

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391238 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.22

(51) Int. Cl. A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.22

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ NEISSERIA GONORRHOEAЕ

(31) 63/104,819

(32) 2020.10.23

(33) US

(86) PCT/US2021/056249

(87) WO 2022/087407 2022.04.28

(71) Заявитель:
ОМВЭКС, ИНК. (US)

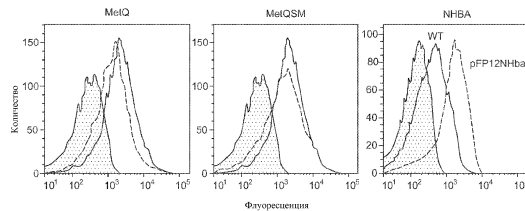
(72) Изобретатель:

Моу Грегори, Джантини Серена (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретением предусмотрены композиции и способы их применения для вакцин для лечения гонококковой и/или менингококковой инфекции, содержащие нативные везикулы внешней мембраны (NOMV), полученные из бактерий, содержащих гонококковый белок, который представляет собой липопротеин или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопротеин. Также предусмотрены менингококковые штаммы, содержащие ген, кодирующий гонококковый белок, который представляет собой липопротеин или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопротеин.



A1

202391238

202391238

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578039EA/042

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ NEISSERIA GONORRHOEAЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на выдачу патента США № 63/104819, поданной 23 октября 2020 года, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ЗАЯВЛЕНИЕ В ОТНОШЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ, СПОНСИРУЕМОГО ЗА СЧЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА

[2] Настоящее изобретение было создано при государственной поддержке в рамках гранта по номеру R01AI046464, присужденного Национальными институтами здравоохранения, Национальным институтом по изучению аллергии и инфекционных заболеваний. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[3] Перечень последовательностей, который содержится в файле под названием "OMV0002-401-PC_ST25", размер которого составляет 248 килобайт в операционной системе Microsoft Windows и который был создан 22 октября 2021 года, настоящим подан в электронном виде и включен в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ НАСТОЯЩЕЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[4] Настоящее изобретение относится к рекомбинантным бактериям и вакцинам, полученным из везикул бактериальной внешней мембраны.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[5] *Neisseria gonorrhoeae* (Ng) является облигатным бактериальным патогеном человека, который наиболее часто колонизирует поверхности слизистых оболочек половых путей, в том числе шейки матки, матки и фаллопиевых труб у женщин, а также мочеиспускательного канала как у мужчин, так и у женщин. Однако гонококки также способны обитать и в других тканях, в том числе в прямой кишке, носоглотке и глазах. Бактерии наиболее часто передаются при прямом физическом контакте между индивидуумами через выделения слизистых оболочек и, возможно, с участием нейтрофилов. Несмотря на более чем 25 лет работы, не существует лицензированной вакцины против Ng, который ежегодно вызывает ~80 миллионов случаев инфекции во всем мире и более 500000 случаев в США. Количество случаев заболевания, вызываемого Ng, в США увеличилось на 67% за период с 2013 по 2018 год. У женщин инфекции, вызываемые Ng, наиболее часто проявляются в виде цервицита или воспалительного заболевания тазовых органов, что может привести к бесплодию. Только у приблизительно половины инфицированных женщин присутствуют клинические проявления, свидетельствующие об инфекции, что приводит к дополнительному распространению заболевания. У младенцев, рожденных инфицированными матерями, может развиваться офтальмия новорожденных, которая, при отсутствии, лечения может привести к слепоте.

У мужчин большинство инфекций, вызываемых Ng, проявляется в виде уретрита. Ng также вызывает фарингеальные и аноректальные инфекции, особенно у мужчин, имеющих половые контакты с мужчинами. В некоторых случаях инфекции, вызываемые Ng, могут развиваться в диссеминированные инфекции с бактериемией, что приводит к артриту, эндокардиту или менингиту. Полирезистентность к антибиотикам оставляет меньше вариантов для антибиотикотерапии заболевания, вызываемого Ng, и угрозы возникновения патогена с универсальной резистентностью. Все эти аспекты подчеркивают значительную глобальную проблему общественного здравоохранения и потребность в эффективной вакцине против Ng.

[6] Инфекции, вызываемые Ng, не вызывают развитие защитного иммунитета, что может привести к множественным повторным инфекциям. Таким образом, при разработке успешной стратегии вакцинации против Ng необходимо развитие более сильного защитного иммунитета, чем при естественной инфекции. Это будет зависеть от повышения иммуногенности защитного антигена(антигенов), который обладает слабой иммуногенностью при естественной инфекции, и/или удаления антигенов Ng, которые обеспечивают укрытие от иммунитета. Например, коммерческие работники в области секс-индустрии, у которых вырабатываются антитела к модифицируемому белку, снижающему уровень инфицирования Ng (Rmp), в 3,4 раза чаще заражались инфекциями, вызываемыми Ng, чем работники секс-индустрии, у которых не было антител. Было показано, что антитела к вариантам Rmp и липоолигосахаридов (LOS) блокируют функциональную активность, опосредованную антителом к PorB. Однако, судя по всему, Rmp Nm не вызывает выработку сходных блокирующих антител. Следовательно, выгодно экспрессировать антигены Ng в Nm, чтобы устранить антитела, блокирующие Rmp, и нокаутировать гены, которые приводят к появлению вариантов LOS, не вызывающих выработку блокирующих антител.

[7] Вследствие различных механизмов иммуносупрессии, используемых Ng, подходы для разработки вакцин, основанных на убитых бактериях, везикулах внешней мембраны (OMV) или пиллях, не были успешными. Хотя и был достигнут прогресс в отношении нескольких рекомбинантных белковых антигенов Ng, в том числе белка адгезинового комплекса (ACP), метионин-связывающего белка MetQ и других антигенов, обнаруженных посредством протеомных стратегий, а также усеченного LOS, ни один из данных подходов не является в широком смысле защитным, и, вероятно, что для ограничения бремени заболевания, вызываемого этим важным патогеном, необходимы новые подходы для разработки вакцин.

[8] Вырабатываемые под действием вакцины антитела, которые могут предупреждать бактериальную адгезию тканей к слизистой оболочке и ее колонизацию, очень важны для предупреждения заболевания, вызываемого как Nm, так и Ng. Nm и Ng являются облигатными патогенами человека, которые задействуют механизмы прикрепления (CEACAM1, CD46), инвазии и уклонения от иммунитета, которые специфически взаимодействуют с системами человека. Антитела, вырабатываемые под

действием вакцин (например, IgA и IgG), присутствуют в выделениях, покрывающих эпителиальные клетки, которые находятся в непосредственном контакте с Nm и Ng на наиболее ранних стадиях инфицирования, и могут предупреждать колонизацию и инвазию.

[9] Вакцина, которая вызывает выработку антител, направленных против механизмов адгезии и уклонения от иммунитета, может защитить индивидуума на начальных стадиях инфицирования от развития более поздних стадий заболевания, а также защитить невакцинированных путем ограничения передачи между индивидуумами. Наиболее экономически выгодные и широко применяемые вакцины обеспечивают как индивидуальную, так и общественную защиту.

[10] Компания OMVax разработала универсальную вакцинную платформу на основе нативных везикул внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (Nm) (NOMV) для презентирования иммунной системе белковых антигенов в нативной конформации. Нативные везикулы внешней мембраны (NOMV) естественным образом образуются в форме пузырьков из бактерий *Neisseria meningitidis* (Nm). Ранее вакцинные штаммы были генетически модифицированы таким образом, что они (a) сверхэкспрессируют белок, связывающий фактор H (FHbp), который в норме присутствует в малом количестве, (b) экспрессируют мутантный FHbp с низкой степенью связывания с фактором H хозяина для усиления ответов с образованием антител, которые блокируют взаимодействия, вызывающие связывание с FH, и (c) содержат ослабленный эндотоксин, что делает возможным применение NOMV без обработки детергентом, которую обычно применяют для снижения реактогенности, но также приводит к удалению или изменению потенциально защитных антигенов. NOMV-FHbp с пентаацилированным липоолигосахаридом (LOS), полученным в результате нокаута *LpxL1* (*LpxL1 KO*), снижает цитокиновые ответы в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC), которые были аналогичны или ниже, чем ответы, вызываемые вакцинами на основе OMV, экстрагированными с применением детергента, которые были безопасно введены десяткам тысяч субъектов-людей. Для дополнительного повышения безопасности вакцины на основе NOMV-FHbp штаммы, применяемые для получения вакцины, включают дополнительные генетические делеции, которые устраняют экспрессию других нежелательных антигенов, в том числе капсульного полисахарида группы B и производных LOS, которые, как известно, вступают в перекрестное взаимодействие с гликанами человека, характеризующимися сходными структурами.

[11] Иммуногенность антигенов, представленных в NOMV, значительно выше по сравнению с сопоставимыми количествами рекомбинантного белка отдельно. Тем не менее, для выработки наиболее эффективных ответов с образованием антител требуется пороговый уровень экспрессии, который был достигнут путем применения промоторов, сконструированных для получения высоких скоростей транскрипции, путем вставки множества копий в бактериальный геном и трансформации с помощью многокопийной плазмиды.

[12] Антигены, которые специфически связываются с белками, липидами или гликанами хозяев, не могут стимулировать ответы с образованием антител на поверхность антигена, где происходит связывание, поскольку наиболее важные эпитопы могут маскироваться в результате связывания с белками хозяев и, следовательно, не быть доступны для распознавания иммунной системой. Антигены, которые связываются с молекулами хозяина, представляют особый интерес для вакцин, поскольку обычно они играют важную роль в механизме патогенеза.

[13] Менингококковые OMV, содержащие гексаацилированный липоолигосахарид, вызывают воспалительные ответы. Реагтогенность можно снизить путем экстракции с применением детергента. Однако обработка детергентами может привести к утрате липопротеиновых антигенов и изменению структуры белка. Штамм Nm, применяемый для получения NOMV, имеет разрушенный локус IpxL1, что приводит к образованию пентаацилированного, а не гексаацилированного LOS, что приводит к ослаблению эндотоксиновой активности.

