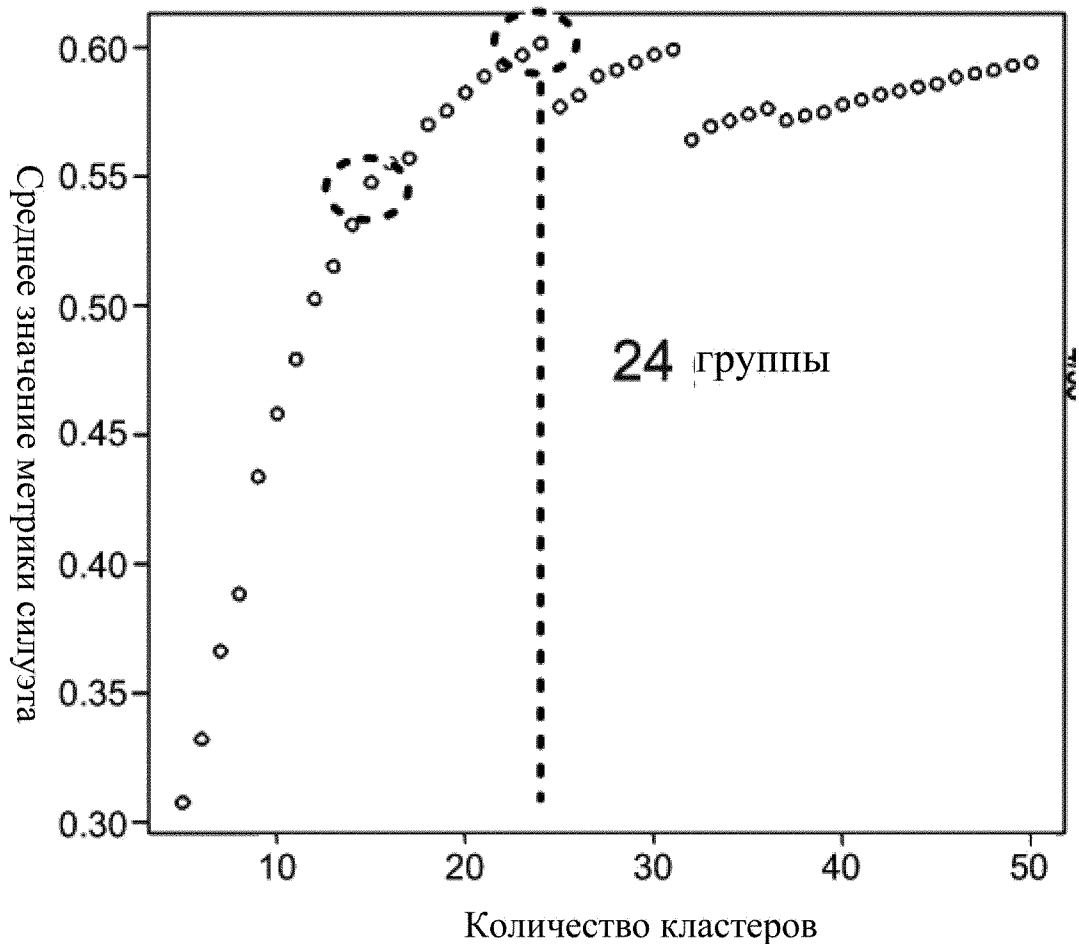
Цветовая кодировка и гистограмма



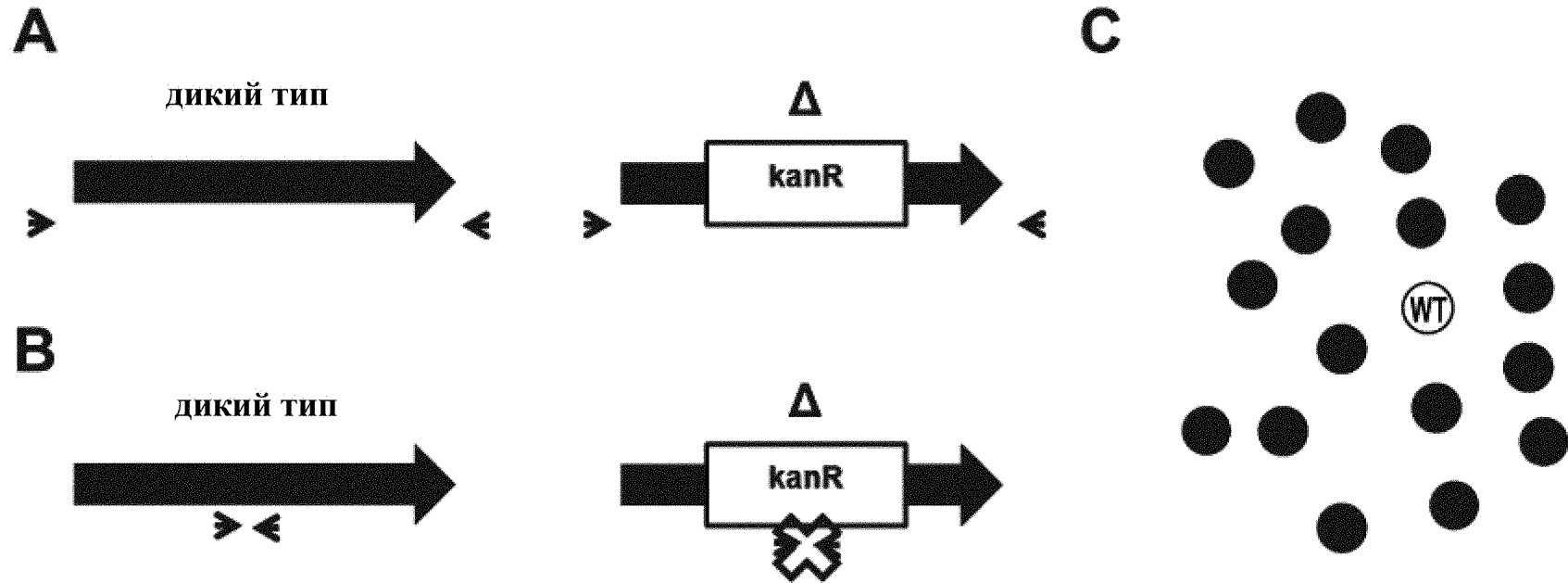
Расстояние между группами Расстояние внутри групп

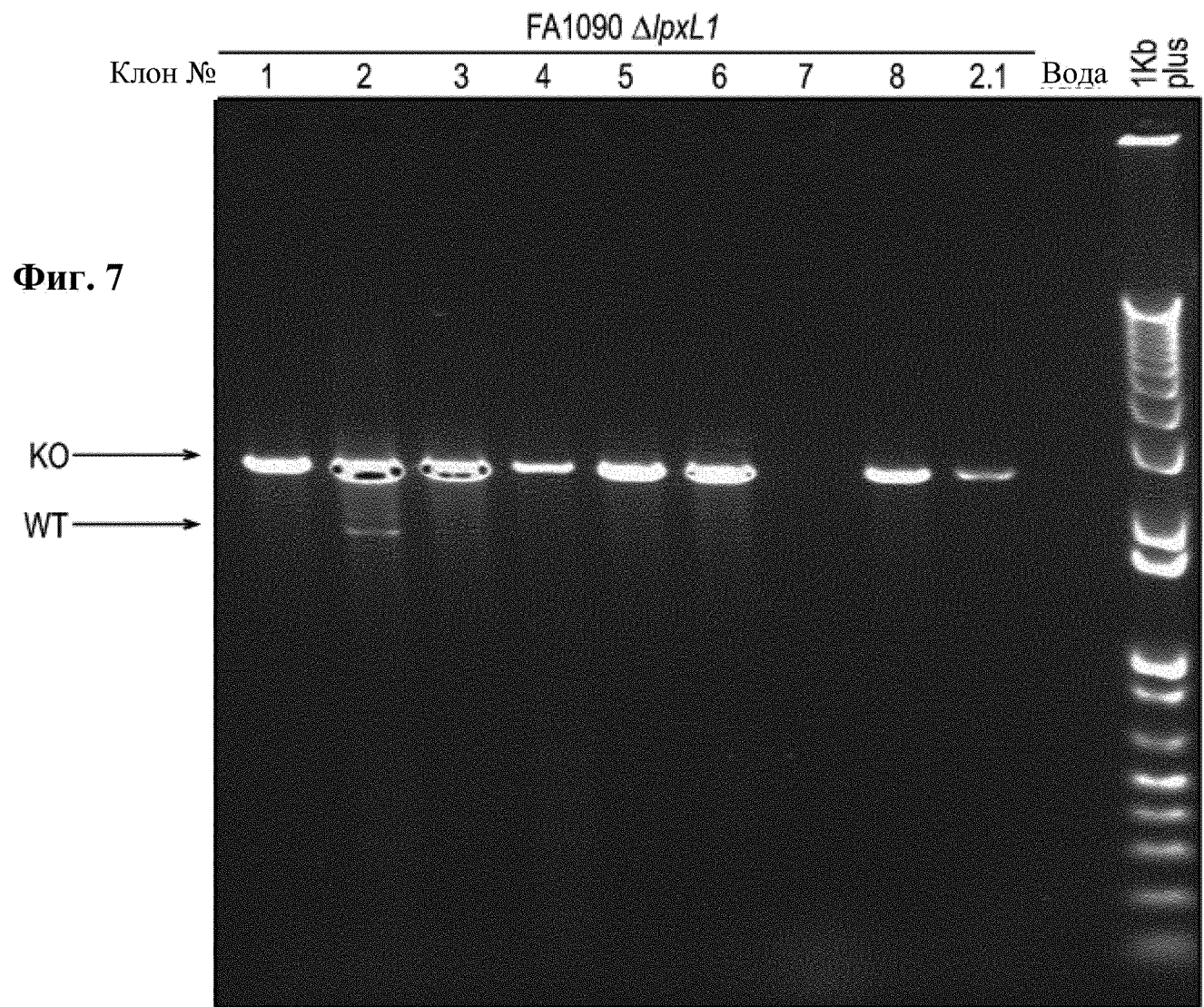
$$s(i) = \frac{\overbrace{b(i) - a(i)}}{\max\{a(i), b(i)\}}$$

Фиг. 4



Фиг. 6

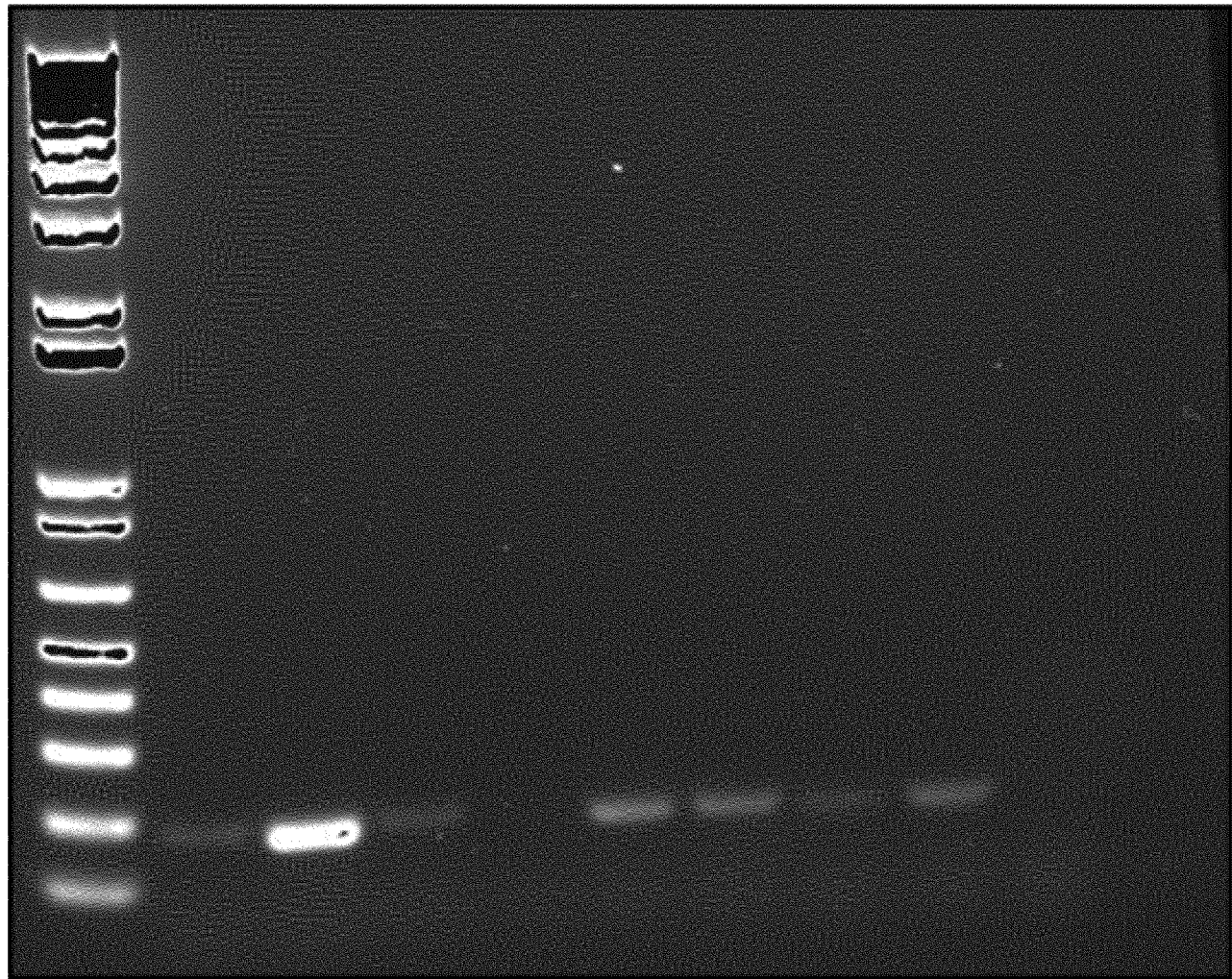




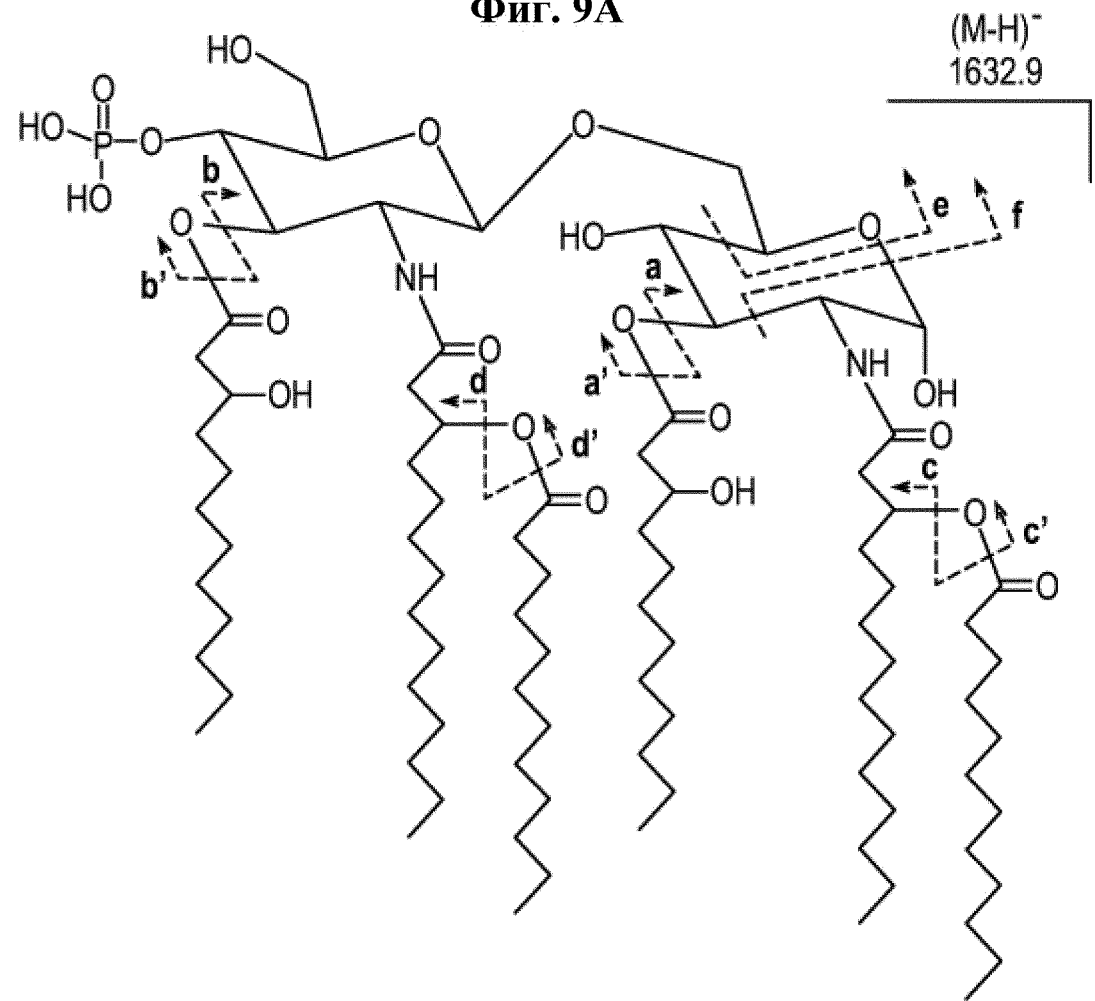
Фиг. 7

Клон № 1Kb plus FA1090 Δ pxL1
1 2 3 4 5 6 7 8 2.1 Вода

Фиг. 8



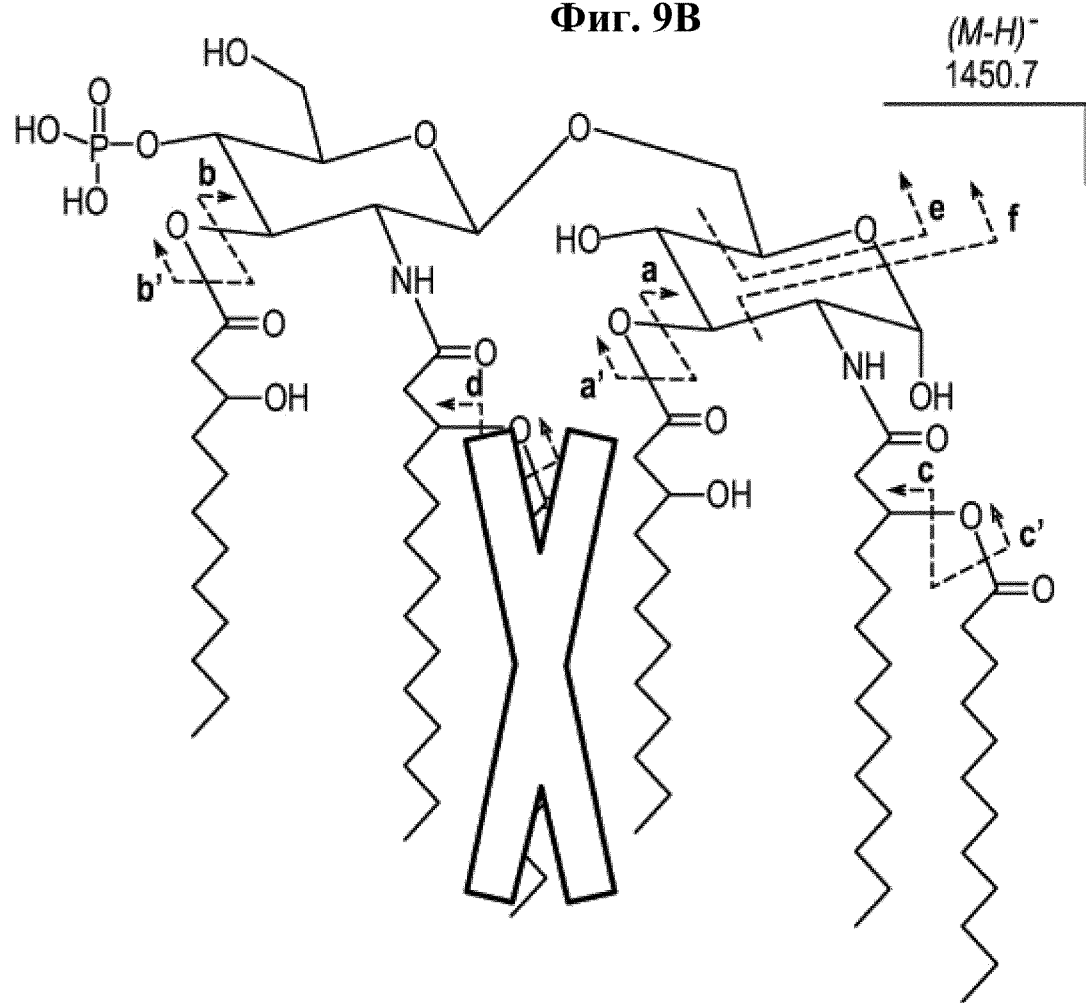
Фиг. 9А





Фиг. 9А (прод.)