[14] Платформа NOMV также обладает адъювантными свойствами, которые усиливают ответы с образованием антител. В целом, вакцины на основе NOMV вызывают выработку более высоких титров антител с более широкой реактивностью, чем соответствующие рекомбинантные белки, и могут легче переноситься, поскольку для обеспечения эффективного защитного ответа с образованием антител может быть необходимо меньшее количество белка.

[15] В качестве антигенов для вакцины против Ng были предложены несколько белков Nm, которые также являются высококонсервативными у Ng. Например, GNA1220 (идентичен на 99%; также известен как NMB1220 и NGO0788) относится к семейству стоматиноподобных белков. Индивидуальные представители семейства известны под несколькими названиями, в зависимости от сходства последовательностей внутри подсемейств. К данным названиям относятся параслипин или слипин-2, стоматин, прогибитин, флотиллин и HflK/C. Стоматиноподобные белки представляют собой однопроходные олигомерные мембранные белки древнего происхождения, которые были идентифицированы во всех трех доменах жизни. Хотя их функциональная роль не полностью понятна в каждом случае, они в основном локализуются в мембранных доменах, и во многих случаях было показано, что они модулируют активность ионных каналов. Консервативный домен, общий для данных семейств, также называют доменом Band 7. Индивидуальные белки семейства могут кластеризоваться с образованием мембранных микродоменов, которые, в свою очередь, могут рекрутировать мультибелковые комплексы. Данная подгруппа стоматиноподобных белков остается в значительной степени не охарактеризованной. В нее входит человеческий стоматиноподобный белок-2, который активируется и участвует в прогрессировании и развитии нескольких типов рака, в том числе плоскоклеточной карциномы пищевода, аденокарциномы эндометрия, рака молочной железы и глиомы. GNA1220, по-видимому, играет определенную роль в повышении выживаемости Ng в сыворотке крови человека и,

предположительно, играет ключевую роль в поверхностной колонизации в качестве сенсора для инициирования перехода от неприкрепленного состояния к прикрепленному. GNA1220 был идентифицирован как перспективный кандидат вакцины против менингококков. Титры бактерицидной активности в сыворотке крови, индуцированные рекомбинантным GNA1220 против Nm, были относительно низкими по сравнению с другими белками, идентифицированными с помощью секвенирования генома, а от исследования GNA1220 в качестве вакцинного антигена позже отказались, поскольку его также было трудно получить в форме рекомбинантного белка.

[16] Также в качестве потенциального кандидата для применения в вакцине против Ng был идентифицирован MetQ (также известный у Nm под названием GNA1946 или NMB1946 и у Ng под названием NGO2139), который на 97% идентичен у Nm и Ng. MetQ представляет собой многофункциональный липопротеин на поверхности бактерий, который вовлечен в транспорт метионина и адгезию Ng к эпителиальным клеткам и моноцитам шейки матки. MetQ также важен для выживания Ng в сыворотке крови человека. MetQ конститутивно экспрессируется в условиях роста, имитирующих инфекцию. Недавно сообщалось, что рекомбинантный MetQ, составленный с нуклеотидами CpG, индуцировал выработку высоких титров сывороточных антител, а также секреторного IgA у мышей и уменьшал необходимое для Ng время колонизации влагалища в модели гонококковой инфекции у обработанных эстрогеном самок мышей. В данных предыдущих исследованиях, несмотря на то, что MetQ упоминался как липопротеин, на самом деле применялся рекомбинантный белок, продуцируемый *E. coli*, без присоединенных липидов. С другой стороны, в настоящем изобретении предусмотрены варианты применения рекомбинантной конструкции MetQ, которая представляет собой липопротеин, продуцируемый в Nm, который описан в данном документе. В некоторых вариантах осуществления также можно применять мутантов MetQ в соответствии с настоящим изобретением. Например, как описано в данном документе, новый мутант MetQ, применимый для настоящего изобретения, может представлять собой встречающийся в природе мутант MetQ, называемый в данном документе MetQSM. MetQ и MetQSM могут быть применимы в качестве вакцины для лечения гонококковой и/или менингококковой инфекции, поскольку MetQ в высокой степени консервативен у гонококка и менингококка, как описано в данном документе.

[17] Гепаринсвязывающий антиген нейссерий (NHBA, также известный под названием NGO1220 и GNA2132) представляет собой липопротеин, который связывает гепарин и хондроитинсульфат. NHBA высококонсервативен среди гонококковых штаммов (>93%), но менее гомологичен менингококковому NHBA (~67%-80%). Хотя функция NHBA все еще не известна, гонококковый NHBA, по-видимому, играет определенную роль в колонизации Ng.

[18] В исследованиях GNA1220, MetQ и/или NHBA в отношении иммуногенности вакцин применяли очищенные рекомбинантные белки, которые не экспрессировались в NOMV. Как описано в данном документе, защитные ответы с образованием антител

значительно улучшаются в результате презентирования GNA1220, MetQ, MetQSM и/или NHBA и их производных в NOMV или смеси с NOMV, содержащей оба белка, нуждаются в меньшем количестве белка для продуцирования равных или более высоких титров антител у мышей и обеспечивают идентификацию производных обоих белков, что может быть предпочтительным для выработки антител, предупреждающих колонизацию Ng, тем самым предупреждая приобретение и передачу гонококков.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[19] Так, в одном аспекте настоящим изобретением предусмотрена фармацевтическая вакцинная композиция, содержащая множество бактериальных нативных везикул внешней мембраны (NOMV), содержащих по меньшей мере один рекомбинантный белок, полученный от *Neisseria gonorrhoeae*, где гонококковый рекомбинантный белок представляет собой липопротеин или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопротеин. В другом варианте осуществления гонококковый рекомбинантный белок модифицирован путем удаления частей белка, которые не экспонированы на поверхности, и добавления сигнальной последовательности липопротеина к оставшейся С-концевой части, где гонококковый рекомбинантный белок экспонирован на поверхности бактерий, а NOMV продуцируются бактериями в форме липопротеина. В другом варианте осуществления по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA или их производные или фрагменты или их комбинации. В другом аспекте NOMV получены от *Neisseria meningitidis*. В другом варианте осуществления менингококковый штамм представляет собой H44/76.

[20] В другом аспекте настоящим изобретением предусмотрен штамм *Neisseria meningitidis*, содержащий по меньшей мере один ген, кодирующий по меньшей мере один рекомбинантный белок, полученный от *Neisseria gonorrhoeae*, где по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой липопротеин или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопротеин. В одном варианте осуществления по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA или их производные или фрагменты или их комбинации. В другом варианте осуществления по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок экспрессируется с трансгена в плазмиде. В другом аспекте по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок экспрессируется с трансгена, вставленного в бактериальный геном. В другом аспекте менингококковый штамм представляет собой H44/76. В другом варианте осуществления менингококковый штамм H44/76 не экспрессирует порин PorA. В другом варианте осуществления экспрессия трансгена, кодирующего по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, находится под управлением последовательности сильного промотора, которая обеспечивает высокие скорости транскрипции гена в *Neisseria meningitidis*. В другом варианте осуществления сильный промотор предусматривает промотор PorA или его производное. В другом варианте осуществления промотор содержит последовательность,

изложенную на фиг. 2-4. В другом варианте осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *lpxL1* бактериального генома, где вставка нарушает экспрессию гена ацилтрансферазы, и где нарушение заставляет бактерии продуцировать липоолигосахарид, который является пентаацилированным, а не гексаацилированным. В другом варианте осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *siaD-galE* бактериального генома, и где вставка нарушает экспрессию оболочечного полисахарида и сиалирование липоолигосахаридных антигенов хозяина. В другом варианте осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *siaA*. В другом варианте осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *fhbp* (белка, связывающего фактор H). В другом варианте осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *porA*.

[21] В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением предусмотрена фармацевтическая вакцинная композиция, содержащая множество бактериальных нативных везикул внешней мембраны (NOMV), содержащих по меньшей мере один рекомбинантный белок, полученный от *Neisseria gonorrhoeae*, где гонококковый рекомбинантный белок представляет собой липопротеин или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопротеин.

[22] В некоторых вариантах осуществления гонококковый рекомбинантный белок модифицирован путем удаления частей белка, которые не экспонированы на поверхности, и добавления сигнальной последовательности липопротеина к оставшейся C-концевой части, где гонококковый рекомбинантный белок экспонирован на поверхности бактерий, а NOMV продуцируются бактериями в форме липопротеина.

[23] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA или их производные или фрагменты или их комбинации.

[24] В некоторых вариантах осуществления NOMV получены от *Neisseria meningitidis*.

[25] В некоторых вариантах осуществления менингококковый штамм представляет собой H44/76.

[26] В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением предусмотрен штамм *Neisseria meningitidis*, содержащий по меньшей мере один ген, кодирующий по меньшей мере один рекомбинантный белок, полученный от *Neisseria gonorrhoeae*, где по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой липопротеин или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопротеин.

[27] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA или их

производные или фрагменты или их комбинации.

[28] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок экспрессируется с трансгена в плазмиде.

[29] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок экспрессируется с трансгена, вставленного в бактериальный геном.

[30] В некоторых вариантах осуществления менингококковый штамм представляет собой H44/76.

[31] В некоторых вариантах осуществления менингококковый штамм H44/76 не экспрессирует порин PoreA.

[32] В некоторых вариантах осуществления экспрессия трансгена, кодирующего по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, находится под управлением последовательности сильного промотора, которая обеспечивает высокие скорости транскрипции гена в *Neisseria meningitidis*.

[33] В некоторых вариантах осуществления сильный промотор предусматривает промотор PoreA или его производное.

[34] В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность, изложенную на фиг. 2-4.

[35] В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *lpxL1* бактериального генома, где вставка нарушает экспрессию гена ацилтрансферазы, и где нарушение заставляет бактерии продуцировать липоолигосахарид, который является пентаацилированным, а не гексаацилированным.

[36] В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *siaD-galE* бактериального генома, и где вставка нарушает экспрессию оболочечного полисахарида и сиалирование липоолигосахаридных антигенов хозяина.

[37] В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *siaA*.

[38] В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *fhbp*.

[39] В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *porA*.