Фиг. 9В

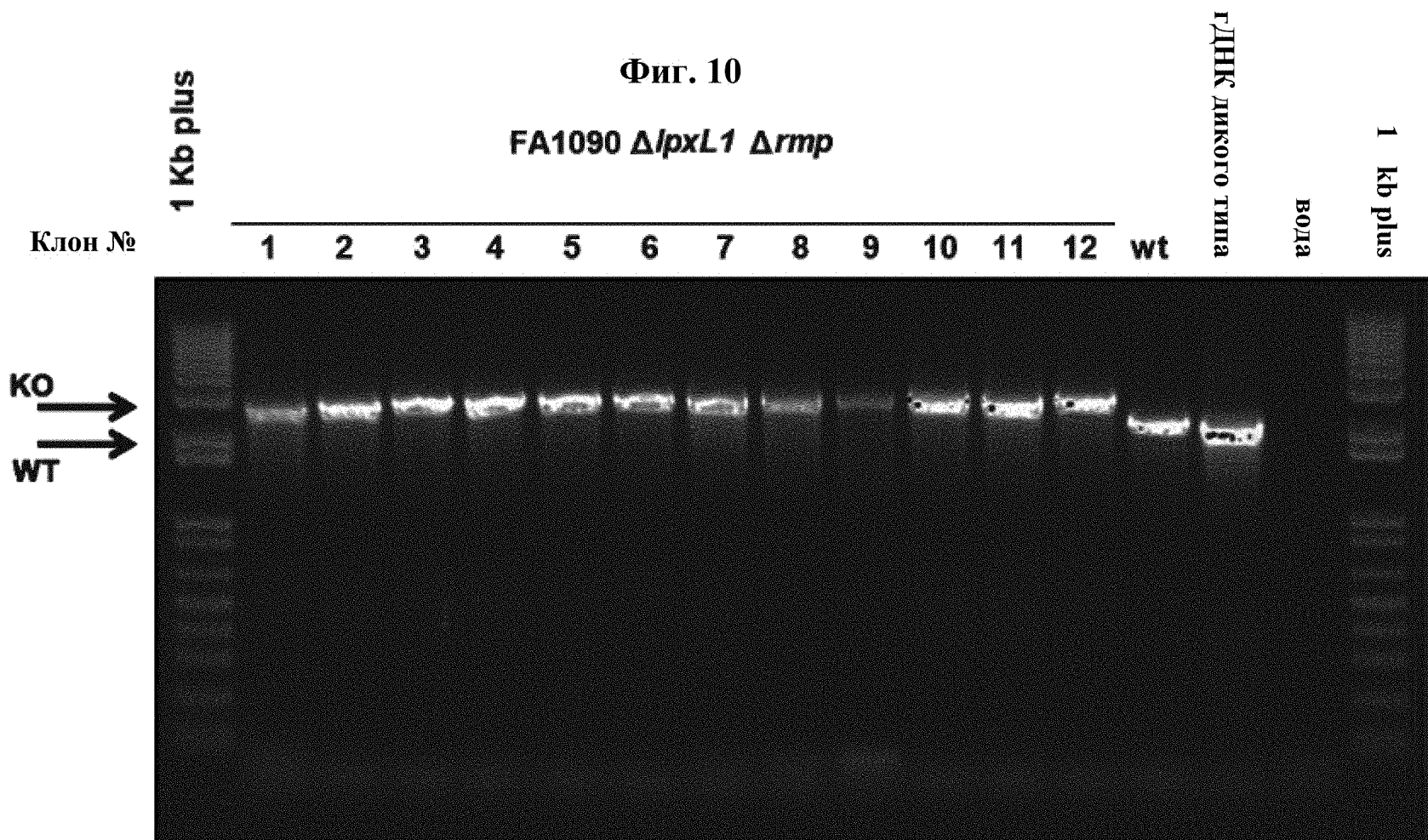




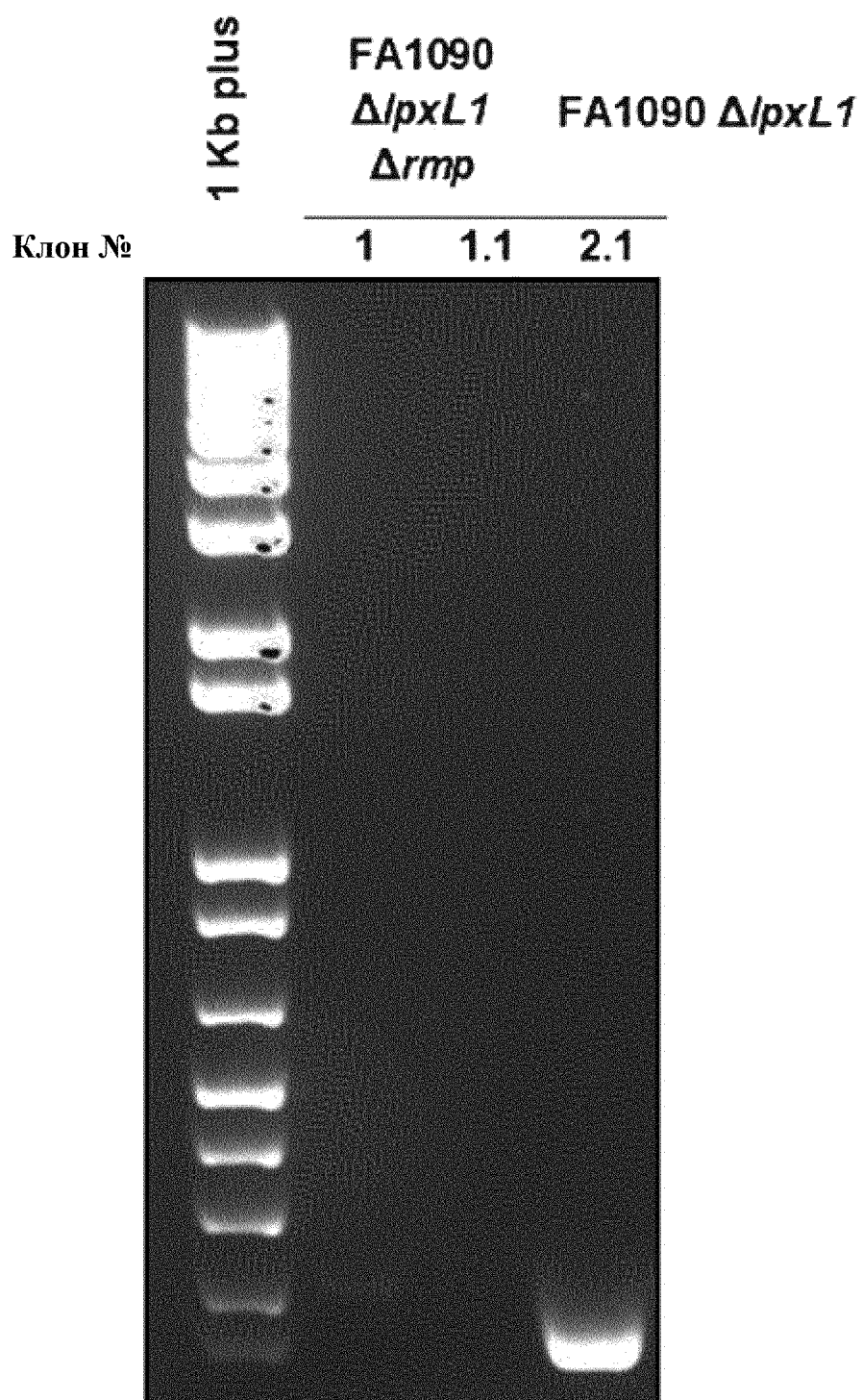
Фиг. 9В (прод.)

Фиг. 10

FA1090 Δ *pxL1* Δ *gmp*



Фиг. 11



Фиг. 12

CCGGCATCGACGCTGATGCTCGGTTCAGGCGCGCGGAGCGGCATTGGCGGCTTTGGTCAGCCATAAGCTGCCCGTTTCGGAATA
CACGGCCTTGCAGGTCAAACAGGCGGTGGTCGGCAAAGGCAAGGCGGCGAAAGAACAGGTGCAGCATATGGTGGTGCAAATGC
TGGGACTTTCGGGAACGCCGAGGCGGATGCGGCGGACGGTCTTGCCGTCGCGCTGACCCACGCCTTACGCAACCACGGGCTT
GCCGCCAAACTCAATCCTTCGGGGATGCAGGTCAAGCGCGGAAGGTTTCAATAGTTTCAGACGGCATTGTATTTTGCCGCT
GAAAAGAAAATGTGTACCGAGATGAAATTTATATTTTTTGTACTGTATGTTTTGCAGTTTCTGCCGTTTGCCTGCTGCACAA
GATTGCCGGCCTGATCGGTTTCGCTTGCCTACCTTCTGGTCAAACCGCGCCCGCTATCGGCGAAATCAATTTGGCAAATGTT
TTCCCGAATGGGACGAAGAAAAGCGTAAAACCGTGTGAAACAGCATTTCAAACACATGGCAAACCTGATGCTCGAATACGGC
TTATATTGGTACGCGTCTGCCAAATGCCTGAAATCGCTGGTGCCTACCGCAATAAGCATTATTTGGACGACGCGCTGGCGGC
GGGGGAAAAGTCATCATCCTGTACCCGCACTTTAACCGGTTTCGAGATGGCGGTGTACGCGCTTAATCAGGATGTCCCGCTGA
TCAGTATGTATTTCCACCAAAAAACAAGATATTGGACGAACAGATTTTGAAGGCCGCAACCGCTATCACAACGCTCTTCCTT
ATCGGGCGCACCGAAGGGCTGCGCGCCCTCGTCAAACAGTTCGGCAAAGCAGTGCGCCGTTTCCTGTATCTGCCCGATCAGGA
TTTCGGACGCACAATTCGGTTTTTGTGGATTTTTTCGGCATTCAGACGGCAACGATTACCGGCTTGAGCCGCATTGCCGCGC
TTGCAAATGCAAAAGTGATACCCGCCATTCCCGTCCGCGAGGCGGACAATACGGTTACATTGCAATTTCTATCCCGCTTGGAAA
TCCTTTCCGAGTGAAGACGCGCAAGCCGACGCGCAACGTATGAACCGCTTTATCGAAGAACGCGTGCGCGAACACCCGGAACA
ATATTTCTGGCTGCACAAGCGTTTCAAACCCGTCGGAAGGCAGCCCCGATTTTTACTGACTACATAAAAATTACAAAACAAA
TCAGGCGTTTCAGATCAAAAACCCGATTGTTTTTGGGAATTTGAAACCCGGGTTGTACAAAACAGGATTTGCCGGACGGTTTT
AACGTTTCAGTTGTTTGTAAAAACAATGCTTTTTTAAAATTGACAAAAAACGAAATCGGTTTTAAAGGCTTATTCCGAGAACA
AAGGGGAGTGGATGCCGAAAACCCGGTTAATATATTATAGTGGATTAACAAAAACCAATACGGCGTTGCTTCGCCTTAGCTCA
AAGAGAACGATTCSSAAGGTGCTGAAGCACCAAGCGAATCGGTTCCGTAATAATTTGTACTGTCTGCGGCTTCGCCGCCTTGT
CCTGATTTTTGTTAATCCACTATAAAATTAATTTGTTTAAAAACATAAAGTTGTAACAAGTATCTCATATAAGCCTTTTTTC
ATTAACAGATAGTCAGATATTTTGTGCTAAAAATTTATATAATTTAAATTAATATCAAGTTATAAAAAATATATGGAATT
TTATTTTGTATTATTATAATTTTAAGCA

Ген *lpxL1*

ATG – стартовый кодон *lpxL1*

TGA – стоп-кодон *lpxL1*

Границы кассет рекомбинации, расположенных против хода и по ходу транскрипции

Фиг. 13

CCGGCATCGACGCTGATGCTCGGTCAGGCGCGGGAGCGGCATTGGCGGCTTTGGTCAGCCATAAGCTGCCCGTTTCGGAATA
CACGGCCTTGCAGGTCAAACAGGCGGTGGTCGGCAAAGGCAAGGCGGCGAAAGAACAGGTGCAGCATATGGTGGTGCAAATGC
TGGGACTTTCGGGAACGCCGACAGGCGGATGCGGCGGACGGTCTTGCCGTCGCGCTGACCCACGCCTTACGCAACCACGGGCTT
GCCGCCAAACTCAATCCTTCGGGGATGCAGGTCAAGCGCGGAAGGTTTCAATAGTTTCAGACGGCATTGTATTTTGCCGTCT
GAAAAGAAAATGTGTATCGAGATCAAATTTATATTTTTTGTACTGTATGTTTTGCAGTTTCTGCCGTTTGCCTGCTGCACAA
GATTGCCGACCTGACGGGTTTGCTTGCCCTACCTTCTGGTCAAACCGCGCCCGTATCGGCGAAATCAATTTGGCAAATGTT
TTTCCGAATGGAGTGAGGAAAAGCGTAAAACCGTGTTGAAACAGCATTTCAAACACATGGCGAAACTGATGTTGGAATACGGT
TTATATTGGTACGCGCCTGCCGGACGTTTAAAATCGCTGGTGCCTACCGCAATAAGCATTATTTGGACGACGCGCTGGCGGC
GGGGAAAAGTCATCATCCTGTATCGGCACTTCACCGCTGCAGTTGCAGTGACTAACTAGGAGGAATAAATGGCTAAAATGA
GAATATCACCGGAATTGAAAAAACTGATCGAAAAATACCGCTGCGTAAAAGATACGGAAGGAATGTCTCCTGCTAAGGTATAT
AAGCTGGTGGGAGAAAATGAAAACCTATATTTAAAAATGACGGACAGCCGGTATAAAGGGACCACCTATGATGTGGAACGGGA
AAAGGACATGATGCTATGGCTGGAAGGAAAGCTGCCTGTTCCAAAGGTCTGCACCTTGAACGGCATGATGGCTGGAGCAATC
TGCTCATGAGTGAGGCCGATGGCGTCTTTGCTCGGAAGAGTATGAAGATGAACAAAGCCCTGAAAAGATTATCGAGCTGTAT
GCGGAGTGCATCAGGCTCTTCACTCCATCGACATATCGGATTGTCCCTATACGAATAGCTTAGACAGCCGCTTAGCCGAATT
GGATTACTTACTGAATAACGATCTGGCCGATGTGGATTGCGAAAACGGGAAGAAGACACTCCATTTAAAGATCCGCGCGAGC
TGTATGATTTTTTAAAGACGGAAAAGCCCGAAGAGGAACTTGTCTTTCCACGGCGACCTGGGGGACAGCAACATCTTTGTG
AAAGATGGCAAAGTAAGTGGCTTTATTGATCTTGGGAGAAGCGGCAGGGCGGACAAGTGGTATGACATTGCCTTCTGCGTCCG
GTCGATCAGGGAGGATATCGGGGAAGAACAGTATGTCGAGCTATTTTTTACTTACTGGGGATCAAGCCTGATTGGGAGAAAA
TAAAATACTATATTTTACTGGATGAATTGTTTTAGTACCTGGAAGGAATAATGAGTCGACAGGATTTCCGGACGCAACGATTCCG
GTTTTTGTGGATTTTTTCGGTATTCAGACGGCAACGATTACCGGATTGAGCCGCATTGCCGCGCTTGCAAATGCAAAGTATGAT
ACCCGCCATTCCCCTCCGCGAGGCAGACAATACGGTTACATTGCATTTCTATCCCCTTGGAATCCTTTCCGGGTGAAGACG
CGAAAGCCGACGCGCAGCGCATGAACCGTTTTATCGAAGACAGGGTGCGCGAACATCCGGAACAATTTTTTGGCTGCACAAG
CGTTTTAAAACCGTCCGGAAGGCAGCCCGATTTTTTACTGACTACATAAAATTACAAAACAATCAGGCGTTTCAGATCAA

AACCCCGATTGTTTTTGGGAATTTGAAACCCGGGTTGTACAAACAGGATTTGCCGGACGGTTTTAACGGTTCAGTTGTTTGTA
AAAACAATGCTTTTTTAAAATTGACAAAAACGAAATCGGTTTTAAAGGCTTATCCGAGAACAAGGGGAGTGGATGCCGAA
AACCCGGTTAATATATTATAGTGGATTAACAAAAACCAATACGGCGTTGCTTCGCCTTAGCTCAAAGAGAACGATTCCCTAAG
GTGCTGAAGCACCAAGCGAATCGGTTCCGTACTATTTGTACTGTCCTGCGGCTTCGCCGCCTTGTCCTGATTTTTGTTAATCCA
CTATAAAATTAATTTGTTTAAAAACATAAAGTTGTAACAAGTATCTCATATAAGCSTTTTTTCATTAACAGATAGTCAGAT
ATTTTGTGCTAAAAATTTATATAATATTTAAATTAATATCAAGTTATAAAAAATATATGGAATTTTATTTTGTATTATATAA
TTTTAAGCA

Ген *lpxL1*

ATG – стартовый кодон *lpxL1*

TGA – стоп-кодон *lpxL1*

Границы кассет рекомбинации, распоженных против хода и по ходу транскрипции

kanR cassette – кассета устойчивости к антибиотику (канамицину)

Фиг. 13 (прод.)

Фиг. 14

CAACGGCAATCGTGCATATGGAAAAATCCCCATAAAGTAATGACACGGAATTGATTTTTTCGGCATGATAGACTATCAGGAA
ACAGGCTGTTTTACGGTTGT**TTTCAGGCGTTGAG**GATTGACAGTCCGCCCCCTGTTTCTTTATAGTGGAGACTGAAATATCCG
ATTTGCCGCCATGTTTCTACAGCGGCCTGTATGTTGGCAATTCAGCAGTTGCTTCTGTATCTGCTGTACAAATCTAATGAGGG
AATAAA**ATC**ACCAAACAGCTGAAATTAAGCGCATTATTCGTTGCATTGCTCGCTTCCGGCACTGCTGTTGCGGGCGAGGCGTC
CGTTCAGGGTTACACCGTAAGCGGCCAATCGAACGAAATCGTACGCAACAACTATGGAGAATGCTGGAAAAACGCCTACTTTG
ATAAAGCAAGCCAAGTCGCGTAGAATGCGGCGATGCGGTTGCCGTCCCCGAGCCCGAACCCGCGCCTGTCGCCGTTGTGGAG
CAGGCTCCTCAATATGTTGATGAAACCATTTCCCTGTCTGCCAAAACCCTGTTCCGGTTTCGATAAGGATTCATTGCGCGCCGA
AGCTCAAGACAACCTGAAAGTATTGGCGCAACGCCTGAGTCGAACCAATGTCCAATCTGTCCGCGTCGAAGGCCATACCGACT
TTATGGGTTCTGAAAAATACAATCAGGCTCTGTCCGAACGCCGCGCATACGTAGTGGCAAACAACCTGGTCAGCAACGGCGTA
CCTGCTTCTAGAAATTTCTGCTGTGCGCTTGGGCGAATC**TCAAGCGCAAATGACTCAAGTT**TGTCAAGCCGAAGTTGCCAACT
GGGTGCGAAAGCCTCTAAAGCCAAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCATGTATCGAACCTGACCGCCGCGTAGATGTGAAAATCC
GCAGCATCGTAACCCGTCAGGTTGTGCCGGCACGCAATCATACCAACACT**ТАА**GGCTAGGTAATATCTTGCCGATGCATGAGG
TTAGCGGATTTTGTACCGGGTACTGTTGCAATATTCGTGAAACGTCGGCCGGTATCGATGATGTGAAACAAACCCCGCTTTTG
CGGGGTTTGTTTTTTTGGGTGGTTTTCTGAAACGGCTATCGTCAGAATCGGGGTGCAGGTTCCGGATTCGGATTCAGATTCATG
TTTGTGTCCCATTGCCGCGCTTTATAGTGGATTAACAAAAATCAGGACAAGGCGACGAAGCCGACAGTACAATAGTACGG
CAAGGCGAGGCAACGCCGTACCGGTTTAAATTTAATCCACTATATCGGTTGAAACTCTGATTTTAAGGCGGTAGGATGTGGGT
TTGCCATAGCAAGGAATCCTTTCTGTATCAAGCCCCGAAAGGATAATTCATACAAATTCACGCCTTTCCCCCTCATTGGG
AAATGGATGGAATCGTGCCCGATGTGTGCGGCACTGTATGCCGGATATGGTTTTATCATCATCCCT

Ген *rmp*

ATG – стартовый кодон *rmp*

ТАА – стоп-кодон *rmp*

Границы – кассет рекомбинации, распоженных против хода и по ходу транскрипции

Фиг. 15

CAACGGCAATCGTGCGATATGGAAAAATCCCCSTAAGTAATGACACGGAATTGATTTTTTCGGCATGATAGACTATCAGGAA
ACAGGCTGT **TTTACGGTTCTTTTCAGGCCGTTGAG CCCGGG** ACCTCTTTAGCTTCTTGGAAGCTGTCAGTAGTATATCTAATAA
TTTATCTCCATTCCCTTTAGTAACGTGTAACCTTTCCAAATTTAAAAAAGCGACTCATAGAATTATTTCTCCCGTTAAATAAT
AGATAACTATTTAAAAATAGACAATACTTGCTCATAAGTAATGGTACTTAAATTGTTTACTTTGGCGTGTTCATTGCTTGATG
AAACTGATTTTTAGTAAACAGTTGACGATATTTCTCGATTGACCCATTTTGAAACAAAGTACGTATATAGCTTCCAATATTTAT
CTGGAACATCTGTGGTATGGCGGGTAAGTTTTATTAAGACACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGC
TTAAGCAATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAATATCCAAGGTACGCTTGTAAGAATCC
TTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCATGGCTTTCAAAAACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAA
TACTCCCAACAATTTTATACCTCTGTTTGTAGGGAATTGAAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAAGTGACACGAATGTTT
AGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTTACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTT
CGTCGTTAAATGCCCTTTACCTGTTCCAATTTTCGTAAACGGTATCGGTTTCTTTTAAATTTCAATTGTTTTATTATTTGGTTGA
GTACTTTTTCACTCGTTAAAAAGTTTTGAGAATATTTTATATTTTTGTTTCATGTAATTAATCCTGAAGTGATTACATCTGTAA
ATAAATACAGAAGTTAAACGATTTGTTTGTAAATTTTAGTTATCTGTTTAAAAAGTCATAAGATTAGTCACTGGTAGGAATTA
TCTAACGTATTTATTTATCTGCGTAATCACTGTTTTTAGTCTGTTTCAAACAGTAGATGTTTTATCTACATTACGCATTTGG
AATACCAACATGACGAATCCCTCCTTCTTAATTACAATTTTTAGCATCTAATTTAACTTCAATTCCTATTATACACAAAATT
TTAAGTACTGCACTATCAACACACTCTTAAGTTT **CCCGGGTCAAGCGCAAATGACTCAAGTTTG** TCAAGCCGAAGTTGCCAA
ACTGGGTGCGAAAGCCTCTAAAGCCAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCATGTATCGAACCTGACCGCCGCGTAGATGTGAAAA
TCCGCAGCATCGTAACCCGTCAGGTTGTGCCGGCACGCAATCATCACCACAC **TAAGGCTAGGTAATATCTTGCCGATGCATG**
AGGTTAGCGGATTTTGTACCGGGTACTGTTGCAATATTCGTGAAACGTCGGCCGGTATCGATGATGTGAAACAAACCCCGCTT
TTGCGGGGTTTGTTTTTTTGGGTGGTTTTCTGAAACGGCTATCGTCAGAATCGGGGTGCAGGTTCCGGATTCGGATTCAGATTC
ATGTTTGTGTCCCATTGCCGCGCTTTATAGTGGATTAACAAAAATCAGGACAAGGCGACGAAGCCGCAGACAGTACAATAGTA
CGGCAAGGCGAGGCAACGCCGTACCGGTTTAAATTTAATCCACTATATCGGTTGAAACTCTGATTTTAAGGCGGTAGGATGTG
GGTTTGGCCATAGCAAGGGAATCCTTTCTGTATCAAGCCCCGAAAGGGATAATTACATACAAATTCACGCCTTTCCCCCTCAT
GGGAAATGGATGGAATCGTGCCCGATGTGTGCGGCACTGTATGCCGGATATGGTTTTATCATCATCCCT

Ген *rmp*

ТАА - стоп-кодон *rmp*

CCCGGG - сайт SmaI

Границы кассет рекомбинации, распоженных против хода и по ходу транскрипции

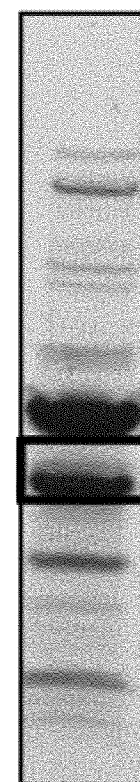
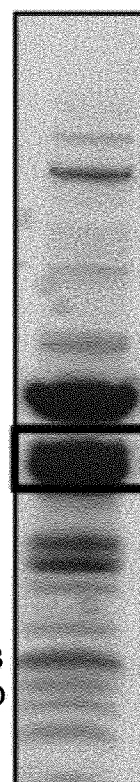
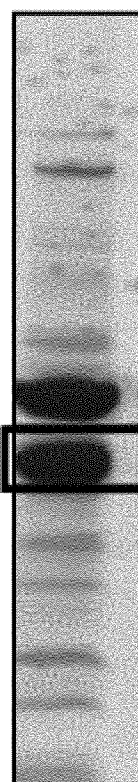
eryR_cassette - кассета устойчивости к антибиотику

Фиг. 16

	wt	Δ LpxL	Δ LpxL Δ Rmp
RmpM	обнаруживается	обнаруживается	отсутствует

кДа

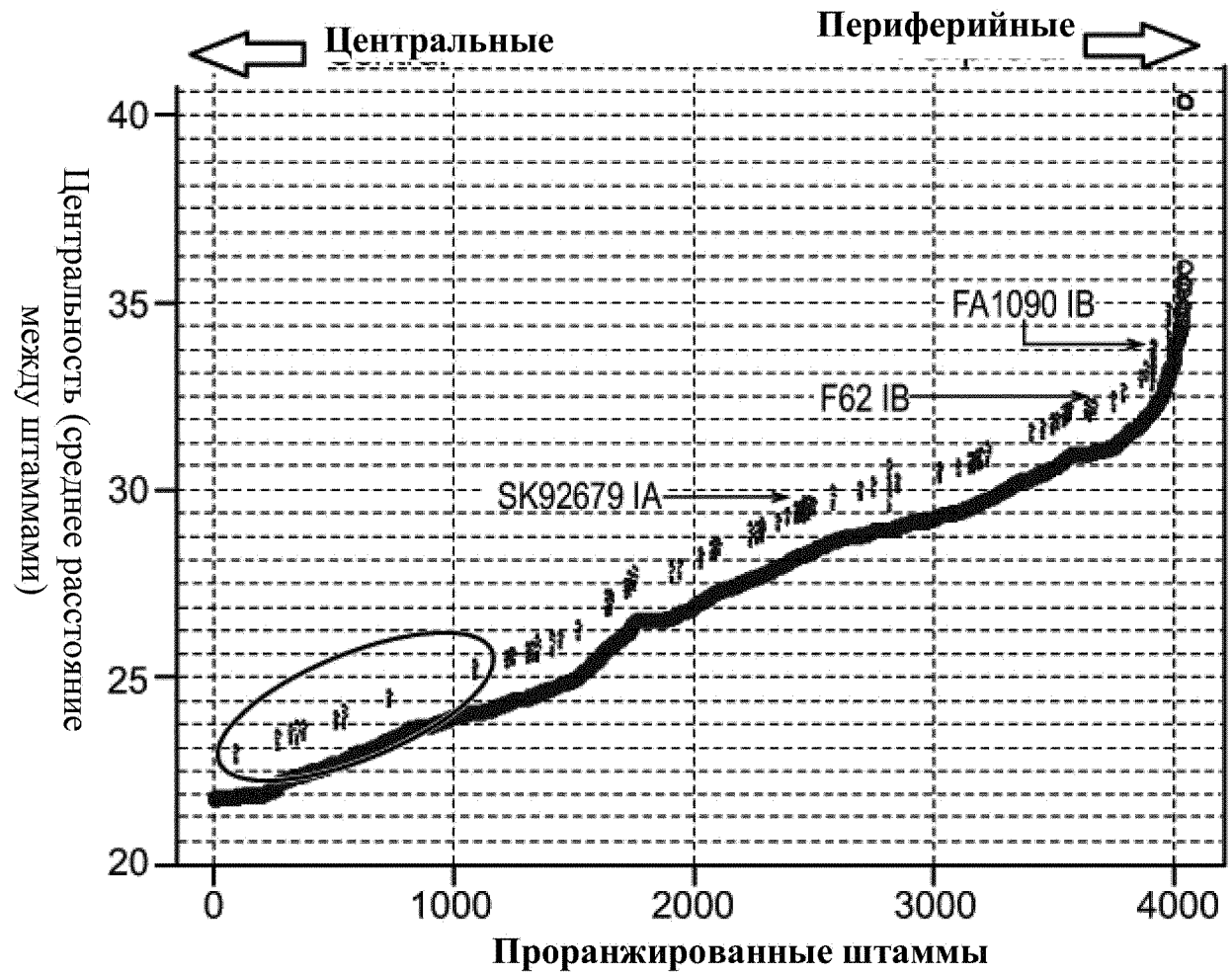
188
98
62
49
38
27
6
3



RmpM
белок мутности В
белок мутности D

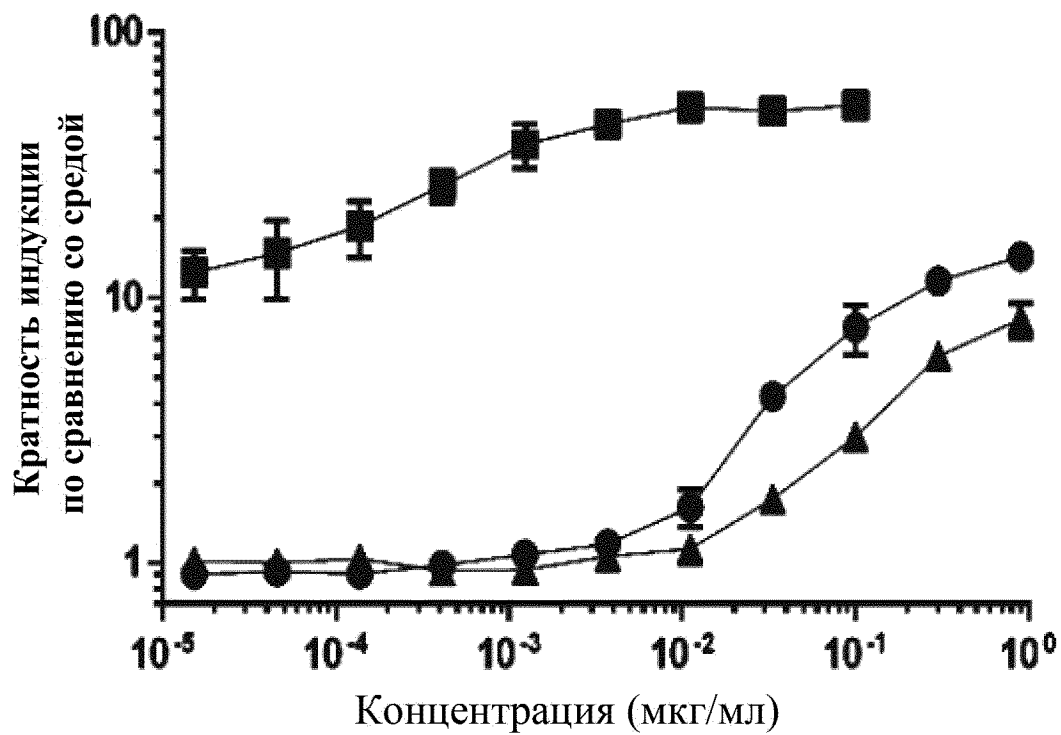
белок мутности В
белок мутности D

Фиг. 17
Центральность



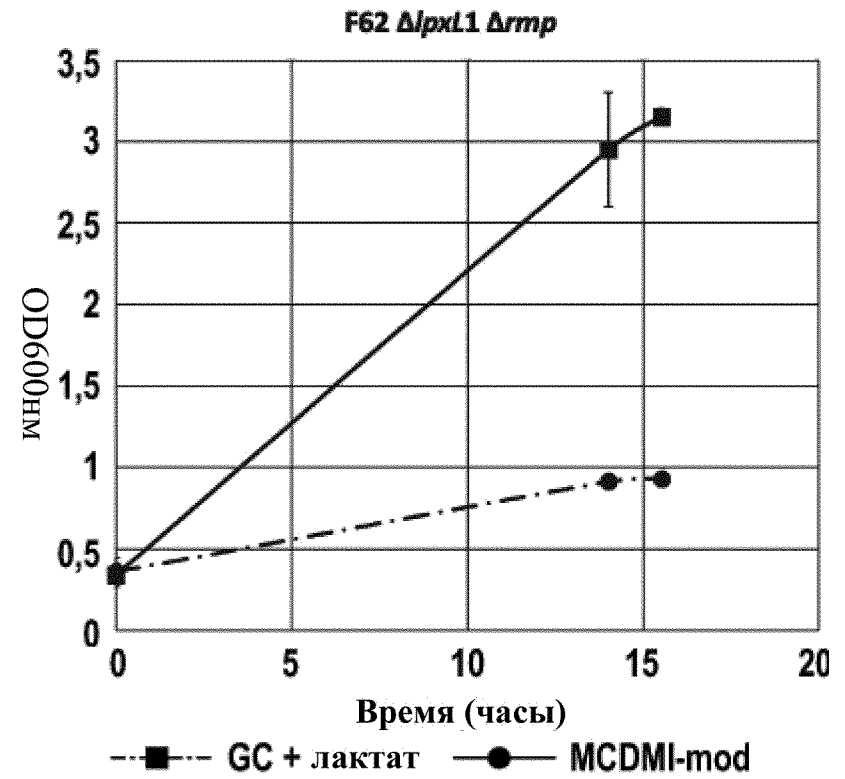
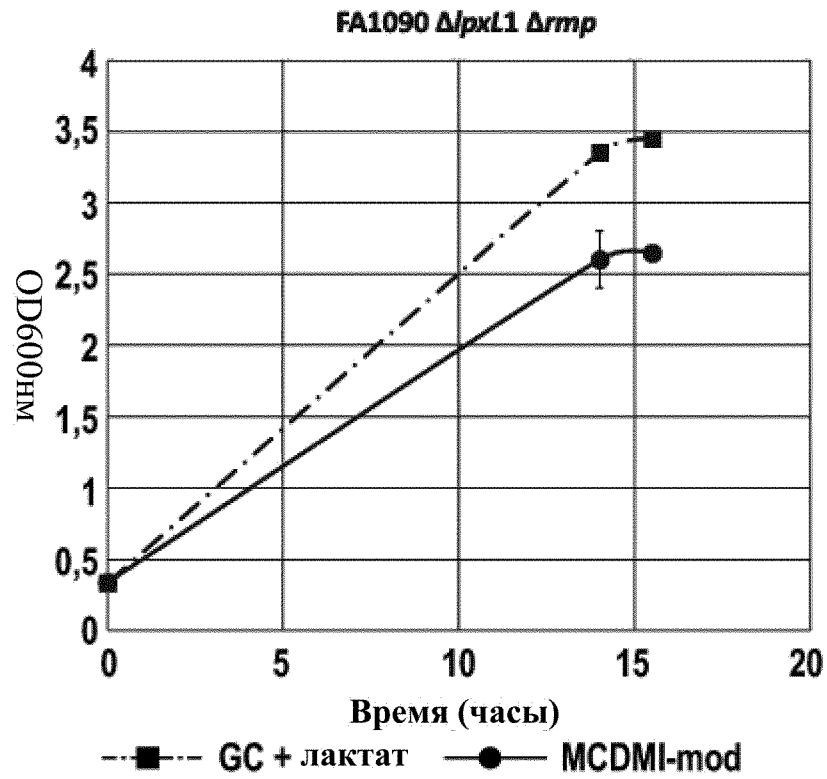
Фиг. 18

Активация hTLR4

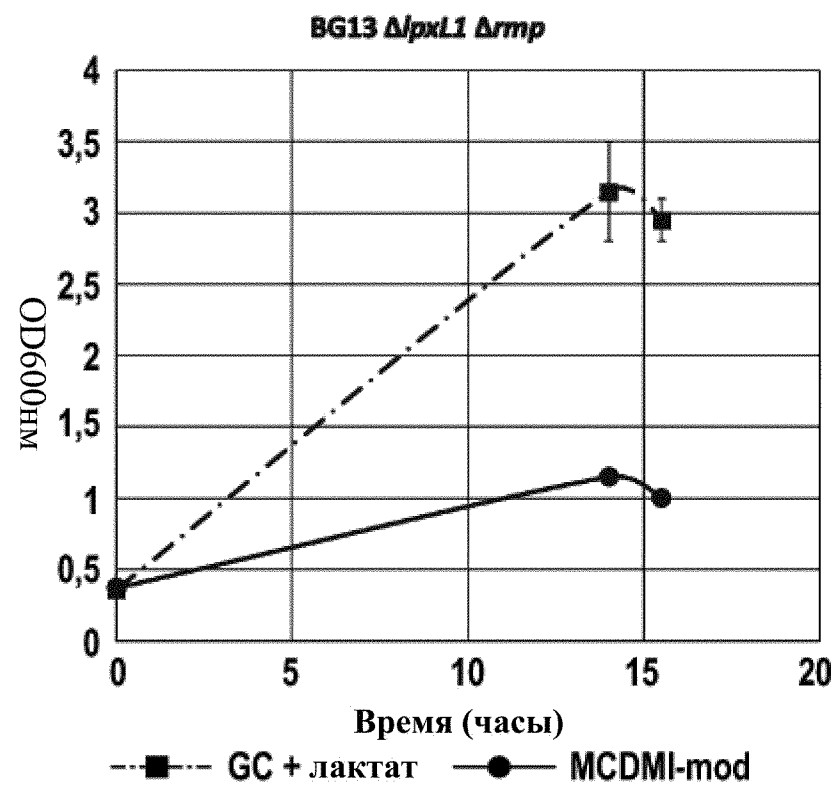
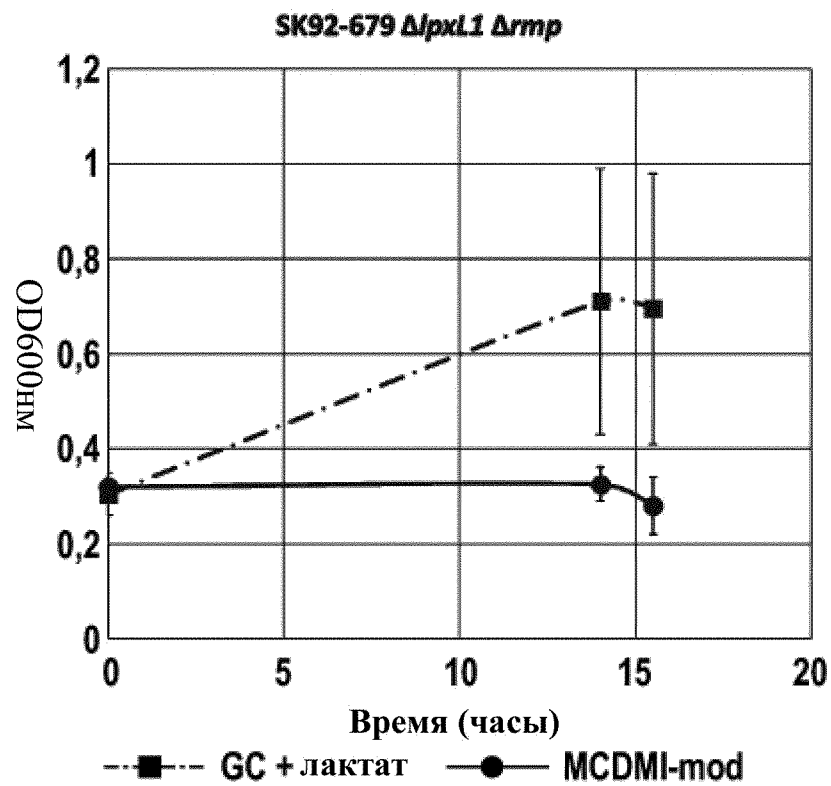


- FA1090 nOMV
- FA1090 Δ lpxL1 (#GMMA2)
- ▲ FA1090 Δ lpxL1 Δ gmpM (GMMA3)

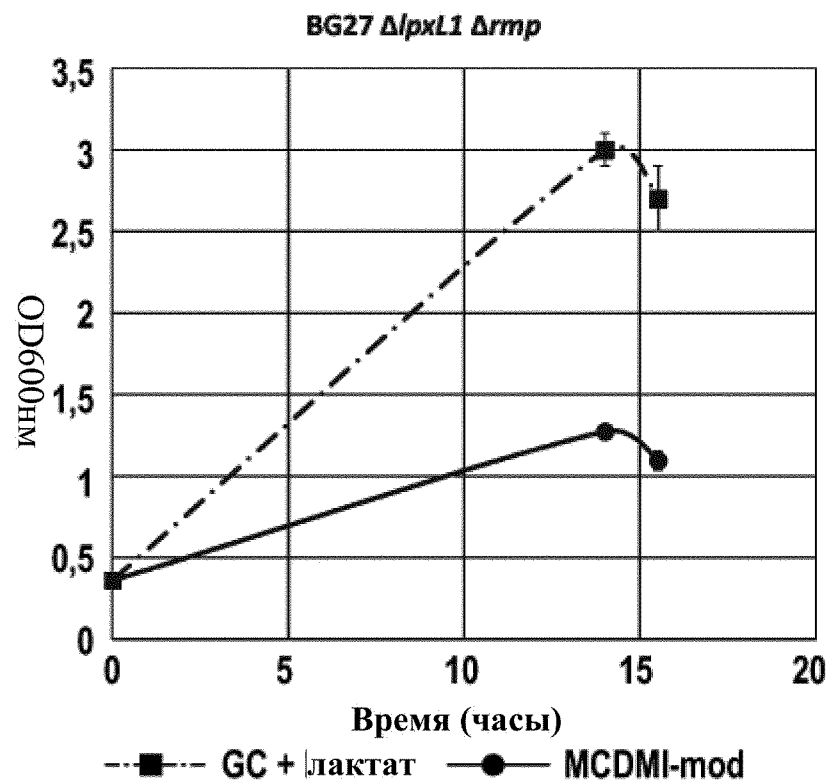
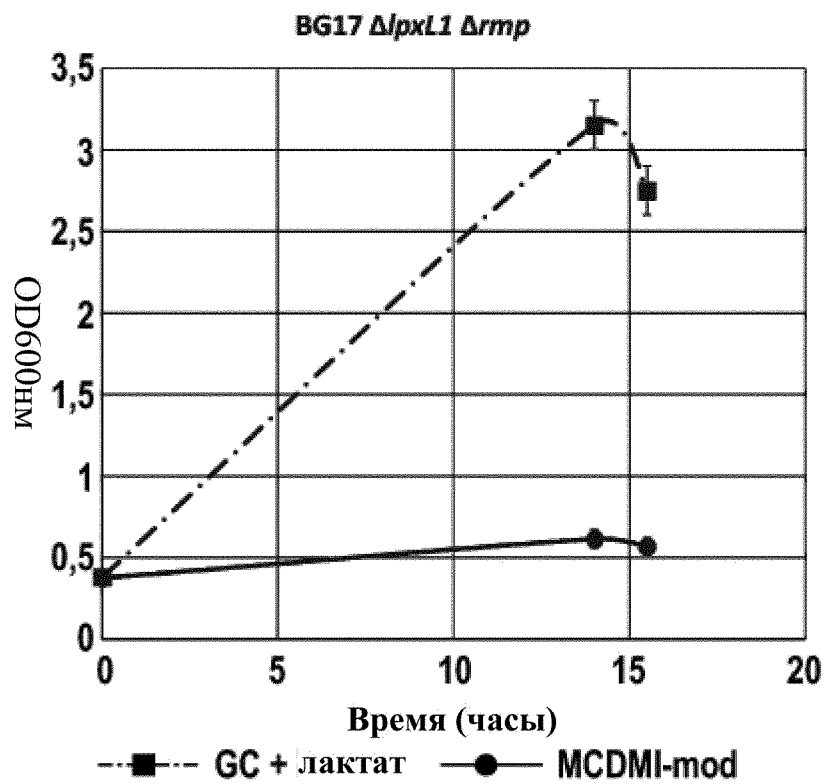
Фиг. 19



Фиг. 19 (прод.)