[40] Эти и другие варианты осуществления настоящего изобретения подробно описаны ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[41] SEQ ID NO:1 - последовательность белка MetQ.

[42] SEQ ID NO:2 - последовательность ДНК MetQ.

[43] SEQ ID NO:3 - последовательность белка MetQSM.

[44] SEQ ID NO:4 - последовательность ДНК MetQSM.

- [45] SEQ ID NO:5 - последовательность белка GNA1220.
- [46] SEQ ID NO:6 - последовательность ДНК GNA1220.
- [47] SEQ ID NO:7 - последовательность белка GNA1220 $\alpha\beta$.
- [48] SEQ ID NO:8 - последовательность ДНК GNA1220_helix- $\alpha\beta$.
- [49] SEQ ID NO:9 - последовательность прямого праймера MetQ_neisseria.
- [50] SEQ ID NO:10 - последовательность обратного праймера MetQ_SbfI.
- [51] SEQ ID NO:11 - последовательность обратного праймера MetQ_neisseria.
- [52] SEQ ID NO:12 - последовательность обратного праймера MetQ_SpeI.
- [53] SEQ ID NO:13 - последовательность обратного праймера GNA1220_StuI.
- [54] SEQ ID NO:14 - последовательность плазмиды Blue script (FHbp KO+MetQ).
- [55] SEQ ID NO:15 - последовательность нижележащего прямого праймера MetQ pBS.
- [56] SEQ ID NO:16 - последовательность нижележащего обратного праймера RBD pBS.
- [57] SEQ ID NO:17 - последовательность вышележащего прямого праймера FHbp.
- [58] SEQ ID NO:18 - последовательность вышележащего обратного праймера FHbp.
- [59] SEQ ID NO:19 - последовательность плазмиды pGEM (Capsule KO+MetQ).
- [60] SEQ ID NO:20 - последовательность прямого праймера Capsule KO GalE.
- [61] SEQ ID NO:21 - последовательность вышележащего обратного праймера Capsule KO MetQ.
- [62] SEQ ID NO:22 - последовательность нижележащего прямого праймера Capsule KO Spc.
- [63] SEQ ID NO:23 - последовательность обратного праймера Capsule KO SiaD.
- [64] SEQ ID NO:24 - последовательность плазмиды pUC18 (lpxL1 KO+MetQ).
- [65] SEQ ID NO:25 - последовательность вышележащего прямого праймера Lpx11.
- [66] SEQ ID NO:26 - последовательность вышележащего обратного праймера Lpx11.
- [67] SEQ ID NO:27 - последовательность нижележащего обратного праймера Lpx11.
- [68] SEQ ID NO:28 - последовательность плазмиды Blue script (FHbp KO+GNA1220).
- [69] SEQ ID NO:29 - последовательность нижележащего прямого праймера GNA1220 pBS.
- [70] SEQ ID NO:30 - последовательность плазмиды pGEM (Capsule KO+GNA1220).
- [71] SEQ ID NO:31 - последовательность обратного праймера GNA1220, вышележащего относительно Capsule KO.
- [72] SEQ ID NO:32 - последовательность плазмиды pUC18 (lpxL1 KO+GNA1220).
- [73] SEQ ID NO:33 - последовательность плазмиды pFP12-MetQ.
- [74] SEQ ID NO:34 - последовательность плазмиды pFP12-MetQSM.
- [75] SEQ ID NO:35 - последовательность плазмиды pFP12-GNA1220 (показана на фиг. 2).

- [76] SEQ ID NO:36 - последовательность плазмиды pFP12-GNA1220_helix- $\alpha\beta\alpha$.
- [77] SEQ ID NO:37 - последовательность белка NHBA.
- [78] SEQ ID NO:38 - последовательность плазмиды pFP12-NHBA.
- [79] SEQ ID NO:39 - последовательность плазмиды pFP12-NHBA.
- [80] SEQ ID NO:40 - последовательность плазмиды pBS-FHbpKO-MetQ (соответствующая фиг. 12).
- [81] SEQ ID NO:41 - последовательность плазмиды pBS-FHbpKO-MetQSM (соответствующая фиг. 13).
- [82] SEQ ID NO:42 - последовательность плазмиды pBS-FHbpKO-GNA1220 (соответствующая фиг. 14).
- [83] SEQ ID NO:43 - последовательность плазмиды pBS-FHbpKO-NHba (соответствующая фиг. 15).
- [84] SEQ ID NO:44 - последовательность плазмиды pUC18-LpxL1KO-MetQ (соответствующая фиг. 16).
- [85] SEQ ID NO:45 - последовательность плазмиды pUC18-LpxL1KO-MetQSM (соответствующая фиг. 17).
- [86] SEQ ID NO:46 - последовательность плазмиды pUC18-LpxL1KO-GNA1220 (соответствующая фиг. 18).
- [87] SEQ ID NO:47 - последовательность плазмиды pUC18-LpxL1KO-NHba (соответствующая фиг. 19).
- [88] SEQ ID NO:48 - последовательность плазмиды pGEM-SiaD-GalEKO-MetQ (соответствующая фиг. 20).
- [89] SEQ ID NO:49 - последовательность плазмиды pGEM-SiaD-GalEKO-MetQSM (соответствующая фиг. 21).
- [90] SEQ ID NO:50 - последовательность плазмиды pGEM-SiaD-GalEKO-GNA1220 (соответствующая фиг. 22).
- [91] SEQ ID NO:51 - последовательность плазмиды pGEM-SiaD-GalEKO-NHba (соответствующая фиг. 23).
- [92] SEQ ID NO:52 - последовательность плазмиды pFP12-MetQ (соответствующая фиг. 24).
- [93] SEQ ID NO:53 - последовательность плазмиды pFP12-MetQSM (соответствующая фиг. 25).
- [94] SEQ ID NO:54 - последовательность плазмиды pFP12-GNA1220 (соответствующая фиг. 26).
- [95] SEQ ID NO:55 - последовательность плазмиды pFP12-GNA1220 $\alpha\beta\alpha$ (соответствующая фиг. 27).
- [96] SEQ ID NO:56 - последовательность плазмиды pFP12-NHba (соответствующая фиг. 28).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

- [97] На фиг. 1 изображена сверхэкспрессия MetQ, MetQSM и NHBA с тремя

хромосомными копиями MetQ или MetQSM, вставленными в локусы *siaD-galE*, *lpxL1* и *fhbr* (на гистограмме пунктирной линией), и тремя копиями плюс многокопийная плаزمида (на гистограмме сплошной черной линией), как описано в примере 1, по сравнению со штаммом дикого типа (на гистограмме серой штриховкой); и сверхэкспрессия NHBA у штамма с инактивированными локусами *siaD-galE*, *lpxL1* и *fhbr* плюс многокопийная плаزمида с NHBA Ng (на гистограмме пунктирной линией) по сравнению с экспрессией NHBA дикого типа (на гистограмме сплошной линией), измеренные способом проточной цитометрии с поликлональными антителами к rMetQ или к NHBA соответственно.

[98] На фиг. 2 изображена плазмида pFP12-GNA1220WT.

[99] На фиг. 3 изображена плазмида pFP12-GNA1220_helix- $\alpha\beta\alpha$.

[100] На фиг. 4 изображена плазмида pFP12-MetQWT.

[101] На фиг. 5 изображены результаты ELISA поликлональной антисыворотки к MetQ, полученной от мыши (слева) и кролика (справа), связывающейся с NOMV, содержащей рекомбинантный MetQ с 1 копией хромосомы (нижняя линия в обеих) или 3 копиями+плазмиды pFP12 с одной копией на плазмиду (верхняя линия в обеих). В данном эксперименте NOMV, нанесенная покрытием на планшет, имела постоянную концентрацию на уровне 10 мкг/мл, а поликлональные антитела были серийно разведены так, как показано на фигуре.

[102] На фиг. 6 изображены титры IgG в отдельной сыворотке крови мышей, иммунизированных 3 дозами по 10 мкг, 5 мкг или 2,5 мкг NOMV со сверхэкспрессией MetQ или MetQSM, по сравнению с мышами, иммунизированными по 10 мкг рекомбинантного MetQ или только алюминиевого адъюванта (квасцов).

[103] На фиг. 7 изображено связывание поликлональных антител в разведении 1:200, полученных в результате иммунизации рекомбинантным MetQ (rMetQ), rNHBA (сплошная линия на крайней правой секции) или NOMV, содержащей сверхэкспрессированные MetQ, MetQSM, GNA1220 или NHBA, со штаммами гонококков FA1090 и MS11 по результатам проточной цитометрии.

[104] На фиг. 8 изображены сывороточные титры бактерицидной активности (SBA) поликлональных антител, полученных при иммунизации мышей посредством 5 мкг NOMV, полученных из родительского штамма с тройным нокаутом или содержащим сверхэкспрессированные MetQ, MetQSM, GNA1220 или NHBA, по сравнению с 10 мкг рекомбинантного MetQ (rMetQ) или рекомбинантного NHBA (rNHBA).

[105] На фиг. 9 изображен ингибирующий эффект поликлональных антител, полученных при иммунизации мышей посредством rMetQ, rNHBA, NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM, NOMV-GNA1220 или NOMV-NHBA, на колонизацию гонококковыми штаммами FA1090 и MS11, выращенными в двух условиях питания клеток шейки матки человека линии ME180.

[106] На фиг. 10 изображено связывание антител по результатам способом проточной цитометрии со штаммом MD1244 серогруппы B *Neisseria meningitidis* с

антисывороткой (разведение 1:200), полученной от мышей, иммунизированных 2 дозами по 10 мкг рекомбинантного MetQ или по 5 мкг NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM, NOMV-GNA1220 или NOMV, полученной из того же штамма, в котором были нокаутированы гены *fhbp*, *siaD-galE* и *lpxL1*.

[107] На фиг. 11 изображена бактерицидная активность в сыворотке крови (SBA) антисыворотки, полученной от мышей, иммунизированных 2 дозами по 10 мкг рекомбинантного MetQ или по 5 мкг NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM, NOMV-GNA1220 или NOMV, полученной из того же штамма, в котором были нокаутированы гены *fhbp*, *siaD-galE* и *lpxL1*.