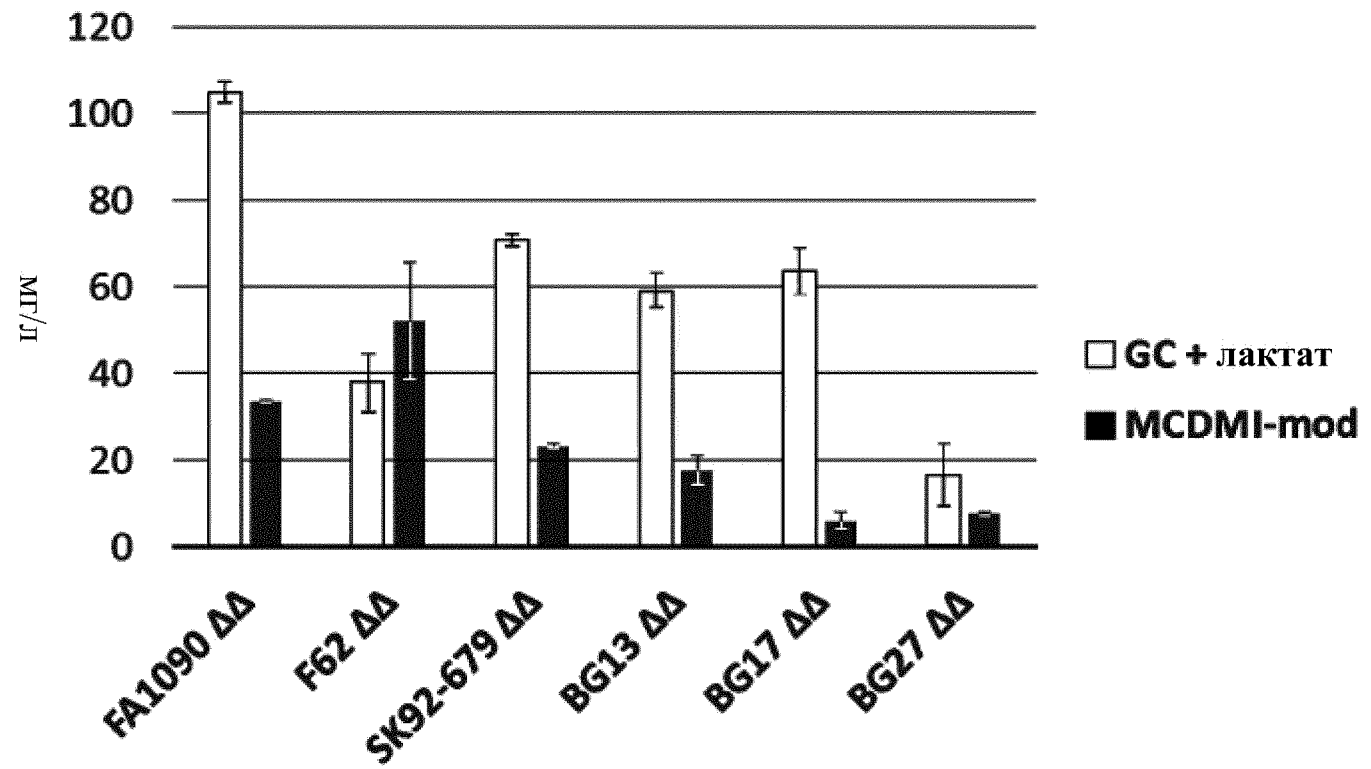


Фиг. 19 (прод.)



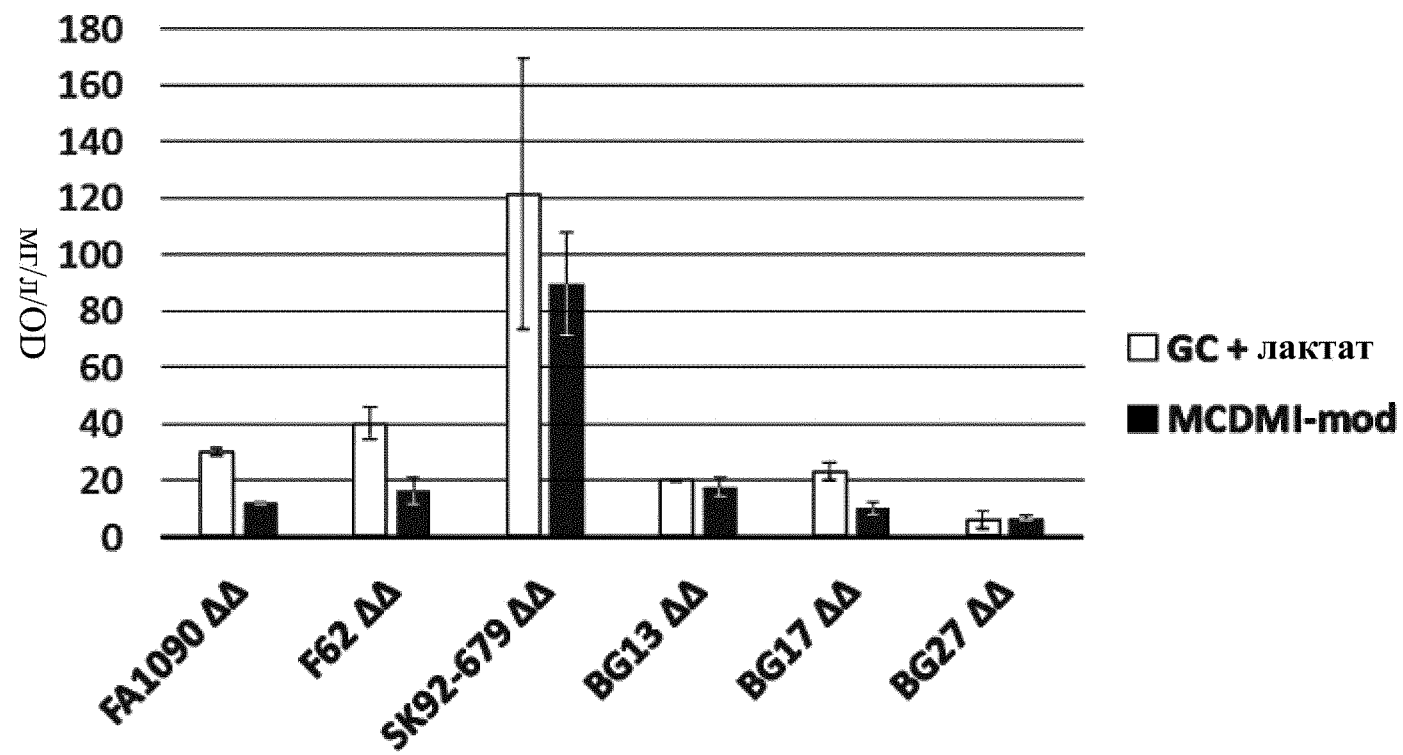
Фиг. 20А

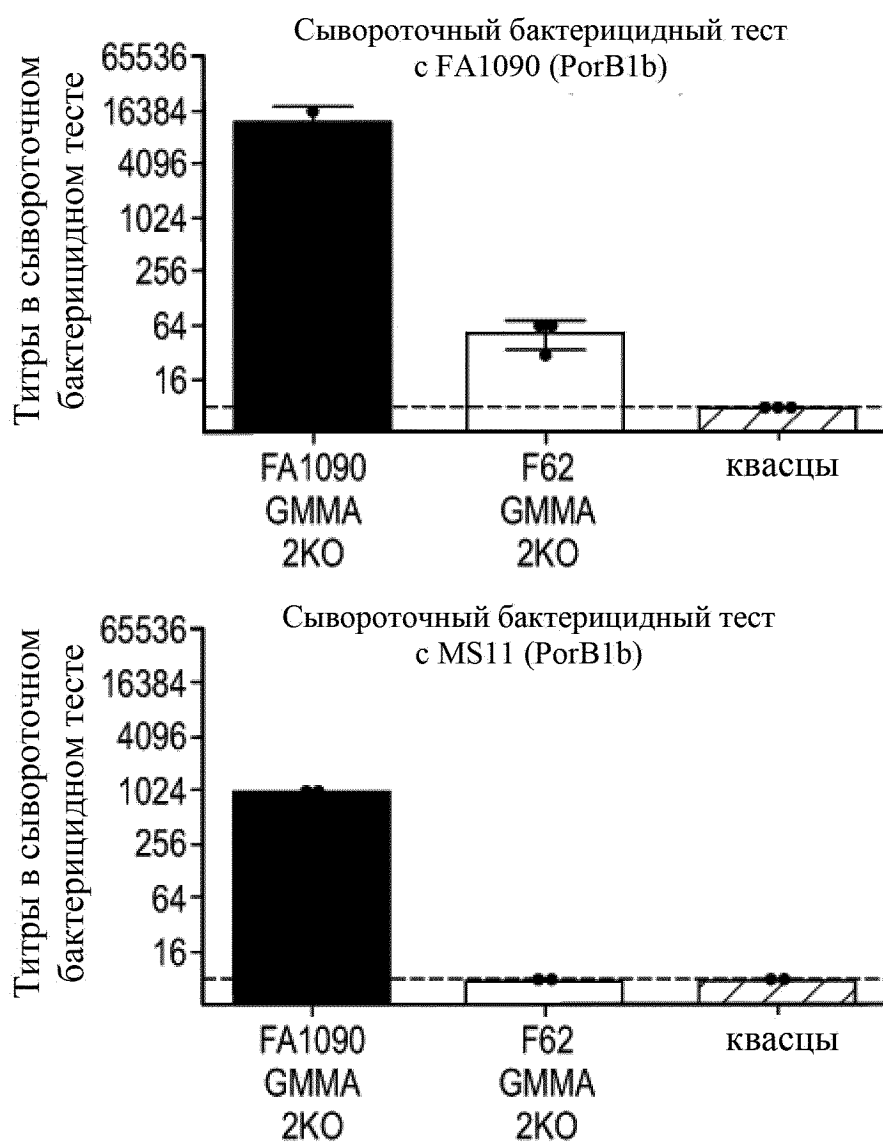
Объемная продуктивность



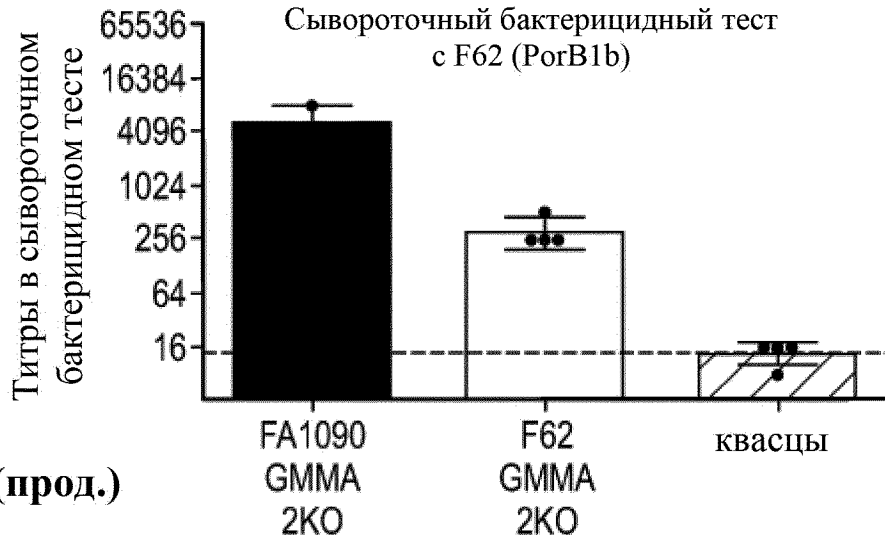
Фиг. 20В

Объемная продуктивность

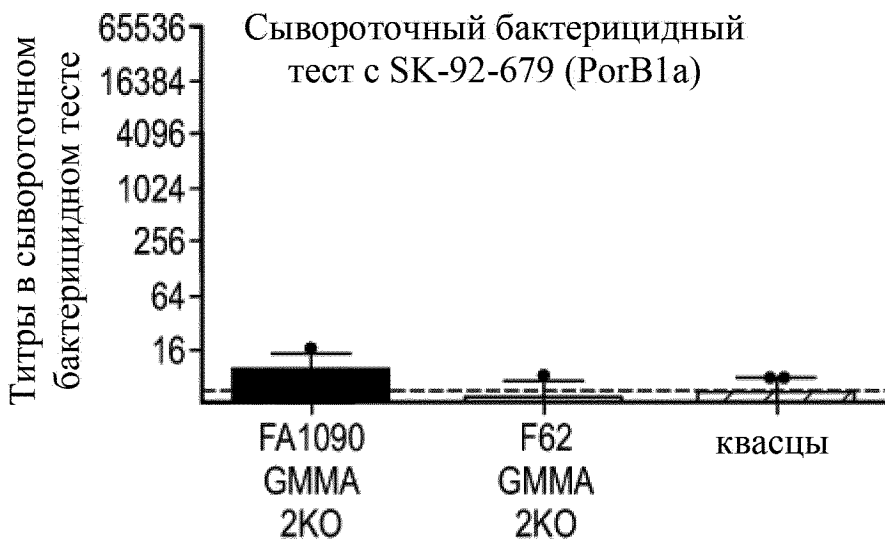
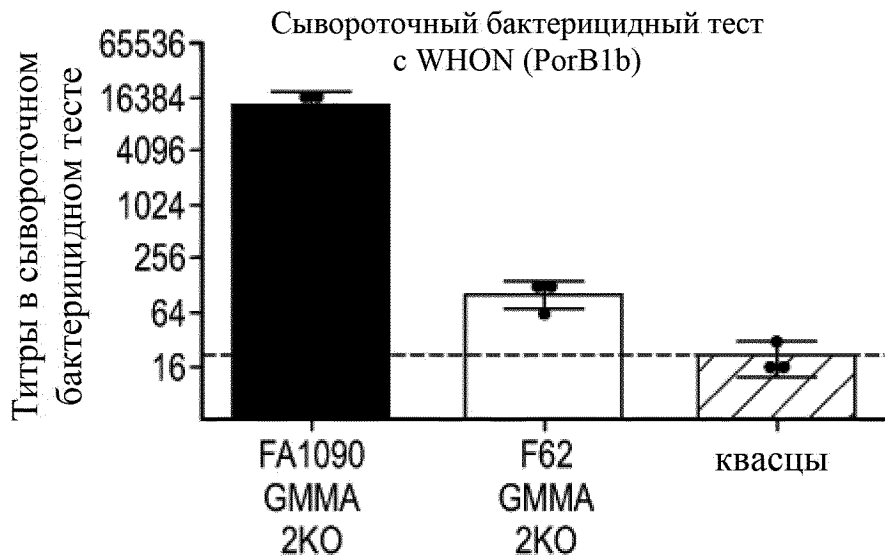


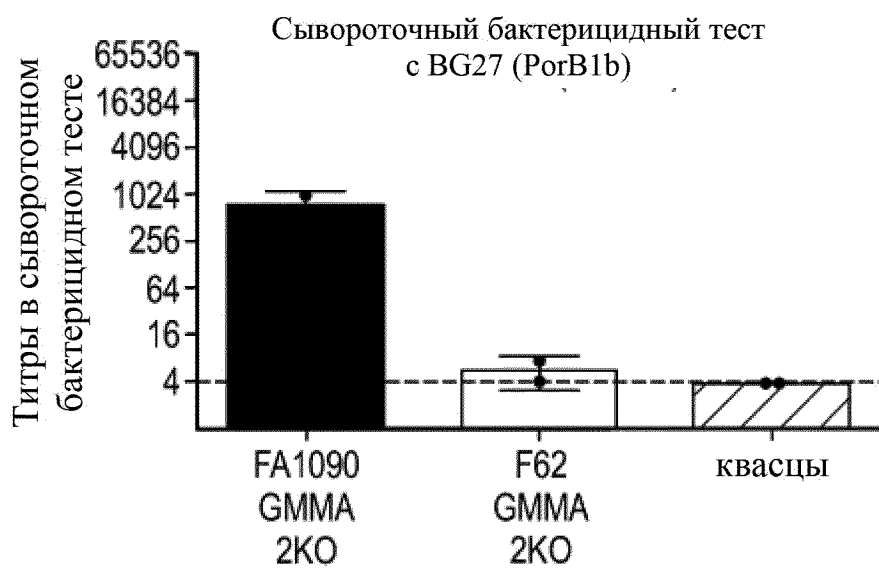
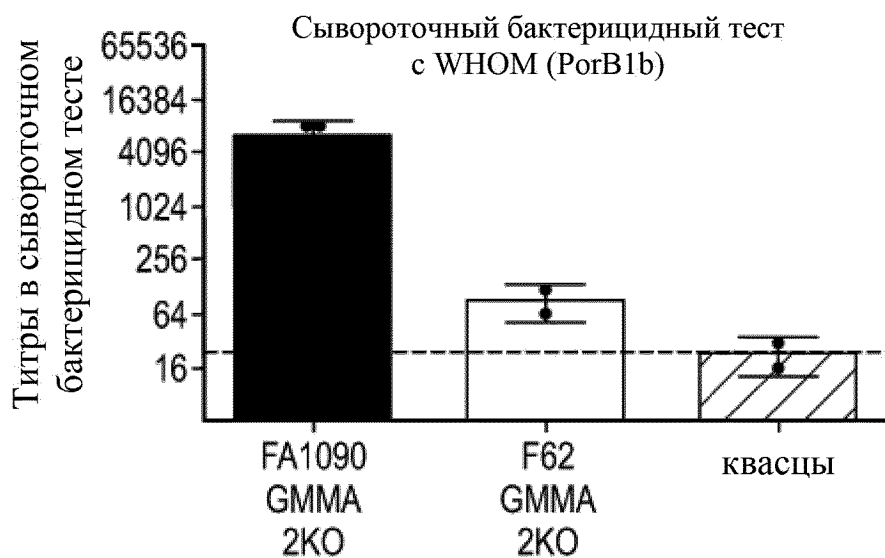


Фиг. 21



Фиг. 21 (прод.)

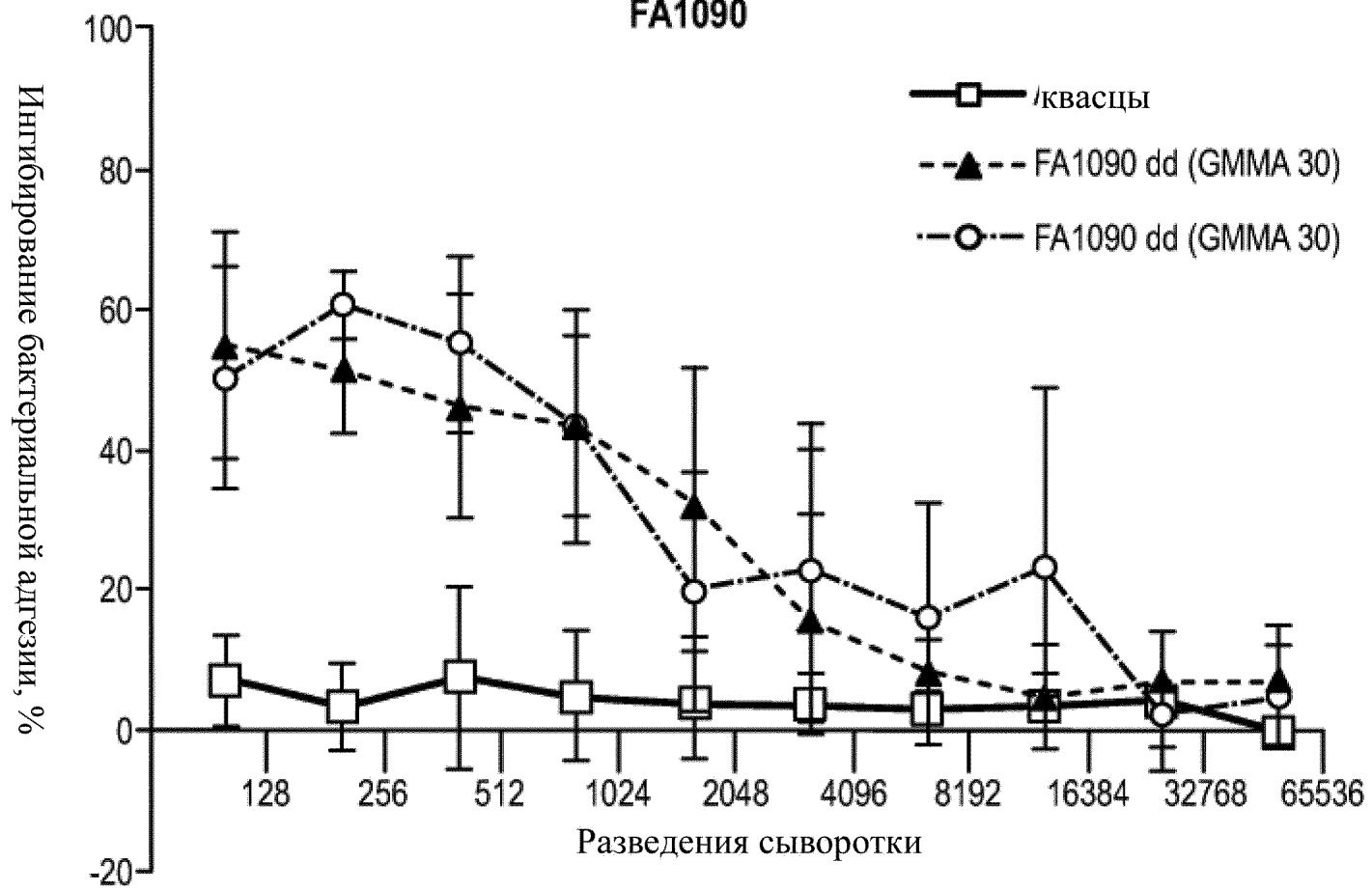




Фиг. 21 (прод.)

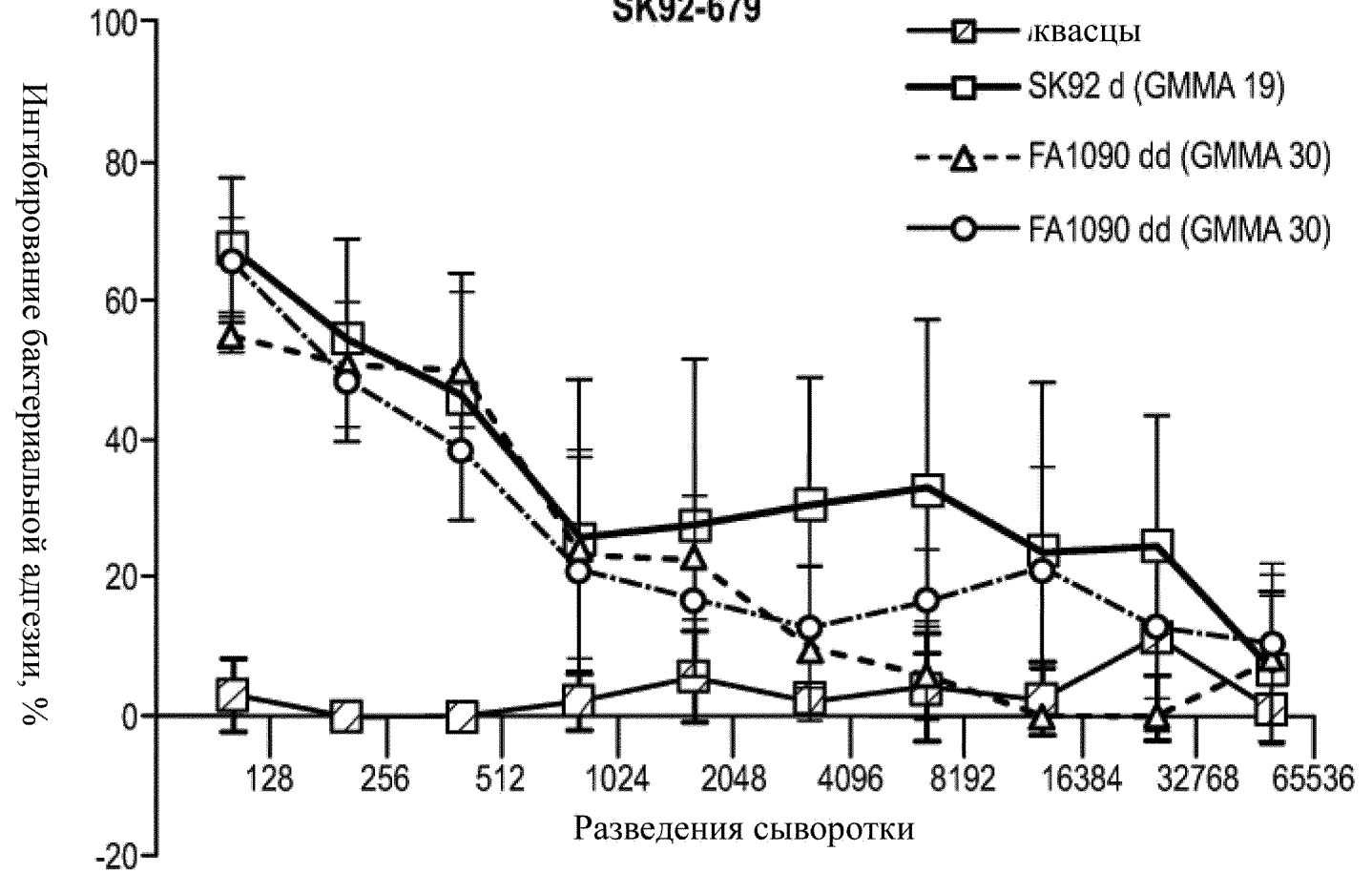
Фиг. 22А

FA1090

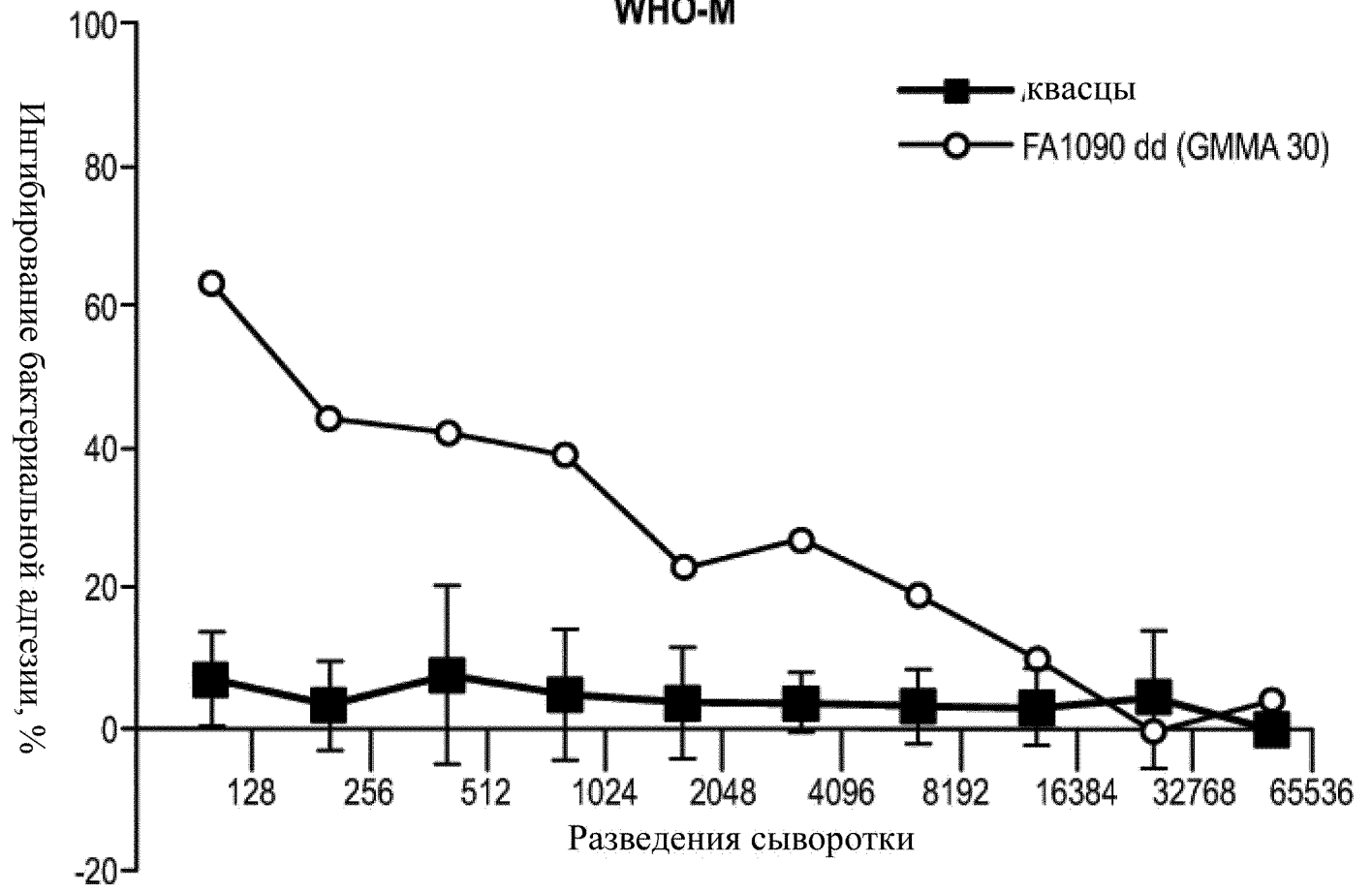


Фиг. 22В

SK92-679

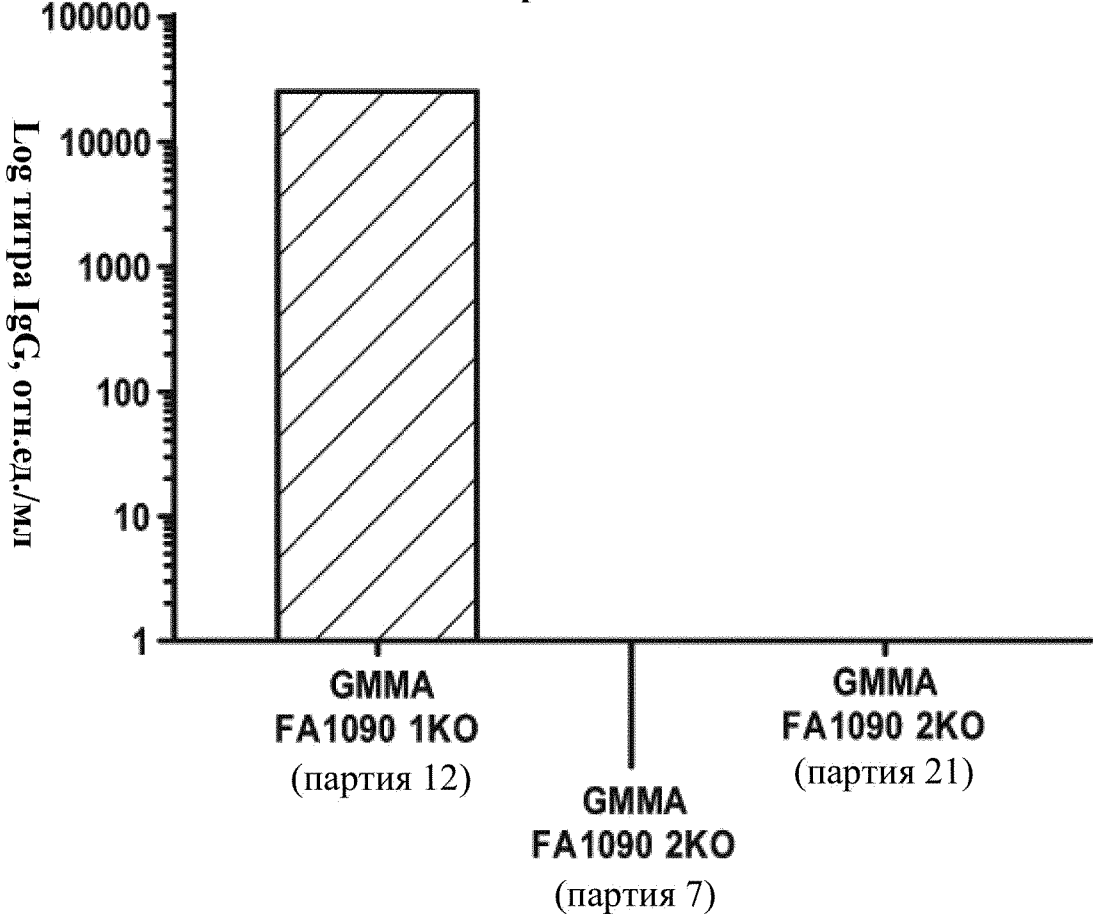


Фиг. 22С
WHO-M



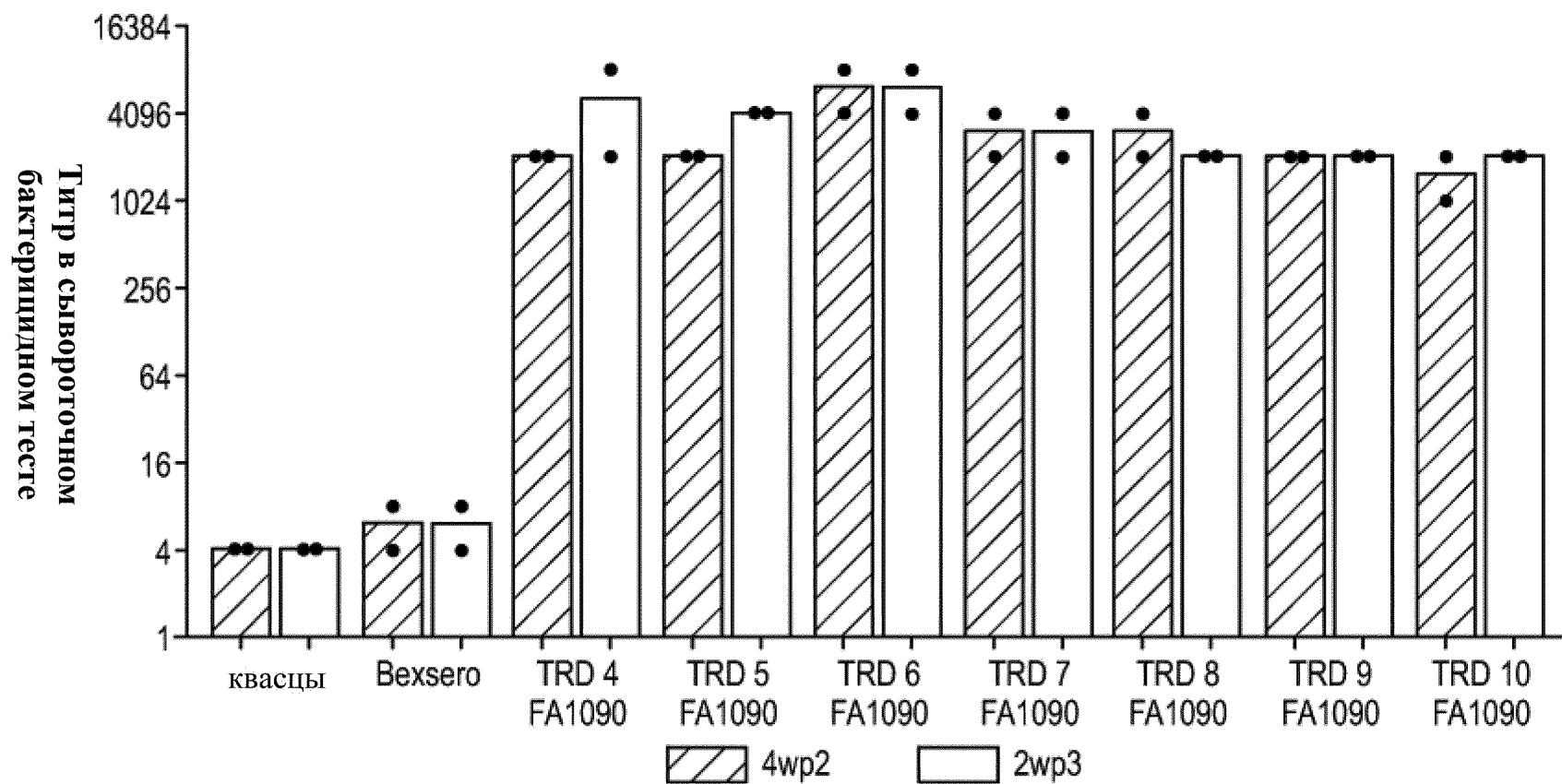
Фиг. 23

**Исследование Lumineх с частицами,
покрытыми RMP**



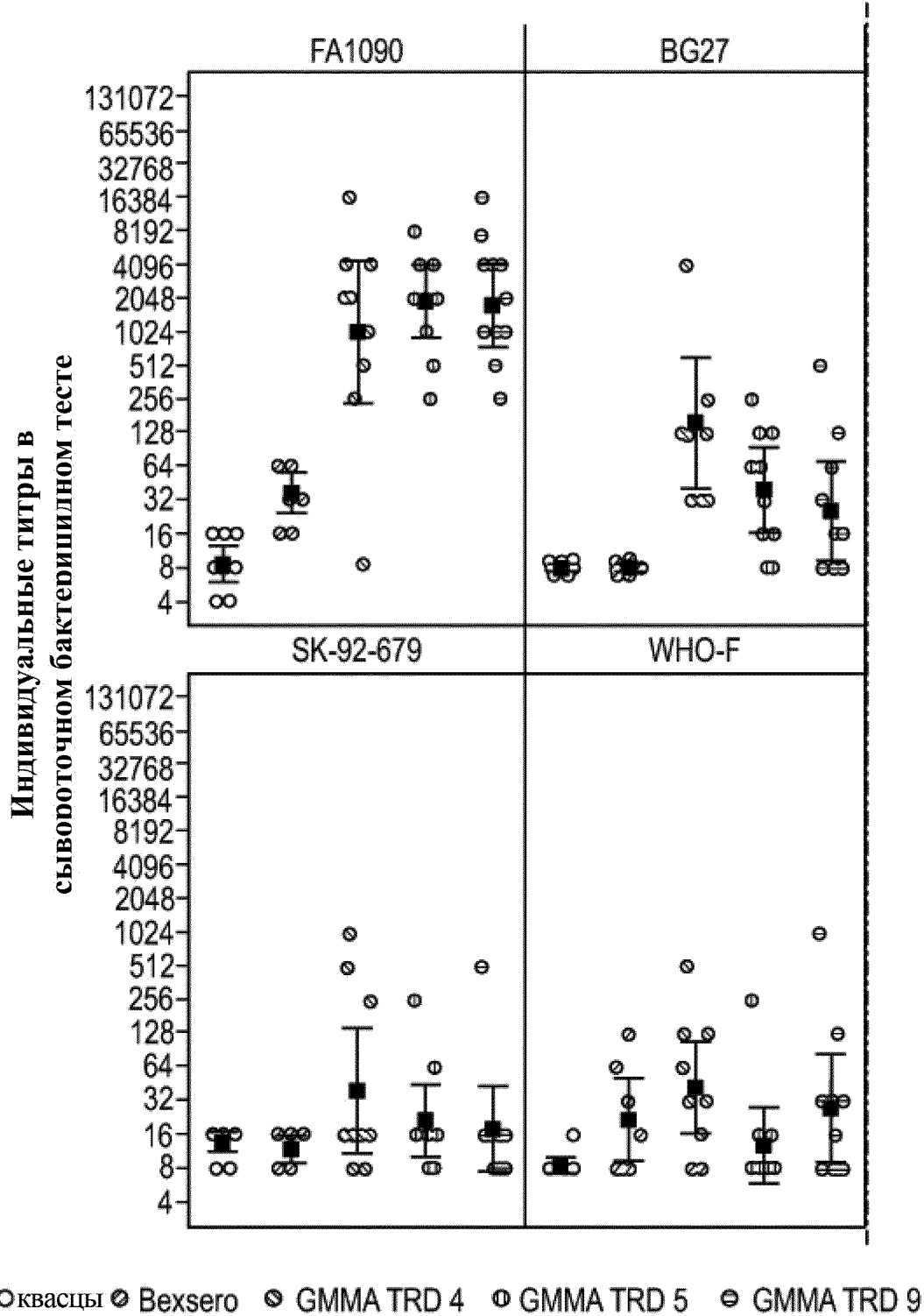
Фиг. 24

Титры hSBA объединенной сыворотки 4wp2 и 2wp3 против гомологичного FA1090 штамма FA1090



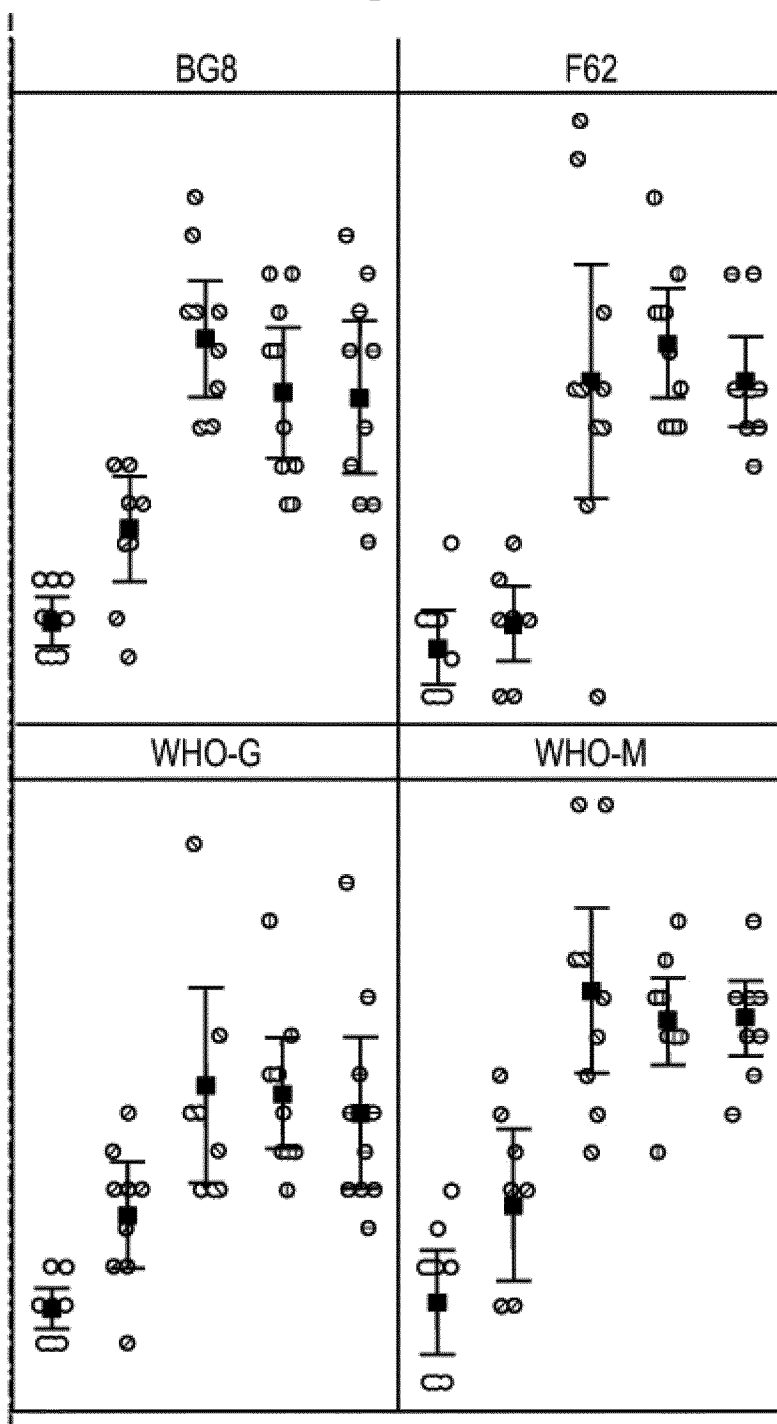
Фиг. 25А

Индивидуальные титры hSBA на 2wp3 против
гомологичных и гетерологичных штаммов NG



Фиг. 25А (прод.)