[108] На фиг. 12 изображена плаزمида pBS-FHbpKO-MetQ (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:40).

[109] На фиг. 13 изображена плазмида pBS-FHbpKO-MetQSM (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:41).

[110] На фиг. 14 изображена плазмида pBS-FHbpKO-GNA1220 (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:42).

[111] На фиг. 15 изображена плазмида pBS-FHbpKO-NHba (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:43).

[112] На фиг. 16 изображена плазмида pUC18-LpxL1KO-MetQ (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:44).

[113] На фиг. 17 изображена плазмида pUC18-LpxL1KO-MetQSM (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:45).

[114] На фиг. 18 изображена плазмида pUC18-LpxL1KO-GNA1220 (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:46).

[115] На фиг. 19 изображена плазмида pUC18-LpxL1KO-NHba (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:47).

[116] На фиг. 20 изображена плазмида pGEM-SiaD-GalEKO-MetQ (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:48).

[117] На фиг. 21 изображена плазмида pGEM-SiaD-GalEKO-MetQSM (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:49).

[118] На фиг. 22 изображена плазмида pGEM-SiaD-GalEKO-GNA1220 (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:50).

[119] На фиг. 23 изображена плазмида pGEM-SiaD-GalEKO-NHba (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:51).

[120] На фиг. 24 изображена плазмида pFP12-MetQ (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:52).

[121] На фиг. 25 изображена плазмида pFP12-MetQSM (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:53).

[122] На фиг. 26 изображена плазмида pFP12-GNA1220 (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:54).

[123] На фиг. 27 изображена плазмида pFP12-GNA1220 $\alpha\beta\alpha$ (соответствующая

последовательности под SEQ ID NO:55).

[124] На фиг. 28 изображена плаزمида pFP12-NHba (соответствующая последовательности под SEQ ID NO:56).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Обзор

[125] В настоящем изобретении описаны усиленные защитные эффекты антител к *Neisseria gonorrhoeae* (Ng) или *Neisseria meningitidis* (Nm) за счет (a) сверхэкспрессии генов с новым промотором на многокопийной плазмиде и вставки дополнительных генов в хромосому для нокаута *fHbp*, оболочечного полисахарида и сиапирования LOS, (b) экспонирования частей белков на поверхности NOMV *Neisseria meningitidis* (Nm), (c) продуцирования NOMV в бактериальном штамме без порина *PogA*, являющимся иммунодоминантным антигеном, который может, наряду с оболочечным полисахаридом, снижать доступность гонококковых белков для иммунной системы, и (d) высокой сверхэкспрессии консервативных гонококковых белков, которые обычно являются минорными антигенами гонококка в менингококковой NOMV. По причинам, которые плохо изучены, но, вероятно, в некоторой степени зависят от описанного выше механизма уклонения от иммунитета производных *Rmp* и LOS, те же самые антигены, экспрессируемые в гонококковой NOMV, обладают слабой иммуногенностью и не вызывают продуцирование антител, которые защищают от заболевания, вызываемого Ng. Тем не менее, индуцируемые NOMV Ng антитела, блокирующие *Rmp* и LOS, не индуцируются NOMV Nm, модифицированной посредством нокаута локуса *galE*, как описано выше.

[126] Менингококковый пориновый белок *PogA* является одним из наиболее высокоэкспрессируемых белков в Nm и вызывает выработку высоких титров антител к *PogA*. Тем не менее, промотор *PogA*, который управляет экспрессией данного гена, является фазовой переменной, поэтому вставка или делеция оснований в поли-G-участке во время репликации может привести в результате к увеличению или уменьшению экспрессии. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что область перед геном *PogA* у Nm содержит 6 потенциальных промоторов, из которых только один содержит поли-G-участок. Исходя из результатов данного анализа, был сконструирован промотор *PogA* посредством удаления последовательности, содержащей поли-G-участок, что устраняло возможность фазовых вариаций при сохранении способности управлять высокими уровнями транскрипции. Сконструированную промоторную конструкцию применяли для управления экспрессией гонококковых генов, вставленных в хромосому и в многокопийную плазмиду. Конструкции промоторов генов вставляли в область, охватывающую гены *siaD* и *galE*, для устранения продуцирования оболочечного полисахарида и сиапирования LOS, *fHbp* и *IpxL1*, а также во внехромосомную плазмиду. Вариант штамма H44/76 Nm без экспрессии *PogA* был выбран для увеличения доступности гонококковых антигенов и устранения потенциальной иммунологической конкуренции с иммунодоминантным антигеном, не имеющим значения для защиты от Ng.

[127] Белки, экспонированные на поверхности NOMV, представляют собой либо встроенные мембранные белки с одним или несколькими трансмембранными сегментами, либо модифицированы путем присоединения жирных кислот к амино-концу белка с получением липопротеина, где присоединенная жирная кислота играет роль якоря в мембране. Липопротеины первоначально транслируются как препролипипропротеины, которые имеют амино-концевой сигнальный пептид из около 20 аминокислот с типичными характерными признаками сигнальных пептидов секретлируемых белков. Консервативную последовательность сигнальных пептидов, называемую липобоксом, имеющую консенсусную аминокислотную последовательность [LVI][ASTVI][GAS]C, модифицируют посредством ковалентного присоединения диацилглицеринового фрагмента к тиоловой группе на боковой цепи незаменимого цистеинового остатка. Такая модификация катализируется ферментом липопротеиндиацилглицерилтрансферазой (Lgt), в результате чего образуется пролипипропротеин, состоящий из диацилглицериновой части, связанной тиоэфирной связью с белком. После липидирования сигнальная пептидаза липопротеина (Lsp или SPase II) отвечает за отщепление сигнальной последовательности липидированного пролипипропротеина и оставляет цистеин липобокса в виде нового амино-концевого остатка. У грамотрицательных бактерий, таких как *Neisseria meningitidis*, расщепленный пролипипропротеин подвергается дополнительной модификации путем присоединения амидной ацильной группы к N-концевому цистеинового остатку посредством липопротеиновой N-ацилтрансферазы (Lnt). Диацилглицерильная группа и амино-концевая ацильная группа происходят от мембранных фосфолипидов и обеспечивают прочное закоревание липопротеина в мембране.

[128] Антигены, которые специфически связываются с белками, липидами или гликанами хозяев, не могут стимулировать ответы с образованием антител на поверхность антигена, где происходит связывание, поскольку они маскируются связыванием с соответствующим белком хозяина и, как следствие, не доступны для рецепторов на антигенспецифических В-клетках. Антигены, которые связываются с молекулами хозяина, представляют особый интерес для вакцин, поскольку обычно они играют важную роль в механизме патогенеза и, как следствие, вероятно сохраняются, несмотря на давление иммунного отбора.

Белок GNA1220 *Neisseria gonorrhoeae* (Ng)

[129] Структурное моделирование GNA1220 позволило идентифицировать 4 структурных домена, показанных на представленных ниже фигурах. Сюда относятся сегмент мембранного якоря на N-конце, стоматиноподобный домен, который, как известно, образует кольцевые структуры, удлиненный спиральный сегмент и альфа-бета-альфа-домен ($\alpha\beta\alpha$) на C-конце. Особое значение имеют спиральный и $\alpha\beta\alpha$ домены, так как они, вероятно, находятся на внешней поверхности бактерий и являются целью для защитных антител. Авторы настоящего изобретения сконструировали вариант липопротеина GNA1220, который состоит из сигнальной последовательности липопротеина FNbp ID9, слитой со спиральным плюс $\alpha\beta\alpha$ -доменом GNA1220, где

спиральный домен начинается сразу после возможного сайта протеолитического расщепления (RK) на С-конце стоматиноподобного домена.

Белок MetQ *Neisseria gonorrhoeae* (Ng)

[130] Встречающийся в природе мутант MetQ, называемый в данном документе MetQSM, предупреждает связывание метионина путем стабилизации открытой конформации белка. Антитела, выработка которых вызывается вакцинным антигеном MetQ, заблокированным в открытой конформации и которые связываются с открытой формой белка дикого типа, экспрессируемого Ng, могут быть неспособны связывать метионин или претерпевать конформационные изменения, связанные со связыванием метионина, что приводит к невозможности MetQ опосредовать множественные функции, связанные с устойчивостью к адгезии в сыворотке крови и бактериальной адгезией.

Белок *Neisseria gonorrhoeae* (Ng), гепаринсвязывающий антиген нейссерий (NHBA)

[131] NHBA представляет собой липопротеин, который связывается с гепарином и хондроитинсульфатом и является высококонсервативным у Ng (с 97%-100% идентичности), а также может быть вовлечен в адгезию гонококка к эпителиальным клеткам хозяина.

Нативные везикулы внешней мембраны (NOMV) и вакцины на их основе

[132] В некоторых вариантах осуществления NOMV можно применять в качестве вакцины для лечения или предупреждения гонококковой и/или менингококковой инфекции у пациента или субъекта, как описано в данном документе. NOMV можно вводить в терапевтически эффективной дозе или в терапевтически эффективном количестве пациенту или субъекту, у которого наблюдаются симптомы гонококковой и/или менингококковой инфекции, или можно вводить в терапевтически эффективной дозе или в терапевтически эффективном количестве бессимптомному пациенту с положительным результатом теста в отношении гонококковой и/или менингококковой инфекции.

[133] Внешняя мембрана *N. meningitidis* состоит в основном из липоолигосахаридов (LOS), белков внешней мембраны (OMP) и фосфолипидов и в норме очень слабо прикреплена к клеточной стенке. При стационарном росте бактерий везикулы или пузырьки внешней мембраны высвобождаются в окружающую среду. Данные нативные везикулы внешней мембраны (NOMV) состоят из интактной внешней мембраны, включая все ассоциированные белки и LOS, но без периплазматических и цитоплазматических компонентов. Как описано в данном документе, авторы настоящего изобретения сконструировали штамм *Neisseria meningitidis* (Nm) для экспрессии гонококковых белков, таких как GNA1220, MetQ, мутантный белок MetQSM и/или NHBA. Как описано в данном документе, вакцина на основе NOMV при введении пациенту в терапевтически эффективном или профилактически эффективном количестве позволяет как лечить, так и предупреждать гонококковую и/или менингококковую инфекцию, а также симптомы инфекции. Получение вакцины на основе NOMV, экспрессирующей гонококковый белок,

такой как GNA1220, MetQ, MetQSM и/или NHBA, описано в разделе примеров и подробно описано в данном документе.