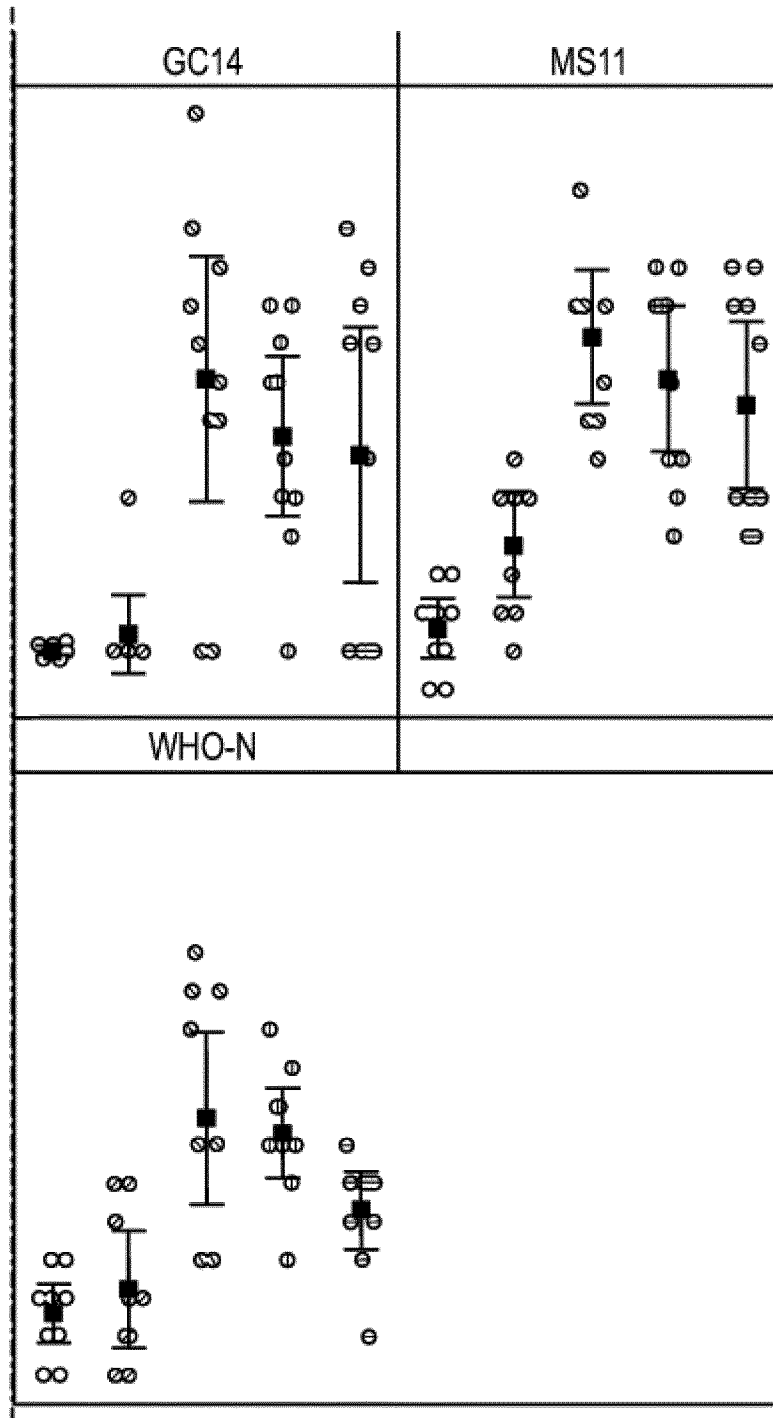
Индивидуальные титры hSBA на 2wp3 против
гомологичных и гетерологичных штаммов NG



Оквасцы ● Bexsero ○ GMMA TRD 4 ○ GMMA TRD 5 ○ GMMA TRD 9

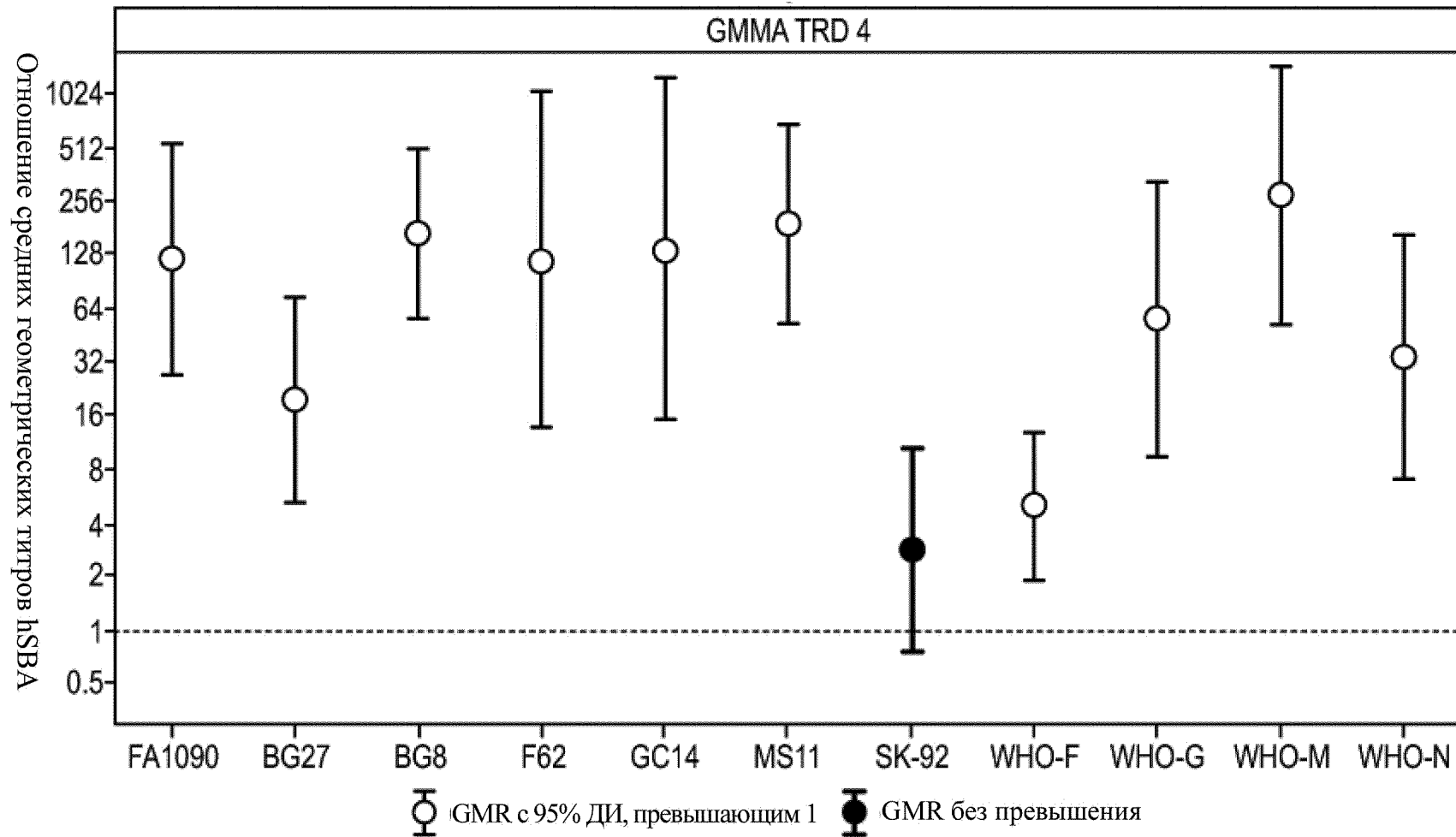
Фиг. 25А (прод.)

Индивидуальные титры hSBA на 2wr3 против
гомологичных и гетерологичных штаммов NG

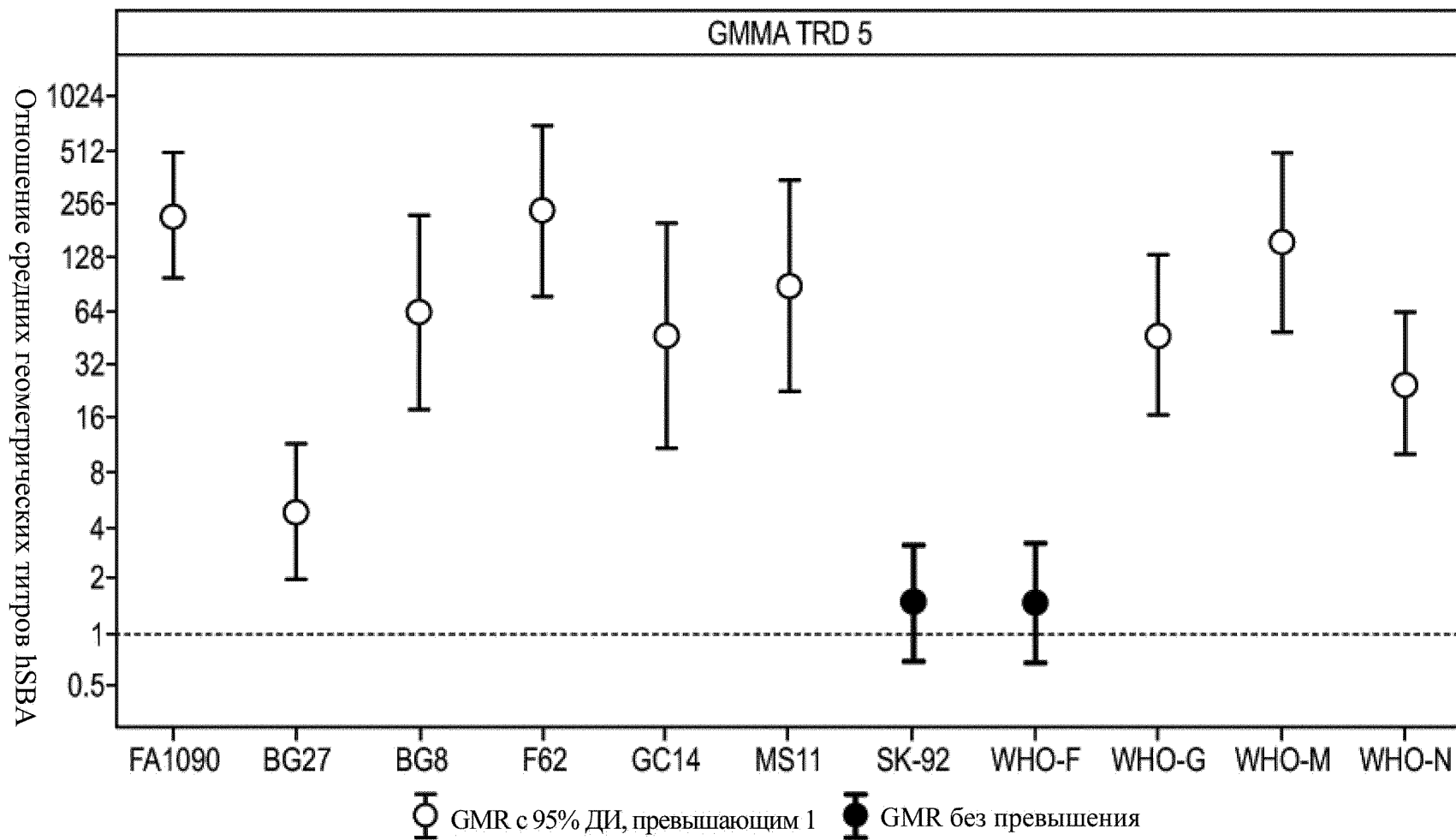


○ квасцы ● Bexsero ◌ GMMA TRD 4 ◐ GMMA TRD 5 ◑ GMMA TRD 9

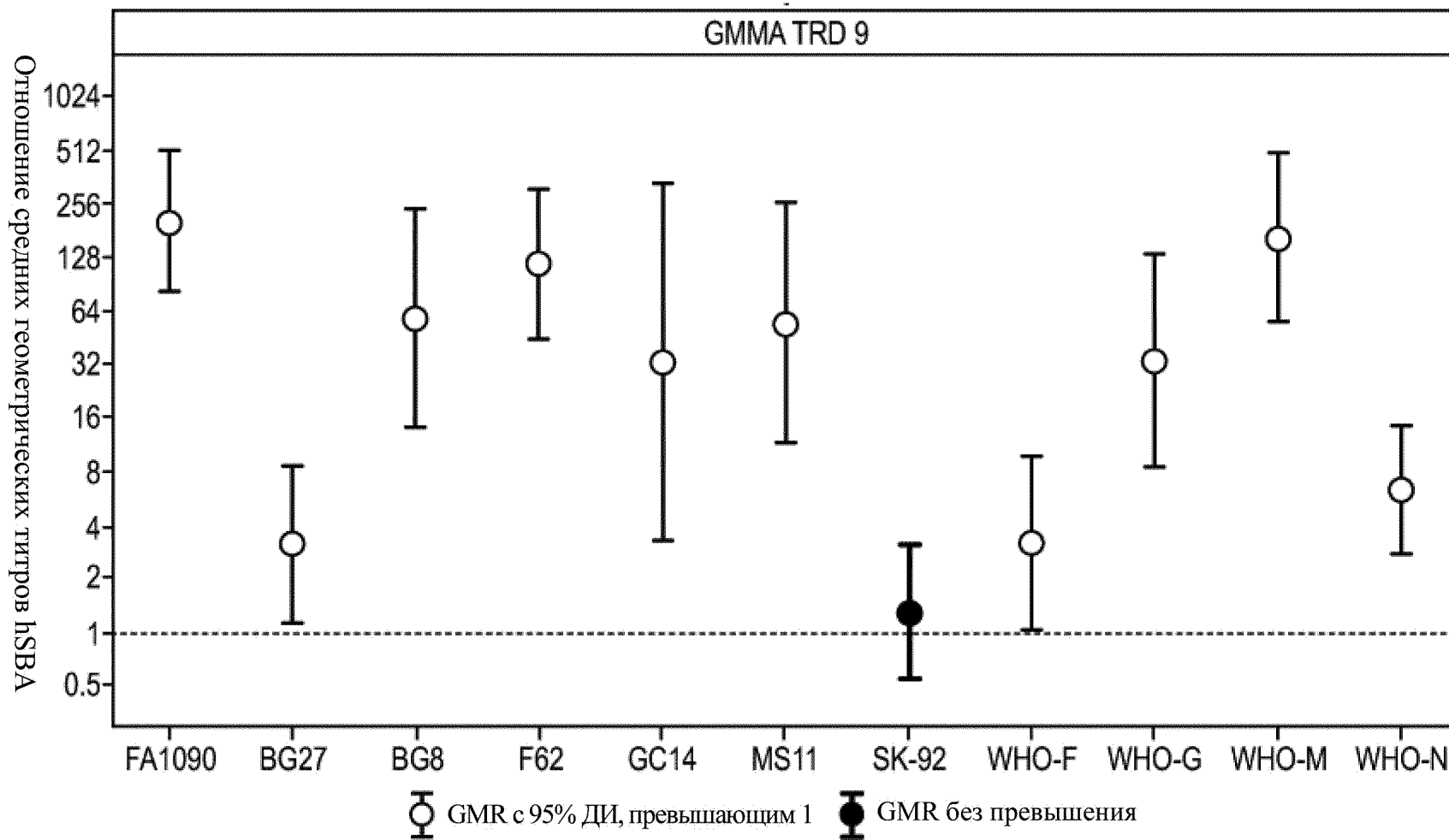
Фиг. 25В Отношение геометрических средних титров hSBA 2wp3: сравнение с квасцами
Сравнение hSBA GMR с квасцами



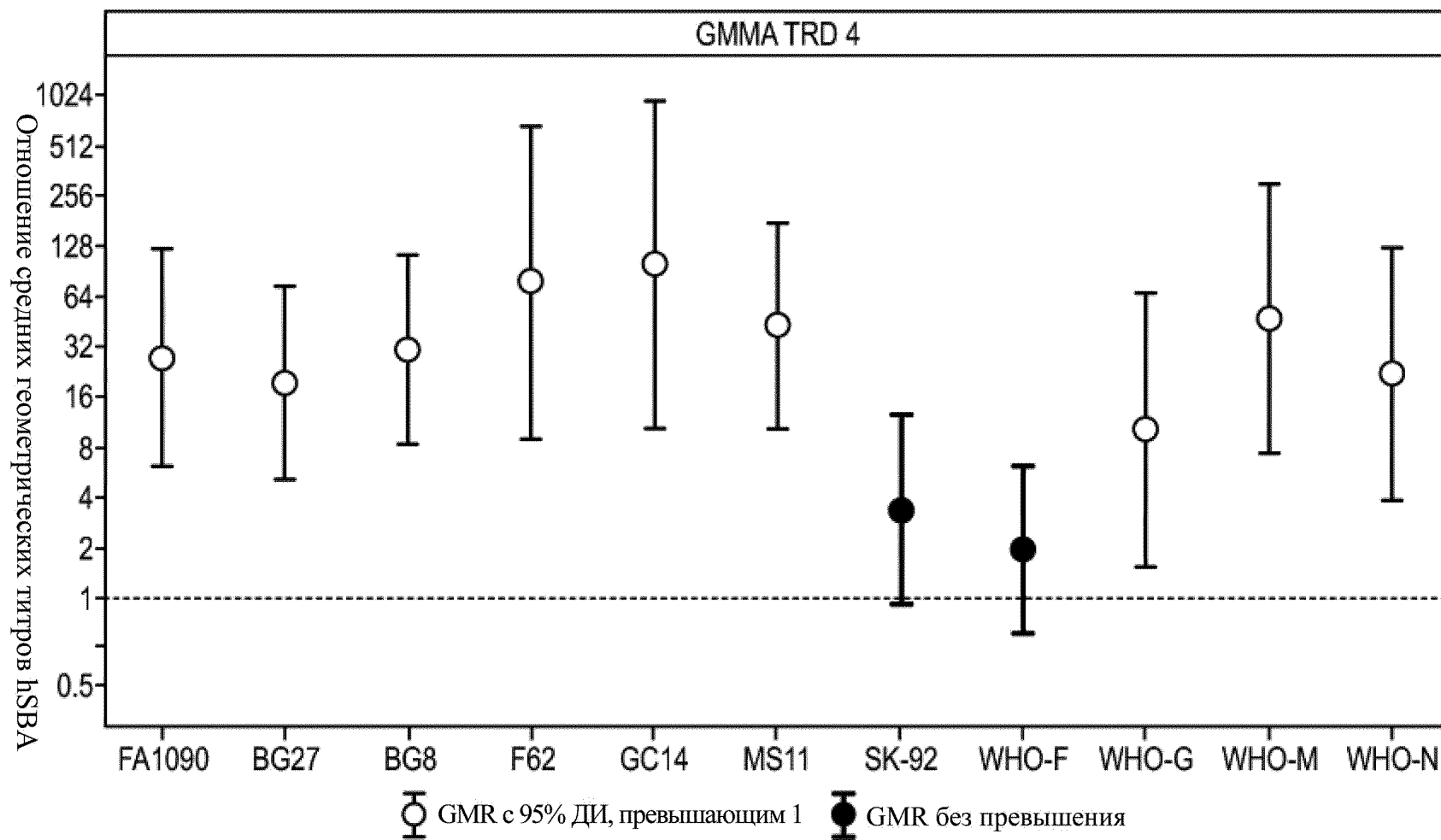
Фиг. 25В (прод.) Отношение геометрических средних титров hSBA на 2wp3: сравнение с квасцами
Сравнение hSBA GMR с квасцами



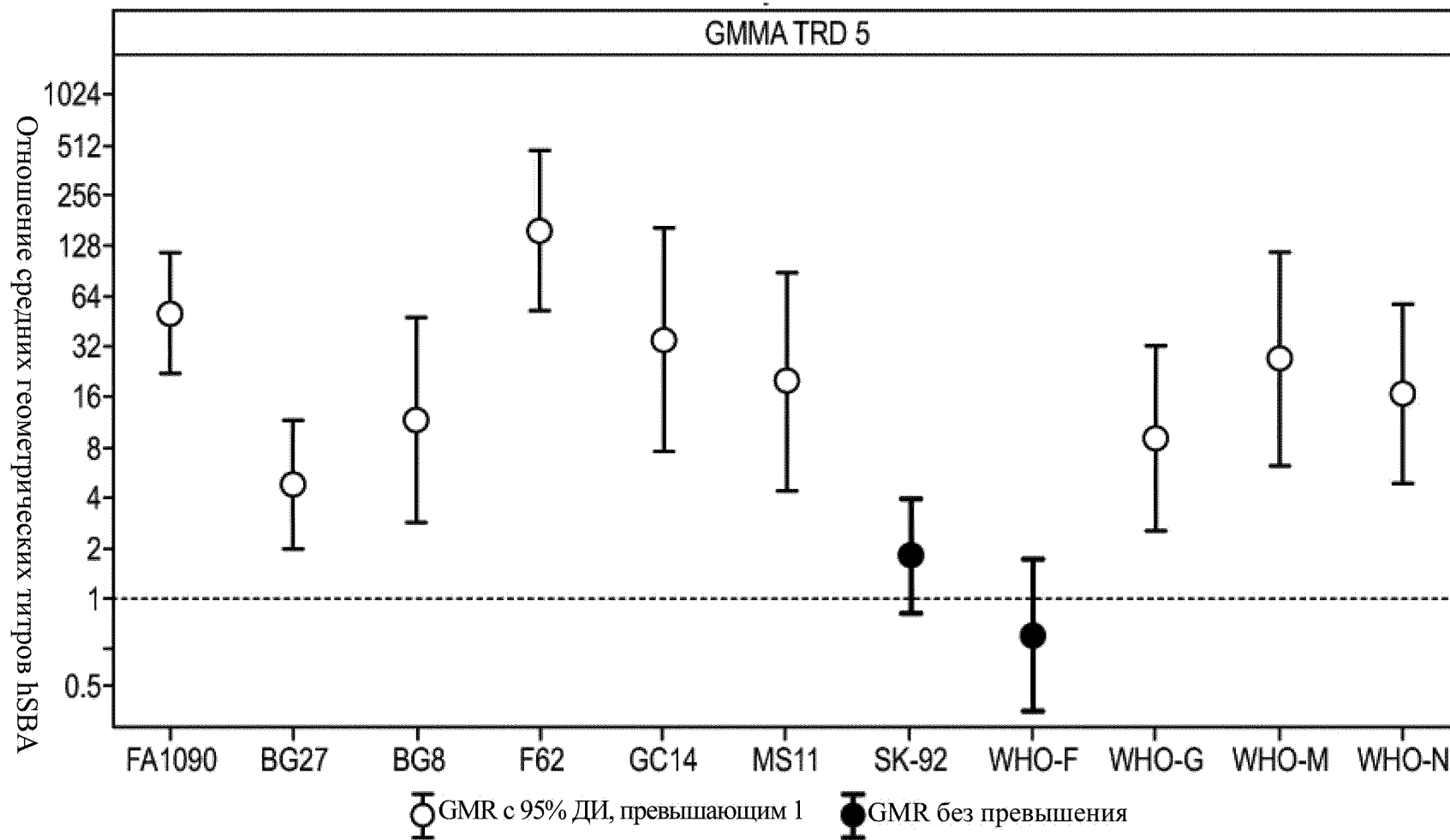
Фиг. 25В (прод.) Отношение геометрических средних титров hSBA на 2wp3: сравнение с квасцами
Сравнение hSBA GMR с квасцами



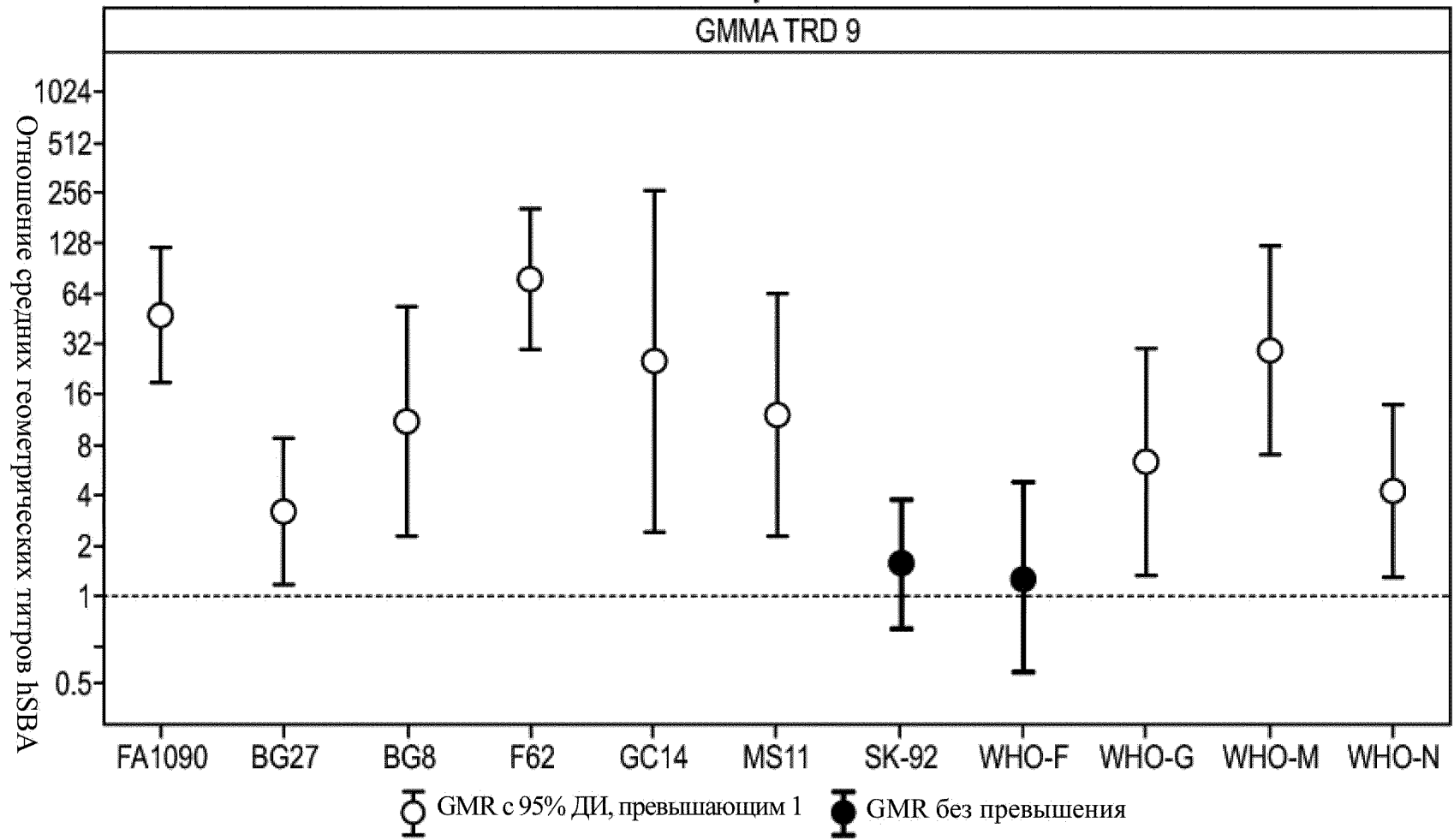
Фиг. 25С Отношение геометрических средних титров hSBA на 2wp3: сравнение с Vexsero
 Сравнение hSBA GMR с Vexsero



Фиг. 25С (прод.) Отношение геометрических средних титров hSBA на 2wp3: сравнение с Bexsero
Сравнение hSBA GMR с Bexsero

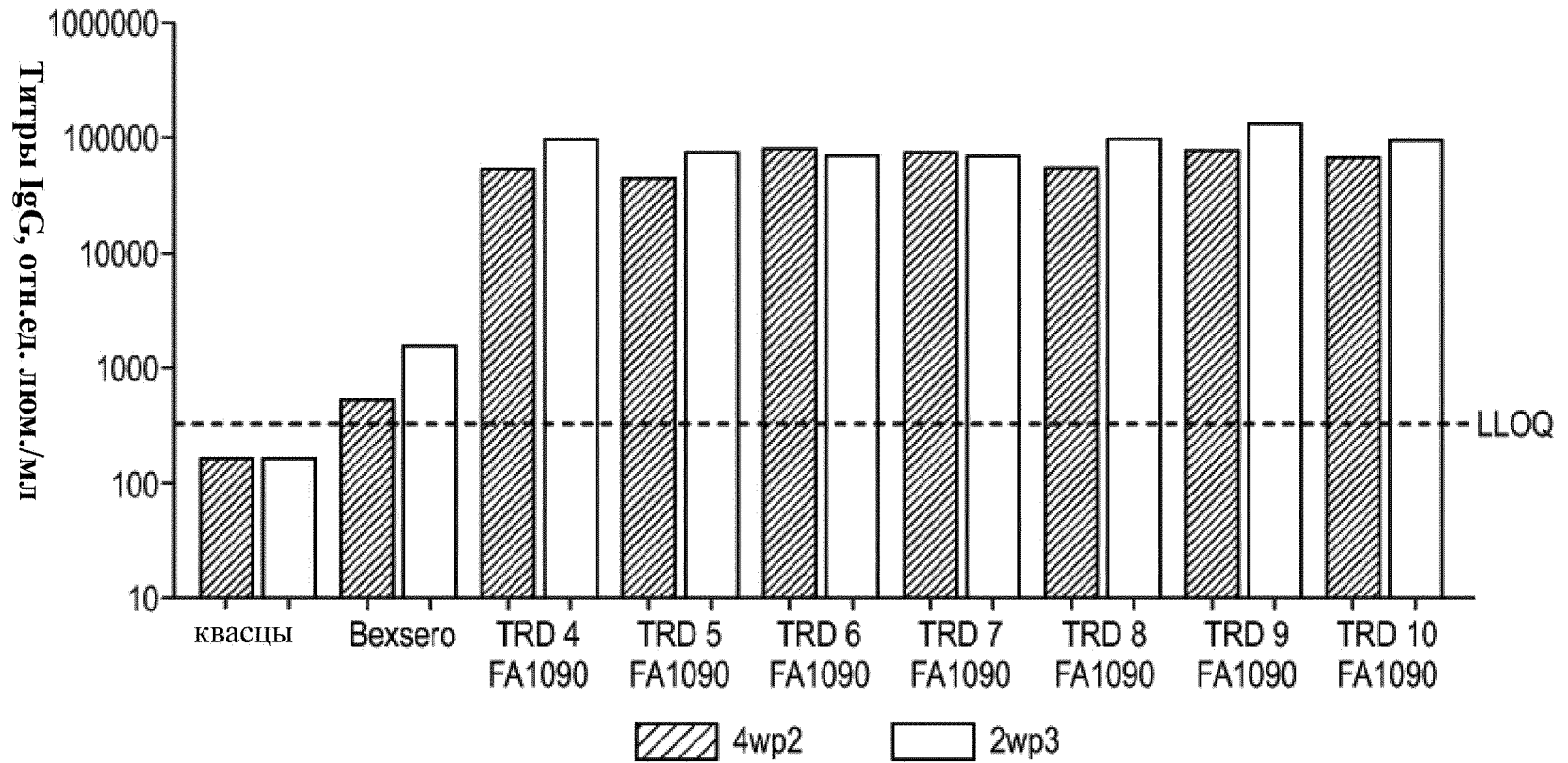


Фиг. 25С (прод.) Отношение геометрических средних титров hSBA на 2wp3: сравнение с Вехсеро
Сравнение hSBA GMR с Вехсеро



Фиг. 26

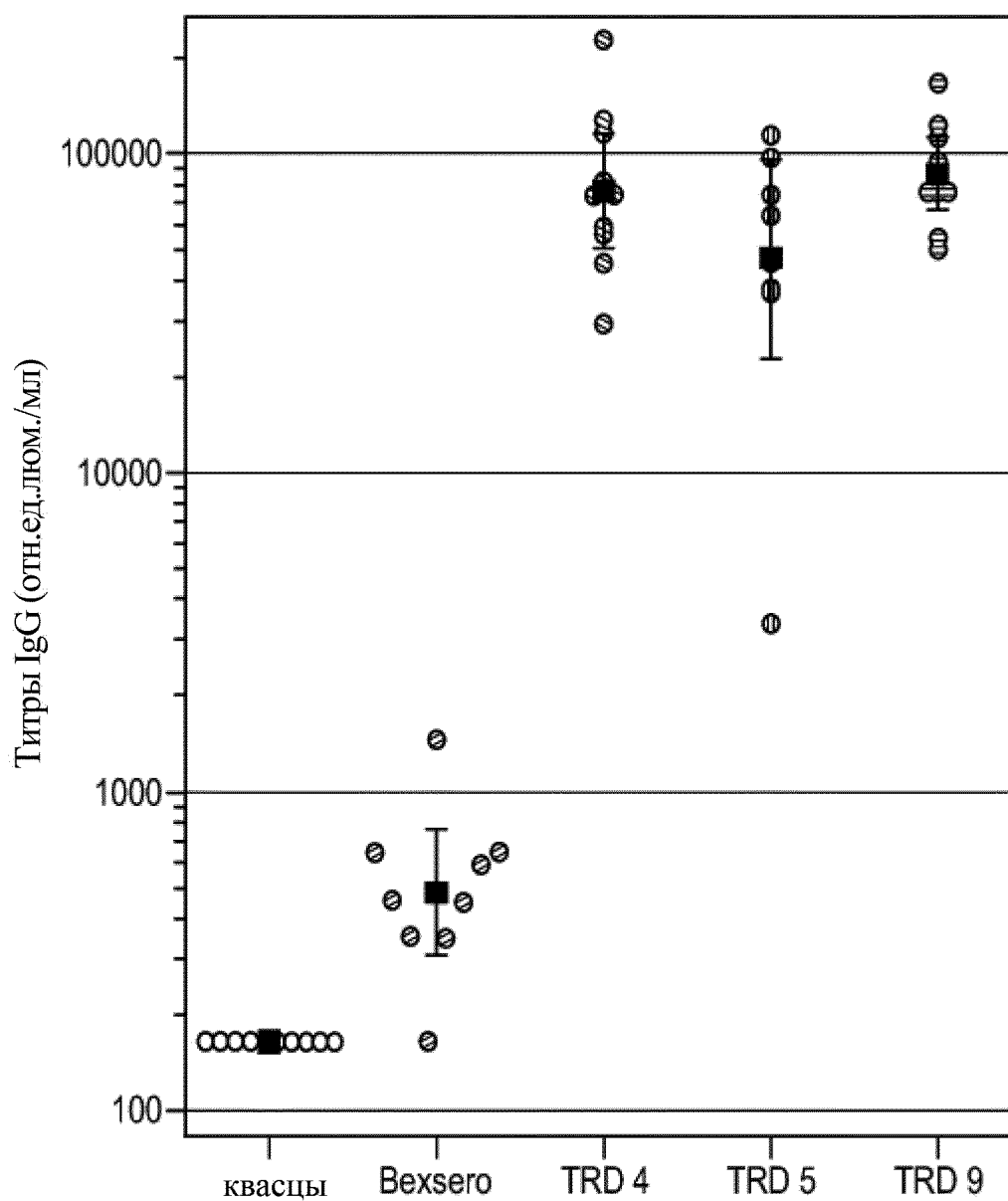
Титры GMMA IgG объединенной сыворотки 4wp2 и 2wp3 против Ng



Фиг. 27А

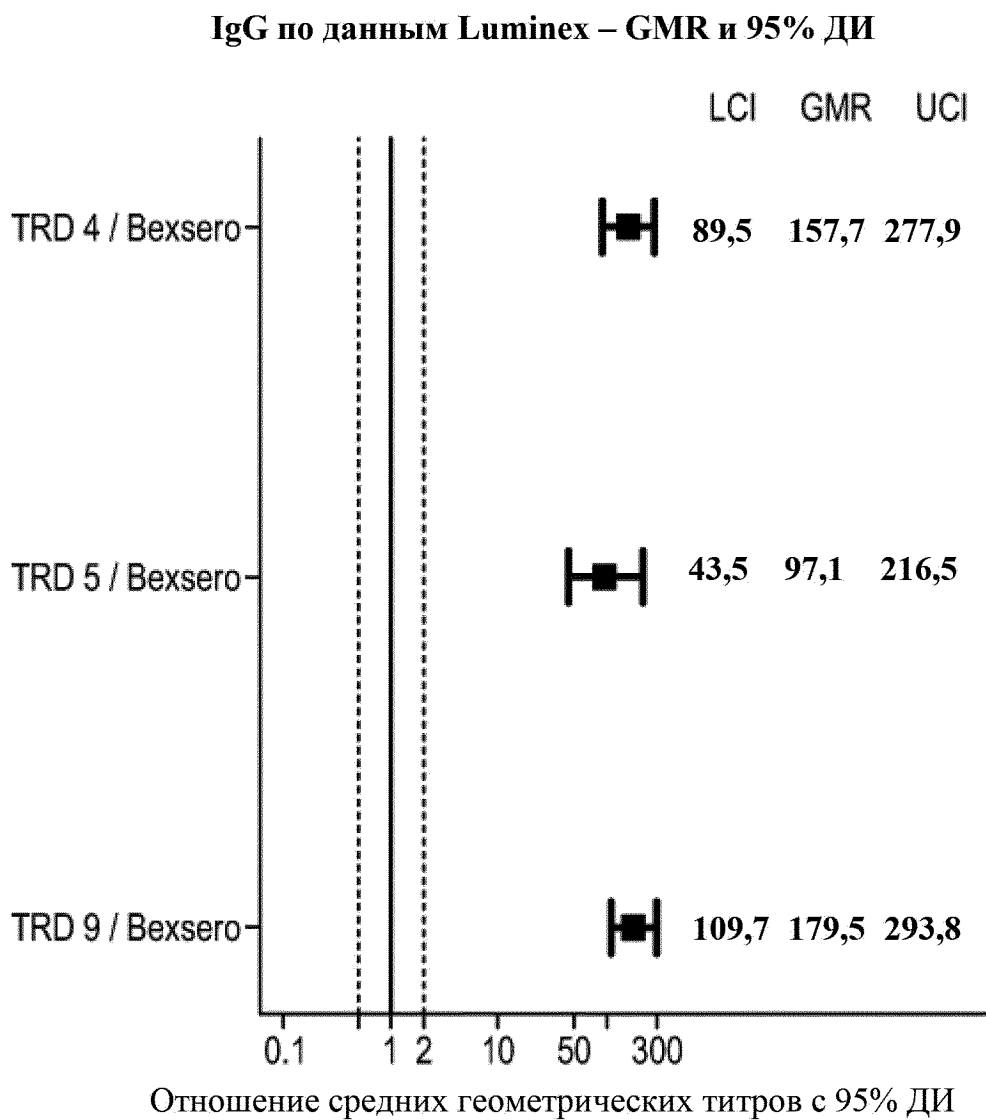
Титры GMMA IgG против Ng в индивидуальных сыворотках 2wp3 с 95% доверительным интервалом