Способы лечения или предупреждения гонококковой и/или менингококковой инфекции

[134] В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением предусмотрен способ лечения гонококковой и/или менингококковой инфекции, включающий введение терапевтически эффективного количества описываемой в данном документе вакцины на основе NOMV пациенту, инфицированному гонококковым бактериальным штаммом или менингококковым бактериальным штаммом. В некоторых вариантах осуществления такое введение вакцины на основе NOMV может быть терапевтическим и приводить к облегчению симптомов, связанных с гонококковой и/или менингококковой инфекцией у пациента. В других вариантах осуществления такое введение вакцины на основе NOMV может быть профилактическим и приводить в результате к предупреждению инфицирования и развития заболевания.

[135] Способ по настоящему изобретению позволяет лечить или предупреждать инфицирование субъекта или пациента с гонококковой и/или менингококковой инфекцией, как описано в данном документе. Введение композиции, содержащей NOMV, как описано в данном документе, можно осуществлять в клинических условиях, как описано в данном документе, или можно осуществлять в альтернативных условиях, которые сочтет целесообразными клиницист или практикующий врач. В других частях данного документа описаны дополнительные варианты осуществления введения таких вакцин на основе NOMV.

[136] В некоторых вариантах осуществления такую композицию, содержащую описываемую в данном документе вакцину на основе NOMV, можно комбинировать с другими средствами терапии или лечения для лечения гонококковой и/или менингококковой инфекции у пациента. По усмотрению клинициста можно применять любое подходящее лекарственное лечение или терапевтическое лечение.

[137] Введение описываемой в данном документе вакцины на основе NOMV может уменьшить количество дней симптомов гонококковой и/или менингококковой инфекции на один или несколько дней, так, например, уменьшить симптомы на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и т. д. Введение описываемой в данном документе вакцины на основе NOMV может быть однократным введением или однократной дозой или может быть более чем однократным введением или более однократной дозы, такой как, в том числе, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и более доз. Как будет понятно специалисту в данной области техники, некоторые пациенты или субъекты могут получить полезный эффект от более чем однократного введения или лечения вакциной на основе NOMV по настоящему изобретению. Такое определение должно быть сделано клиницистом или другим квалифицированным медицинским персоналом.

[138] В других вариантах осуществления симптомы гонококковой и/или менингококковой инфекции могут быть уменьшены на одну неделю или более, например,

в то числе без ограничения, одну неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель или более. В других вариантах осуществления введение описываемой в данном документе вакцины на основе NOMV может уменьшить тяжесть или продолжительность гонококковой и/или менингококковой инфекции на 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80%, или 90%, или 100%.

[139] Если в данном документе не указано иное, то описываемые в данном документе способы можно осуществлять в соответствии с процедурами, проиллюстрированными в данном документе, или стандартно применяемыми способами, хорошо известными в уровне техники. См., например, *Methods in Enzymology, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis*, J. N. Abelson, M. I. Simon, G. B. Fields (Editors), Academic Press; 1st edition (1997) (ISBN-13: 978-0121821906); патенты США №№ 4965343 и 5849954; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (2003); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); или *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152*, S. L. Berger and A. R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); *Current Protocols in Protein Science (CPPS)* (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.), *Current Protocols in Cell Biology (CPCB)* (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), и *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), *Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57)*, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998). В последующих разделах представлено дополнительное руководство по применению способов по настоящему изобретению.

Системы экспрессии и векторы, кодирующие рекомбинантный полипептид

[140] Как подробно описано в данном документе, в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические и терапевтические композиции, которые можно вводить субъекту-млекопитающему, нуждающемуся в длительной защите *in vivo* от гонококковой и/или менингококковой инфекции или ее лечения. Такие композиции обычно содержат системы экспрессии, например, бактериальные штаммы, полинуклеотидные или полипептидные последовательности, векторы экспрессии или вирусные векторы, которые кодируют или экспрессируют описываемый в данном документе рекомбинантный полинуклеотид или полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессируемый рекомбинантный полинуклеотид или полипептид кодирует гонококковый белок, который представляет собой липопротеин или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопротеин. Композиции по настоящему изобретению обеспечивают оптимальную активность или коэкспрессию *in vivo* у субъекта или пациента (например, у человека или отличного от человека примата) описываемого в данном документе рекомбинантного полипептида, который обеспечивает сильную и долговременную защиту от гонококковой и/или менингококковой инфекции, как описано в данном документе.

[141] Оптимальная экспрессия NOMV, содержащей рекомбинантный полипептид, такой как описываемый в данном документе гонококковый белок, может быть достигнута с помощью различных механизмов. Такая оптимальная экспрессия может быть достигнута с помощью требуемой структурной конструкции вектора экспрессии, кодирующего рекомбинантный полипептид, или посредством применения соответствующих регуляторных элементов в векторе экспрессии. Кроме того, оптимальная экспрессия рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению в условиях *in vivo* может быть дополнительно оптимизирована путем измерения в клетке уровней описываемого в данном уровне рекомбинантного полипептида. При необходимости можно применять любые анализы для определения соответствующих уровней полипептида. Все такие тесты можно легко проводить с помощью стандартных анализов или протоколов, хорошо известных в уровне техники.

[142] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные последовательности, кодирующие рекомбинантный полипептид, такой как описываемый в данном документе гонококковый белок, функционально связаны с регулируемыми экспрессию последовательностями (например, промоторными последовательностями) в бактериальном или вирусном векторе экспрессии или системе экспрессии, которые описаны в данном документе. Некоторые примеры бактериальной системы экспрессии включают без ограничения менингококковый бактериальный штамм, такой как, в том числе без ограничения, *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis* или Nm), *Neisseria gonorrhoeae* (Ng), или другой подходящий бактериальный штамм. В некоторых вариантах осуществления штамм бактерий Nm или Ng, применимый для экспрессии гонококкового белка, может представлять собой штамм, без экспрессии порина PorA, такой как штамм H44/76 Nm.

[143] Как описано в данном документе, можно применять Nm для экспрессии гонококкового белка, такого как GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA, или можно применять мутантов с точечными мутациями или их части. В некоторых вариантах осуществления гонококковый белок представляет собой липопротеин или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопротеин. Для кодирования и/или экспрессии гонококкового белка в Nm можно применять любую применимую плазмиду, известную или доступную в уровне техники. Например, вектор, применимый для настоящего изобретения, может представлять собой плазмиду. К применимым плазмидам могут относиться без ограничения любые плазмиды, описанные в данном документе и способные нести и кодировать описываемый в данном документе гонококковый белок, такие как плазида pFP12-GNA1220WT (см., фиг. 2), pFP12-GNA1220_helix- $\alpha\beta\alpha$ (см., фиг. 3), плазида pFP12-MetQWT (см., фиг. 4), плазида Bluescript (FHbp KO+MetQ, SEQ ID NO:14), плазида pGEM (Capsule KO+MetQ), SEQ ID NO:19), плазида pUC18 (lpxL1 KO+MetQ, SEQ ID NO:24), плазида Bluescript (FHbp KO+GNA1220, SEQ ID NO:28), плазида pGEM (Capsule KO+GNA1220, SEQ ID NO:30), плазида pUC18 (lpxL1 KO+GNA1220, SEQ ID NO:32), плазида pFP12-MetQ (SEQ ID NO:33), плазида pFP12-

MetQSM, SEQ ID NO:34), плазмида pFP12-GNA1220 (SEQ ID NO:35), плазмида pFP12-GNA1220_helix- $\alpha\beta\alpha$ (SEQ ID NO:36), плазмида pFP12-NHBA (SEQ ID NO:38), плазмида pFP12-NHBA (SEQ ID NO:39), плазмида pBS-FHbpKO-MetQ (SEQ ID NO:40), плазмида pBS-FHbpKO-MetQSM (SEQ ID NO:41), плазмида pBS-FHbpKO-GNA1220 (SEQ ID NO:42), плазмида pBS-FHbpKO-NHba (SEQ ID NO:43), плазмида pUC18-LpxL1KO-MetQ (SEQ ID NO:44), плазмида pUC18-LpxL1KO-MetQSM (SEQ ID NO:45), плазмида pUC18-LpxL1KO-GNA1220 (SEQ ID NO:46), плазмида pUC18-LpxL1KO-NHba (SEQ ID NO:47), плазмида pGEM-SiaD-GalEKO-MetQ (SEQ ID NO:48), плазмида pGEM-SiaD-GalEKO-MetQSM (SEQ ID NO:49), плазмида pGEM-SiaD-GalEKO-GNA1220 (SEQ ID NO:50), плазмида pGEM-SiaD-GalEKO-NHba (SEQ ID NO:51), плазмида pFP12-MetQ (SEQ ID NO:52), плазмида pFP12-MetQSM (SEQ ID NO:53), плазмида pFP12-GNA1220 (SEQ ID NO:54), плазмида pFP12-GNA1220 $\alpha\beta\alpha$ (SEQ ID NO:55) или плазмида pFP12-NHba (SEQ ID NO:56).

[144] Некоторые примеры вирусных векторов, подходящих для настоящего изобретения, включают векторы на основе ретровирусов, например, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов (AAV) и векторы на основе осповакцины. В некоторых вариантах осуществления структура вектора может быть модифицирована, при необходимости, для оптимизации экспрессии или для достижения требуемого уровня в клетке рекомбинантного полипептида, например, путем включения контролирующих экспрессию элементов (например, промоторных или энхансерных последовательностей). В некоторых вариантах осуществления экспрессия описываемого в данном документе гонококкового белка может быть достигнута путем применения сильного промотора, который обеспечивает высокие скорости транскрипции гена в Nm, такого как промотор порина PorA. В некоторых вариантах осуществления разница между силой одного промотора по сравнению с другим промотором заключается в том, насколько сильно он согласуется с “консенсусной последовательностью”, то есть последовательностью оснований, которая наиболее сильно обеспечивает с высокой вероятностью связывание с ним транскрипционного комплекса. В других вариантах осуществления промотор может быть модифицирован с включением, например, изменения последовательностей -10 и -35 для приведения в соответствие с конкретными последовательностями из Nm. Например, можно осуществить модификацию описываемой в данном документе промоторной последовательности из TATTTG или TACAAA и TAAAGG или TGCCCG в ТАТААТ и TTGАСА, соответственно, для приведения в соответствие, например, с консенсусной последовательностью Sigma70 для Nm.

[145] В некоторых вариантах осуществления такой промотор, применимый в соответствии с настоящим изобретением, может включать любые промоторные последовательности, изложенные в данном документе, или другие промоторные последовательности, известные и/или доступные в уровне техники.

[146] В некоторых вариантах осуществления гонококковый белок и подходящий промотор для экспрессии в менингококковом штамме, таком как Nm, как описано в

данном документе, могут быть вставлены в локус бактериального генома. Такие методики известны и доступны в уровне техники. Описываемая в данном документе конструкция или плазида, содержащая гонококковый белок и подходящий промотор для достижения высоких скоростей транскрипции, могут быть вставлены в любой требуемый локус в бактериальном геноме. Для этого могут быть предпочтительны определенные локусы, такие как ген, придающий бактериальным клеткам конкретный признак или генный продукт. Например, как описано в данном документе, ген гонококкового белка и промотор для обеспечения высоких скоростей транскрипции можно вставить в локус *lpxL1*, что нарушит экспрессию гена ацилтрансферазы, так что продуцируемый липоолигосахарид станет пентаацилированным вместо гексаацилированного. В других вариантах осуществления ген гонококкового белка и промотор для обеспечения высоких скоростей транскрипции можно вставить в локус *siaD-galE* (также *siaA*) для нарушения экспрессии оболочечного полисахарида и сиалирования липоолигосахаридов (LOS) антигенов хозяина. В других вариантах осуществления ген гонококкового белка и промотор для обеспечения высоких скоростей транскрипции можно вставить в локус *hlyN* (белок, связывающий фактор H). В других вариантах осуществления ген гонококкового белка и промотор для обеспечения высоких скоростей транскрипции можно вставить в локус *rogA*.

[147] В соответствии с настоящим изобретением можно применять и другие промоторные последовательности, хорошо известные в уровне техники. К ним относятся без ограничения например, промотор CMV, короткий промотор фактора элонгации-I (EFS), промотор куриного актина (CBA), промотор EF-1 α , промотор десмина человека (DES), промотор Mini TK и промотор тироксинсвязывающего глобулина (TBG) человека. Кроме того, вектор экспрессии по настоящему изобретению может включать ряд регуляторных элементов для осуществления оптимальной экспрессии гонококкового белка. Например, для повышения экспрессии рекомбинантного полипептида могут быть включены 5'-энхансерный элемент и/или 5'-WPRE элемент. WPRE представляет собой элемент посттранскрипционного ответа, который характеризуется 100% гомологии с парами оснований 1093-1684 генома вируса гепатита В сурка (WHYS). При использовании в 3'-UTR кассеты экспрессии млекопитающих он может значительно увеличить стабильность mRNA и выход белка. Используемый в данном документе термин "кассета экспрессии" относится к полинуклеотидной последовательности, содержащей по меньшей мере первую полинуклеотидную последовательность, способную инициировать транскрипцию функционально связанной второй полинуклеотидной последовательности, и необязательно последовательность терминации транскрипции, функционально связанную со второй полинуклеотидной последовательностью. В контексте данного документа кассета экспрессии может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описываемый в данном документе гонококковый белок, функционально связанную с описываемым в данном документе промотором.

[148] Экспрессия описываемого в данном документе рекомбинантного

полипептида у субъекта или пациента обеспечивает эффективную и долгосрочную защиту в условиях *in vivo* от и/или лечение гонококковой и/или менингококковой инфекции у субъектов, таких как люди. Для такого способа субъекту можно вводить фармацевтическую композицию, которая содержит терапевтически или фармацевтически эффективное количество рекомбинантного полипептида или терапевтической композиции или системы экспрессии по настоящему изобретению, т. е. кодирующей описываемый в данном документе гонококковый белок, такой как GNA1220, MetQ, MetQSM и/или NHBA. В некоторых родственных вариантах осуществления настоящим изобретением предусмотрены терапевтические композиции, которые содержат системы экспрессии для оптимальной экспрессии описываемого в данном документе гонококкового белка у субъекта. Системы экспрессии могут представлять собой полинуклеотидные последовательности или векторы экспрессии, а также NOMV, липосомы или другие липид-содержащие комплексы и другие макромолекулярные комплексы, способные опосредовать доставку полинуклеотидной последовательности в клетку-хозяина или субъекту. Для экспрессии рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению при введении субъекту можно применять различные векторы или системы экспрессии. В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии или системы экспрессии могут быть основаны на бактериальных векторах. В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии или системы экспрессии могут быть основаны на вирусных векторах. В некоторых других вариантах осуществления системы экспрессии состоят из полинуклеотидных последовательностей, содержащих кодирующие последовательности для описываемого в данном документе рекомбинантного полипептида, в том числе последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты и рибонуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления векторы или системы экспрессии вводят субъектам в форме рекомбинантного бактериального штамма, экспрессирующего гонококковый белок или содержащие его вакцины на основе NOMV, которые описаны в данном документе. NOMV можно выделить и очистить перед введением пациенту или субъекту в соответствии со способами, известными в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления векторы или системы экспрессии вводят субъектам в форме рекомбинантного вируса. Например, рекомбинантный вирус может представлять собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV), например вектор на основе самокомплементарного аденоассоциированного вируса (scAAV). Такие способы вирусной доставки обеспечивают безопасную, ненавязчивую и устойчивую экспрессию высоких уровней описываемых в данном документе терапевтических средств.

[149] Как описано выше, при применении терапевтических композиций по настоящему изобретению для предупреждения или лечения гонококковой инфекции у субъекта уровни экспрессии рекомбинантного полипептида можно проверять в процессе лечения. В некоторых вариантах осуществления введенные рекомбинантные полипептиды или композиции приводят к экспрессии рекомбинантного полипептида у субъекта в количестве, достаточном для снижения количества бактерий, обнаруживаемых у субъекта,

в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000 раз или более. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления лечение субъекта или пациента описываемой в данном документе вакциной на основе NOMV для экспрессии гонококкового белка или терапевтической или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для лечения или предупреждения гонококковой и/или менингококковой инфекции приводит к уменьшению количества бактерий или бактериальной нуклеиновой кислоты или бактериальных белков до не поддающихся выявлению уровней в крови или плазме крови подвергаемого лечению субъекта.

[150] Описываемый в данном документе вектор экспрессии может содержать кодирующие последовательности и другие компоненты или функциональные элементы, которые дополнительно модулируют доставку гена и/или экспрессию гена или иным образом придают полезные свойства. К таким другим компонентам относятся, например, компоненты, которые влияют на связывание или нацеливание на клетки (включая компоненты, которые опосредуют связывание клеточного или тканеспецифического типа), компоненты, которые влияют на поглощение вектора клеткой, компоненты, которые влияют на локализацию переносимого гена в клетке после поглощения (такие как средства, опосредующие ядерную локализацию), а также компоненты, которые влияют на экспрессию гена. Такие компоненты также могут включать маркеры, такие как поддающиеся выявлению и/или отбору маркеры, которые можно применять для выявления или отбора клеток, которые поглотили и экспрессируют доставляемую вектором нуклеиновую кислоту. Такие компоненты могут быть представлены в форме естественного элемента вектора (например, при применении определенных вирусных векторов, которые содержат компоненты или функциональные элементы, опосредующие связывание и поглощение), или векторы можно модифицировать для введения таких функциональных элементов. Поддающиеся отбору маркеры могут быть положительными, отрицательными или бифункциональными. Положительные поддающиеся отбору маркеры позволяют производить отбор клеток, несущих маркер, тогда как отрицательные поддающиеся отбору маркеры позволяют избирательно устранять клетки, несущие маркер. Описано множество таких маркерных генов, включая бифункциональные (т. е. положительные/отрицательные) маркеры (см., например, WO 92/08796 и WO 94/28143). Такие маркерные гены могут обеспечивать дополнительный параметр контроля, который может быть полезным в контексте генной терапии. В уровне техники известно и обычно доступно большое разнообразие таких векторов. В некоторых вариантах осуществления вставка гонококкового белка либо отдельно, либо с подходящим промотором для обеспечения высоких уровней транскрипции в конкретный бактериальный или вирусный ген хозяина может давать поддающуюся скринингу или отбору характеристику, например, один или несколько локусов *lpxL1*, который нарушает экспрессию гена ацилтрансферазы, так чтобы продуцируемый липоолигосахарид был пентаацилированным вместо гексаацилированного, или локус *siaD-galE* (также *siaA*) для нарушения экспрессии

оболочечного полисахарида и сialiрования липоолигосахаридных антигенов хозяина, или локус *fhbr* (белок, связывающий фактор H), или локус *rogA*.

[151] Векторы или системы экспрессии, подходящие для настоящего изобретения, включают без ограничения выделенные полинуклеотидные последовательности, например, векторы на основе плазмид, которые могут сохраняться вне хромосом, и вирусные векторы, например, рекомбинантный аденовирус, ретровирус, лентивирус, герпесвирус, поксвирус, вирус папилломы или аденоассоциированный вирус, включая вирусные и невирусные векторы, которые присутствуют в липосомах, например, нейтральные или катионные липосомы, такие как липосомы DOSPA/DOPE, DOGS/DOPE или DMRIE/DOPE, и/или ассоциированные с другими молекулами, такие как комплексы ДНК-антитело к ДНК-катионный липид (DOTMA/DOPE). Иллюстративные вирусные или бактериальные векторы генов известны в уровне техники и описаны ниже. Векторы можно вводить любым путем, в том числе без ограничения внутримышечным, буккальным, ректальным, внутрикоронарным, внутривенным, интраназальным, трансвагинальным, подкожным, внутриартериальным, внутрисуставным, внутрибрюшинным, парентеральным, а перенос в клетки можно усилить с помощью электропорации и/или ионтофореза.