IgG в сыворотках 2wp3 по данным Luminex



Фиг. 27В

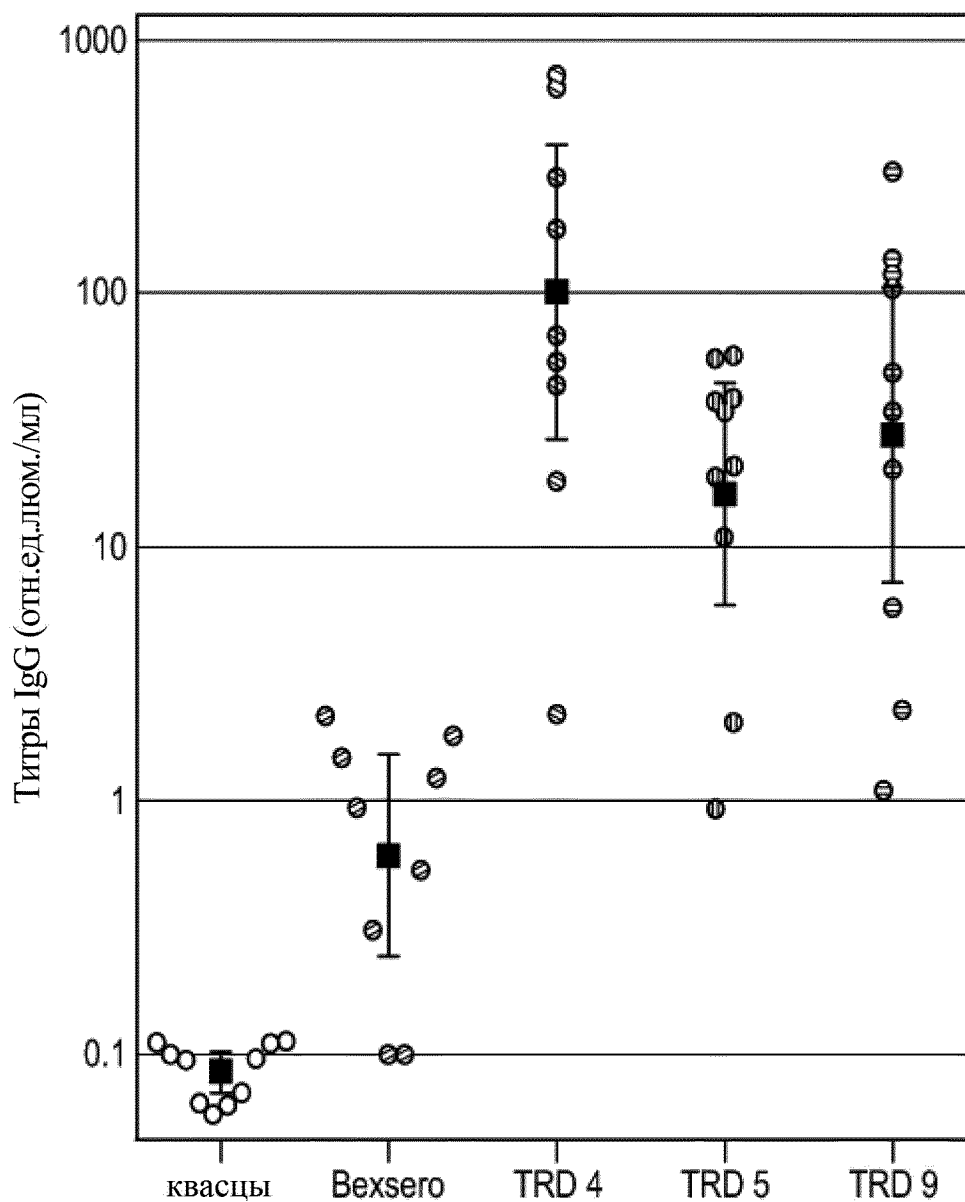
Титры GMMA IgG против Ng в индивидуальных сыворотках 2wp3 с 95% доверительным интервалом



Фиг. 28А

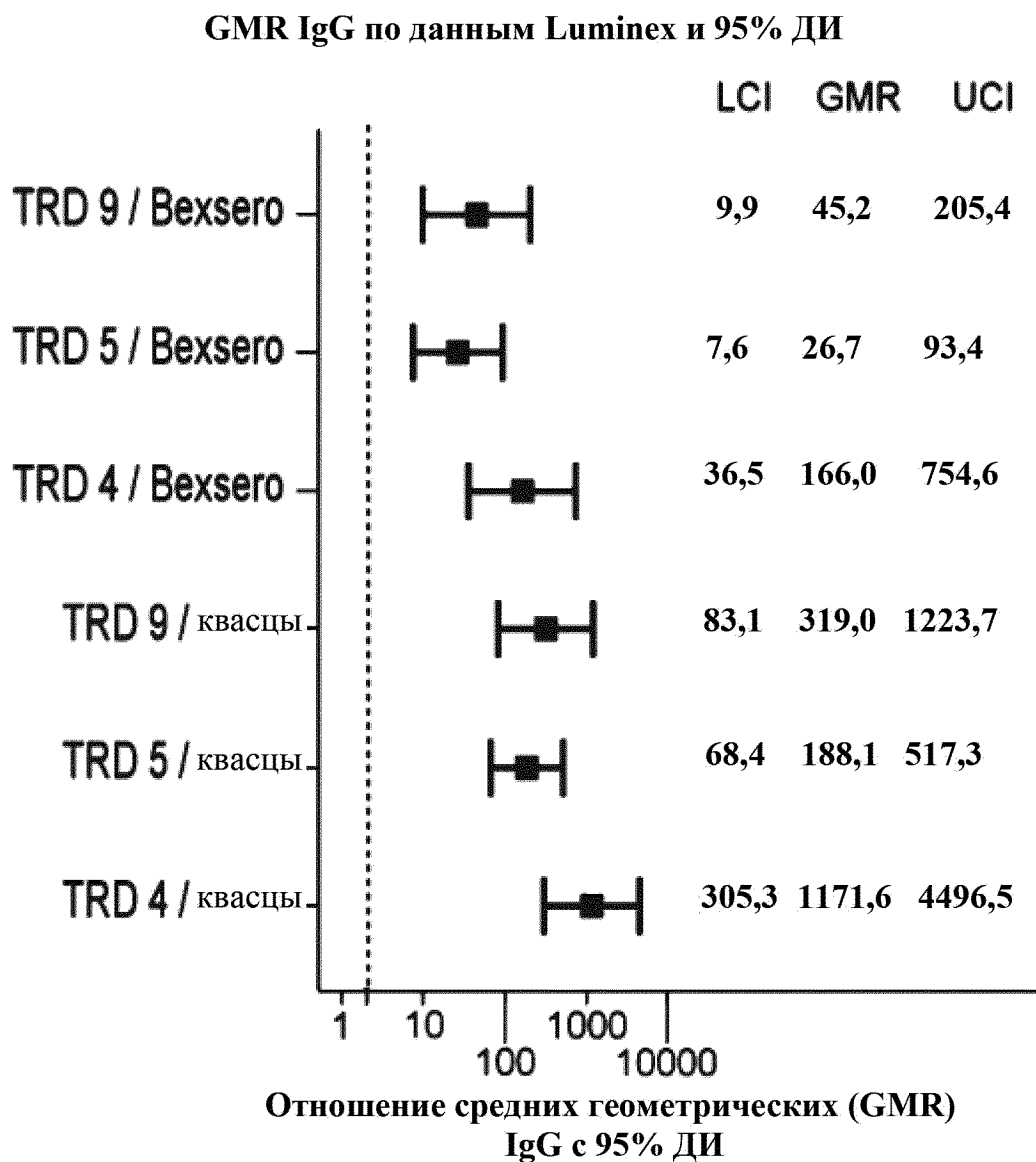
Титры GMMA IgG против Ng в индивидуальных вагинальных смывах 2wp3 с 95% доверительным интервалом

IgG в вагинальных смывах 2wp3 по данным Lumiplex



Фиг. 28В

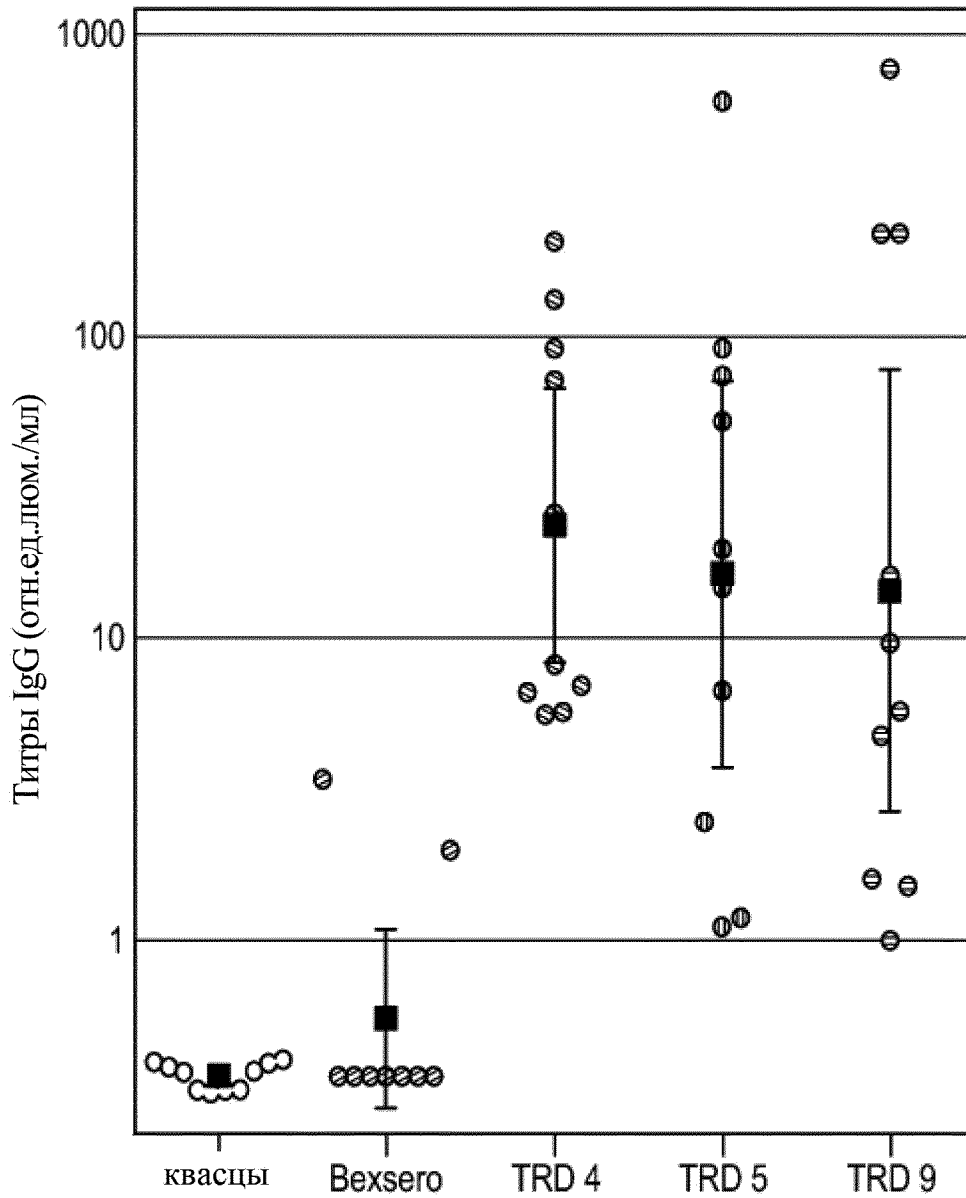
GMR титров GMMA IgG против Ng в индивидуальных вагинальных смывах с 95% доверительным интервалом



Фиг. 29А

Титры GMMA IgA против Ng в индивидуальных вагинальных смывах 2wp3 с 95% доверительным интервалом

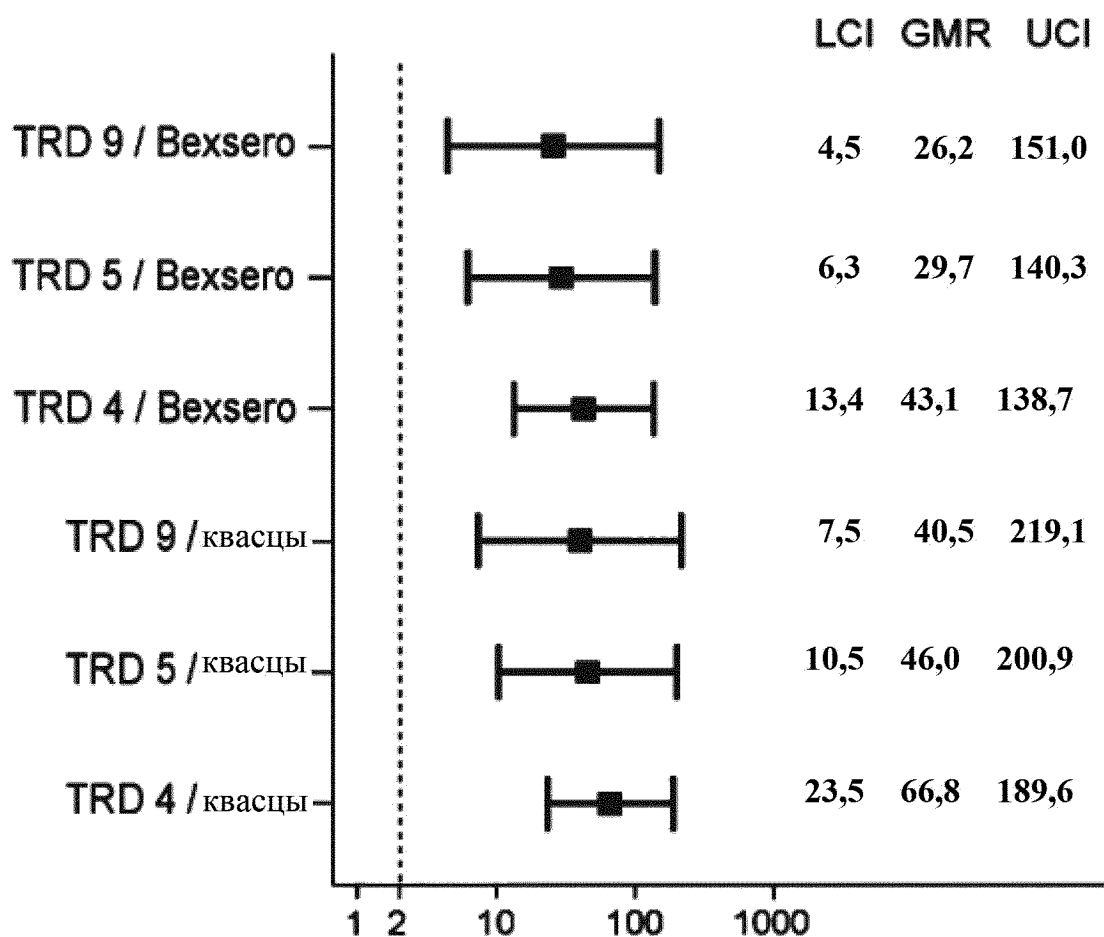
IgA в вагинальных смывах 2wp3 по данным Luminex



Фиг. 29В

GMR титров GMMA IgA против Ng в индивидуальных вагинальных смывах с 95% доверительным интервалом

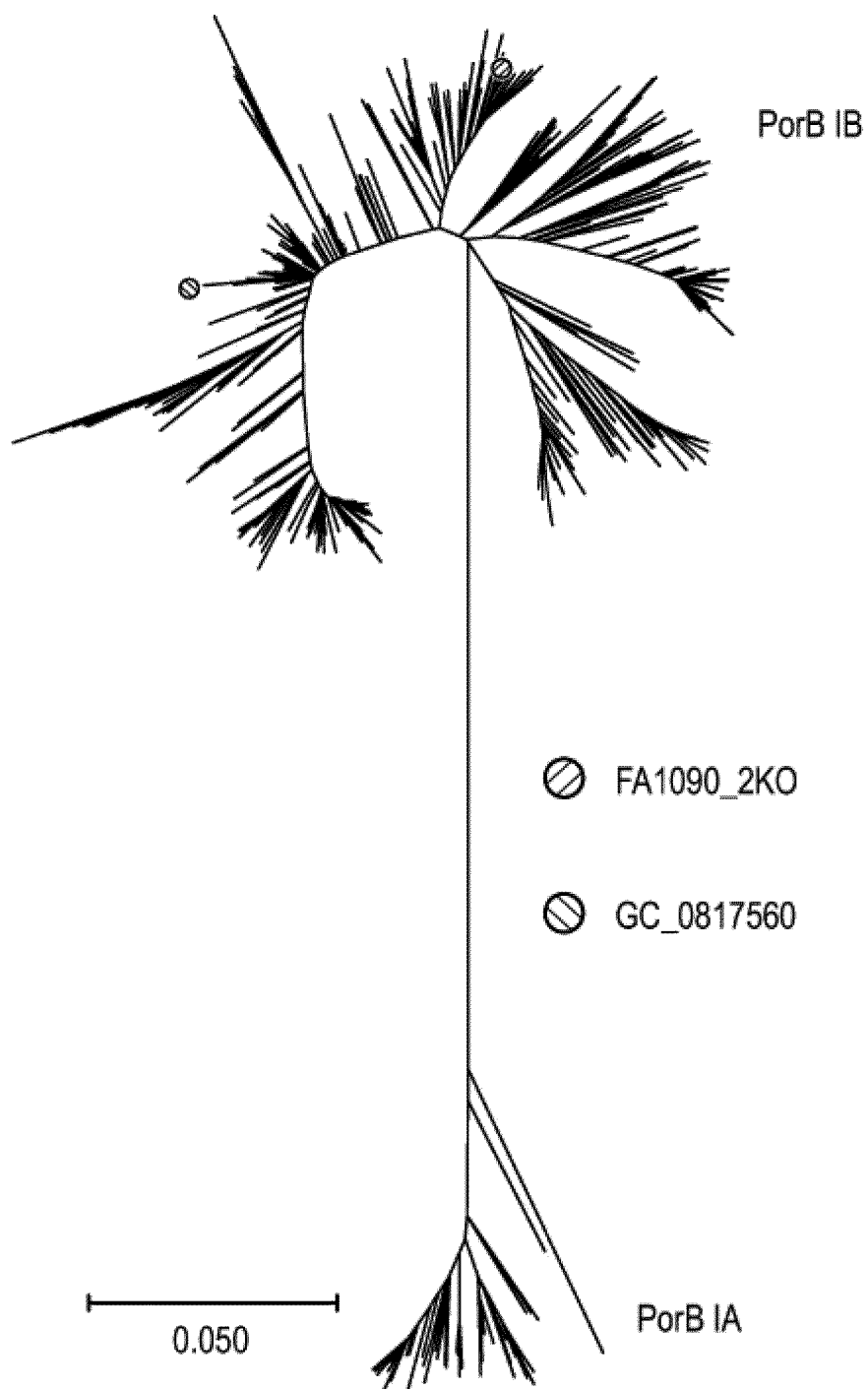
Вагинальные смывы - GMR IgA по данным Luminex и 95% ДИ



Отношение средних геометрических (GMR) с 95% ДИ

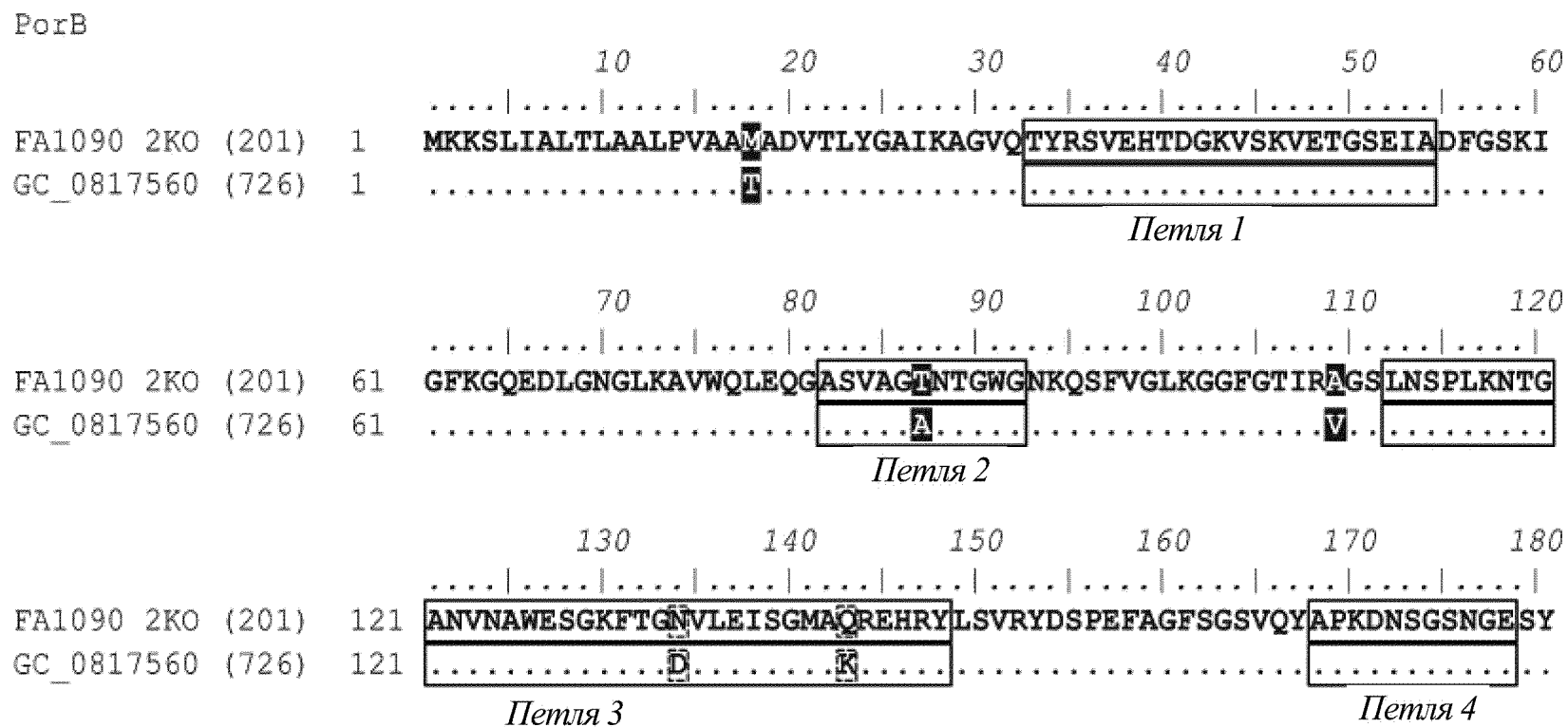
Фиг. 30

Глобальная филогения PorB у Ng



Фиг. 31

Выравнивание PorB FA1090_2KO и GC_0817560 с идентификацией и вариабельностью внеклеточных петель (1-8)



Фиг. 32

Доля бактерий, имеющих последовательность гена *oraB* в фазовом состоянии ON, в различных штаммах

Вариация фаз в *oraB*