[152] В некоторых вариантах осуществления праймеры, применимые для построения описываемой в данном документе плазмиды, могут включать любой описываемый в данном документе праймер. Специалисту в данной области техники будет понятно, что можно применять и другие праймеры или векторы без отступления от объема настоящего изобретения. Ниже представлены некоторые примеры применимых праймеров, которые описаны в данном документе.

[153] Праймеры, применимые для построения плазмид *pUC18 Lpx11* и *pBS FHbr*.

[154] *MetQ* WT и с мутацией N238A.

[155] Прямой праймер *MetQ_neisseria*, 5'-*atacaattgCCTCAGCGCATGCATC*-3' (SEQ ID NO:9).

[156] Обратный праймер *MetQ_SbfI*, 5'-*tatCCTGCAGGTTATACGACTGCCTTATTTG*-3' (SEQ ID NO:10).

[157] *GNA1220*.

[158] Прямой праймер *MetQ_neisseria*, 5'-*atacaattgCCTCAGCGCATGCATC*-3' (SEQ ID NO:9).

[159] Обратный праймер *GNA1220_SbfI*, 5'-*tatCCTGCAGGTTATACGACTGCCTTATTTG*-3' (SEQ ID NO:10).

[160] Праймеры, применимые для построения плазмиды *pGEM SiaD/GalE*.

[161] *MetQ* WT, с мутацией N238A и *GNA1220*.

[162] Прямой праймер *MetQ_neisseria*, 5'-*atacaattgCCTCAGCGCATGCATC*-3' (SEQ ID NO:9).

[163] Обратный праймер *MetQ_neisseria*, 5'-*tattctagaTTATACGACTGCCTTATTTGGC*-3' (SEQ ID NO:11).

[164] Праймеры, применимые для построения плазмиды pFP12.

[165] MetQ WT и с мутацией N238A.

[166] Прямой праймер MetQ_neisseria, 5'-atacaattgCCTCAGCGCATGCATC-3' (SEQ ID NO:9).

[167] Обратный праймер MetQ_SpeI, 5'-tatACTAGTTTATACGACTGCCTTATTTGGCTG-3' (SEQ ID NO:12).

[168] GNA1220.

[169] Прямой праймер MetQ_neisseria, 5'-atacaattgCCTCAGCGCATGCATC-3' (SEQ ID NO:9).

[170] Обратный праймер GNA1220_StuI, 5'-tatAGGCCTTATACGACTGCCTTATTTGGC-3' (SEQ ID NO:13).

[171] В некоторых вариантах осуществления для подтверждения наличия или отсутствия генов в *Neisseria* могут быть применимы специфические праймеры, например, нижележащий прямой праймер pBS MetQ (SEQ ID NO:15) и нижележащий обратный праймер pBS RBD (SEQ ID NO:16), которые дают фрагмент длиной 800 п. о.

[172] В других вариантах осуществления можно применять вышележащий прямой праймер FHbp (SEQ ID NO:17) и вышележащий обратный праймер (SEQ ID NO:18), которые дают фрагмент длиной 800 п. о. В некоторых вариантах осуществления такие праймеры также можно применять для RBD.

[173] В некоторых вариантах осуществления вышележащий фрагмент длиной 900 п. о. можно получить с прямым праймером Capsule KO GalE (SEQ ID NO:20) и вышележащим обратным праймером Capsule KO metQ (SEQ ID NO:21).

[174] В некоторых вариантах осуществления нижестоящий фрагмент длиной 850 п. о. можно получить с нижележащим прямым праймером Capsule KO Spc (SEQ ID NO:22) и обратным праймером Capsule KO SiaD (SEQ ID NO:23).

[175] В некоторых вариантах осуществления фрагмент длиной приблизительно 770 п. о. можно получить с вышележащим прямым праймером Lpx11 (SEQ ID NO:25) и вышележащим обратным праймером Lpx11 (SEQ ID NO:26).

[176] В некоторых вариантах осуществления нижележащий прямой праймер metQ pBS (SEQ ID NO:15) можно применять для обнаружения MetQ в локусе FHbp вместе с нижележащим обратным праймером Lpx11 (SEQ ID NO:27).

[177] В некоторых вариантах осуществления фрагмент длиной 800 п. о. можно получить с нижележащим прямым праймером pBS GNA1220 (SEQ ID NO:29) и нижележащим обратным праймером RBD pBS (SEQ ID NO:16).

[178] В некоторых вариантах осуществления фрагмент длиной 800 п. о. можно получить с вышележащим прямым FHbp (SEQ ID NO:17) и вышележащим прямым FHbp (SEQ ID NO:18). В некоторых вариантах осуществления такие праймеры также можно применять для RBD.

[179] В некоторых вариантах осуществления прямой праймер для Capsule KO GalE (SEQ ID NO:20) и вышележащий обратный праймер для Capsule KO GNA1220 (SEQ ID

NO:31) можно применять совместно.

[180] В некоторых вариантах осуществления нижестоящий фрагмент длиной 850 п. о. можно получить с нижележащим прямым праймером Capsule KO Spc (SEQ ID NO:22) и обратным праймером Capsule KO SiaD (SEQ ID NO:23).

[181] В некоторых вариантах осуществления фрагмент длиной приблизительно 770 п. о. можно получить с вышележащим прямым праймером Lpx11 (SEQ ID NO:25) и вышележащим обратным праймером Lpx11 (SEQ ID NO:26).

[182] В некоторых вариантах осуществления фрагмент длиной 650 п. о. можно получить с нижележащим прямым праймером pBS GNA1220 (SEQ ID NO:29) и нижележащим обратным праймером Lpx11 (SEQ ID NO:27). В некоторых вариантах осуществления для обнаружения GNA1220 в локусе FHbp можно применять нижележащий прямой праймер GNA1220.

[183] В некоторых вариантах осуществления белковая последовательность, применимая для настоящего изобретения, может предусматривать без ограничения MetQ (SEQ ID NO:1), MetQSM (SEQ ID NO:3), GNA1220 (SEQ ID NO:5 и 7) и NHBA (SEQ ID NO:37).

[184] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением могут быть применимы определенные последовательности плазмид, такие как плазида Bluescript (FHbp KO+MetQ, SEQ ID NO:14), или плазида pGEM (Capsule KO+MetQ), SEQ ID NO:19), или плазида pUC18 (lpxL1 KO+MetQ, SEQ ID NO:24), или плазида Bluescript (FHbp KO+GNA1220, SEQ ID NO:28), или плазида pGEM (Capsule KO+GNA1220, SEQ ID NO:30), или плазида pUC18 (lpxL1 KO+GNA1220, SEQ ID NO:32), или плазида pFP12-MetQ (SEQ ID NO:33), или плазида pFP12-MetQSM, SEQ ID NO:34), или плазида pFP12-GNA1220 (SEQ ID NO:35), или плазида pFP12-GNA1220_helix- $\alpha\beta\alpha$ (SEQ ID NO:36), или плазида pFP12-NHBA (SEQ ID NO:38), или плазида pFP12-NHBA (SEQ ID NO:39), или плазида pBS-FHbpKO-MetQ (SEQ ID NO:40), или плазида pBS-FHbpKO-MetQSM (SEQ ID NO:41), или плазида pBS-FHbpKO-GNA1220 (SEQ ID NO:42), или плазида pBS-FHbpKO-NHba (SEQ ID NO:43), или плазида pUC18-LpxL1KO-MetQ (SEQ ID NO:44), или плазида pUC18-LpxL1KO-MetQSM (SEQ ID NO:45), или плазида pUC18-LpxL1KO-GNA1220 (SEQ ID NO:46), или плазида pUC18-LpxL1KO-NHba (SEQ ID NO:47), или плазида pGEM-SiaD-GalEKO-MetQ (SEQ ID NO:48), или плазида pGEM-SiaD-GalEKO-MetQSM (SEQ ID NO:49), или плазида pGEM-SiaD-GalEKO-GNA1220 (SEQ ID NO:50), или плазида pGEM-SiaD-GalEKO-NHba (SEQ ID NO:51), или плазида pFP12-MetQ (SEQ ID NO:52), или плазида pFP12-MetQSM (SEQ ID NO:53), или плазида pFP12-GNA1220 (SEQ ID NO:54), или плазида pFP12-GNA1220 $\alpha\beta\alpha$ (SEQ ID NO:55), или плазида pFP12-NHba (SEQ ID NO:56).

Фармацевтические или терапевтические композиции для предупреждения бактериальной инфекции

[185] В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением

предусмотрена терапевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая вакцину на основе NOMV, приводящая к экспрессии гонококкового белка, такого как GNA1220, MetQ и/или NHBA или их мутантов, таких как MetQSM, как описано в данном документе. Векторы подробно описаны выше и будут известны специалистам в данной области техники.

[186] В некоторых вариантах осуществления NOMV, приводящая к экспрессии описываемого в данном документе гонококкового белка, может быть предоставлена в виде фармацевтической или терапевтической композиции, предназначенной для введения субъекту или пациенту для лечения гонококковой или менингококковой инфекции. Композиция по настоящему изобретению может содержать NOMV, приводящую к экспрессии описываемого в данном документе гонококкового белка, в одной единице, или, альтернативно, в некоторых вариантах осуществления NOMV, приводящая к экспрессии описываемого в данном документе гонококкового белка, может представлять собой множество NOMV. В некоторых вариантах осуществления NOMV может приводить к экспрессии полного гонококкового белка или может приводить к экспрессии части гонококкового белка, достаточной для обеспечения требуемого иммунологического эффекта.

[187] В некоторых вариантах осуществления описываемый в данном документе гонококковый белок может быть представлен или введен субъекту или пациенту в виде NOMV, которая приводит к экспрессии гонококкового белка. Настоящим изобретением предусмотрена вакцина на основе NOMV, фармацевтические композиции и родственные способы применения таких вакцин, композиций или систем экспрессии для ингибирования, предупреждения или лечения гонококковых и/или менингококковых инфекций. Также предусмотрено применение полинуклеотидов, полипептидов и векторов или систем экспрессии, описанных в данном документе, для получения лекарственного препарата для предупреждения или лечения гонококковых и/или менингококковых инфекций. Фармацевтическая композиция может представлять собой либо терапевтический состав, либо профилактический состав. Как правило, фармацевтическая композиция может содержать один или несколько активных ингредиентов и, необязательно, некоторые неактивные ингредиенты. В некоторых вариантах осуществления активный ингредиент может представлять собой вакцину на основе NOMV, рекомбинантный полипептид, вектор экспрессии или систему экспрессии, которые описаны в данном документе. В некоторых других вариантах осуществления активный ингредиент помимо системы экспрессии по настоящему изобретению может включать другие антибактериальные средства. Композиция может дополнительно включать одну или несколько фармацевтически приемлемых сред-носителей и, необязательно, другие терапевтические ингредиенты (например, антибиотики). В таких композициях также можно применять различные фармацевтически приемлемые добавки.

[188] В некоторых вариантах осуществления вакцину на основе NOMV для лечения гонококковой и/или менингококковой инфекции, которая описана в данном

документе, вместе с рекомбинантными бактериями, содержащими конструкцию или плазмиду, кодирующую гонококковый белок, и содержащие ее фармацевтические композиции, которые описаны в данном документе, можно вводить в любой подходящей дозе для получения терапевтического результата. Как будет понятно специалисту в данной области техники, доза NOMV, подходящая для лечения или предупреждения гонококковой и/или менингококковой инфекции или для достижения конкретного результата, будет варьировать в зависимости от различных факторов, включая без ограничения выбранный ген и промотор, патологическое состояние, специфические для пациента параметры, например, рост, вес и возраст, а также того, что необходимо проводить - предупреждение или лечение. Вакцина на основе NOMV по настоящему изобретению для удобства может быть представлена в форме составов, подходящих для введения, например, в кровоток (например, во внутрикoronарную артерию). Подходящий формат введения может лучше всего определяться практикующим врачом или клиницистом для каждого пациента индивидуально в соответствии со стандартными процедурами и может включать без ограничения внутримышечный, трансбуккальный, ректальный, интракоронарный, внутривенный, интраназальный, трансвагинальный, подкожный, внутриартериальный, внутрисуставной, внутрибрюшинный, парентеральный или любой другой подходящий путь введения, известный в уровне техники.

[189] Вакцину или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получить в соответствии со стандартными процедурами, хорошо известными в уровне техники. См., например, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 19th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1995; Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978; патенты США №№ 4652441, 4917893, 4677191, 4728721 и 4675189. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно легко применять в различных терапевтических или профилактических целях для предупреждения или лечения гонококковых и/или менингококковых инфекций. Субъектам с риском развития гонококковой и/или менингококковой инфекции можно вводить вакцинную композицию по настоящему изобретению для обеспечения профилактической защиты от гонококковой и/или менингококковой инфекции. В зависимости от конкретного субъекта и состояний композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту или пациенту различными путями введения, известными специалистам в данной области техники, например, внутримышечным, подкожным, внутривенным, внутриартериальным, внутрисуставным, внутрибрюшинным или парентеральным путями. В некоторых вариантах осуществления описываемую в данном документе композицию можно вводить нуждающемуся в таком лечении субъекту в течение периода времени и при условиях, достаточных для предупреждения, ингибирования и/или облегчения выбранного заболевания или патологического состояния или одного или нескольких его симптомов. Для терапевтических целей композиция может содержать терапевтически эффективное количество описываемой в данном документе системы экспрессии. Для профилактических

целей описываемая в данном документе композиция может содержать профилактически эффективное количество описываемой в данном документе системы экспрессии. Соответствующее количество системы экспрессии (например, векторов экспрессии) может быть определено, исходя из конкретного подлежащего лечению или предупреждению заболевания или патологического состояния, тяжести, возраста субъекта и других личных характеристик конкретного субъекта (например, общего состояния здоровья субъекта и устойчивости иммунной системы субъекта). Определение эффективных доз может дополнительно основываться на результатах исследований на животных моделях (например, приматах, собаках и т. п.), с результатами последующих клинических испытаний на людях и протоколах введения, которые значительно уменьшают вероятность возникновения или тяжесть симптомов или патологических состояний целевого заболевания у субъекта.

[190] В профилактических целях описываемую в данном документе вакцину на основе NOMV можно вводить до появления какого-либо симптома, например, до инфицирования. Для предупреждения или облегчения любой последующей инфекции может послужить профилактическое введение иммуногенных композиций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления подлежащий лечению субъект представляет собой субъект, у которого имеется или имеется риск развития гонококковой и/или менингококковой инфекции, например, по причине контакта или возможности контакта с бактерией. После введения терапевтически эффективного количества раскрываемых терапевтических композиций субъект или пациент может находиться под наблюдением в отношении гонококковой и/или менингококковой инфекции, симптомов, связанных с гонококковой и/или менингококковой инфекцией, или и того, и другого.

[191] Для терапевтических целей описываемую в данном документе композицию можно вводить при наличии или после появления симптома заболевания или инфекции, например, после развития симптома гонококковой и/или менингококковой инфекции или после диагностики инфекции. Таким образом, описываемую в данном документе композицию можно вводить до ожидаемого контакта с гонококковым бактериальным штаммом или менингококковым бактериальным штаммом для того, чтобы ослабить ожидаемую тяжесть, продолжительность или степень инфекции и/или сопутствующих симптомов заболевания, после контакта или подозрения на контакт с бактерией или после фактического начала инфекции.

[192] В некоторых вариантах осуществления вакцина на основе NOMV по настоящему изобретению может быть представлена в лекарственной форме, содержащей некоторое количество NOMV, которые приводят к экспрессии гонококкового белка или содержат его, при этом лекарственная форма эффективна за одну или несколько доз. Эффективная доза может представлять собой любой диапазон, который клиницист или практикующий врач сочтет подходящим. Введение вакцины на основе NOMV с гонококковым белком, рекомбинантным бактериальным штаммом, экспрессирующим гонококковый белок, или композиции, содержащей любой из них, можно осуществлять в

буфере, таком как фосфатно-солевой буферный раствор, или другом подходящем буфере или разбавителе. Количество буфера или разбавителя может варьировать и будет определяться клиницистом или практикующим врачом. Для доставки в клетку только плазмидной ДНК или плазмидной ДНК в комплексе с другими макромолекулами вводимое количество ДНК должно быть таким количеством, которое оказывает благоприятный эффект на реципиента. Например, можно вводить от 0,0001 до 1 мг или больше, например до 1 г, в виде отдельных или разделенных доз, например от 0,001 до 0,5 мг или от 0,01 до 0,1 мг ДНК. Для доставки рекомбинантного полипептида, такого как гонококковый белок (например, GNA1220, MetQ, MetQSM и/или NHBA) или его производных, которые описаны в данном документе, вводимое количество будет представлять собой количество, которое оказывает благоприятный эффект на реципиента. Например, можно вводить от 0,0001 до 100 г или больше, например до 1 г, в виде индивидуальных или разделенных доз, например от 0,001 до 0,5 мг или от 0,01 до 0,1 мг рекомбинантного полипептида. Для доставки описываемой в данном документе вакцины на основе NOMV вводимое количество будет представлять собой количество, которое оказывает благоприятный эффект на реципиента, будь то терапевтический или профилактический эффект. Такие количества или объемы будут определяться клиницистом или практикующим врачом.

[193] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению можно сочетать с другими средствами, известными в уровне техники, для лечения или предупреждения гонококковых и/или менингококковых инфекций. К ним может относиться любое лекарственное средство, известное или доступное в уровне техники, для лечения бактериальной инфекции, например антитела или другие антибактериальные средства, такие как антибактериальные соединения или лекарственные средства, ингибиторы протеаз, ингибиторы на основе слитых белков и т. п. В некоторых вариантах осуществления описываемая в данном документе композиция для лечения или предупреждения гонококковой и/или менингококковой инфекции может быть полезной в ситуациях, когда пациент или субъект не отвечает на лечение антибиотиками по причине повышения устойчивости бактерий к антибиотикам. Введение композиции и одного или нескольких известных антибактериальных средств можно осуществлять либо одновременно, либо последовательно.

[194] Как описано в данном документе, вакцины на основе NOMV вызывают выработку более высоких титров антител с более широкой реактивностью, чем соответствующие рекомбинантные белки, и могут легче переноситься, поскольку для обеспечения эффективного защитного ответа с образованием антител может быть необходимо меньшее количество белка. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления NOMV можно вводить с адьювантом для усиления ответов с образованием антител. Подходящие адьюванты известны в уровне техники и могут включать без ограничения соединения алюминия [например, аморфный гидроксифосфатсульфат алюминия (AAHS), гидроксид алюминия, фосфат алюминия,

сульфат калия-алюминия (квасцы), адъювант на основе гидроксида алюминия (2% ALHYDROGEL)], цитозин-фосфогуаниновые (CpG) нуклеотиды (например, CpG 1018), AS01, AS04, QS-21, RIBI, MF59 или подобные.

Экспрессия нуклеиновых кислот

[195] Полинуклеотиды, применимые в настоящем изобретении, могут быть представлены в конструкции экспрессии. Конструкции экспрессии по настоящему изобретению обычно включают регуляторные элементы, которые функционируют в предполагаемой клетке-хозяине, в которой должна экспрессироваться конструкция экспрессии. Таким образом, специалист в данной области техники может подобрать регуляторные элементы для применения, например, в бактериальных клетках-хозяевах, дрожжевых клетках-хозяевах, клетках-хозяевах млекопитающих и клетках-хозяевах человека. Регуляторные элементы, применяемые для экспрессии ядерных генов, предусматривают промоторы, последовательности терминации транскрипции, последовательности терминации трансляции, энхансеры и элементы полиаденилирования. Используемый в данном документе термин “конструкция экспрессии” относится к комбинации последовательностей нуклеиновых кислот, которая обеспечивает транскрипцию функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты. Используемый в данном документе термин “функционально связанный” относится к соседству описанных компонентов, где компоненты находятся во взаимосвязи, которая позволяет им функционировать предполагаемым образом. Как правило, функционально связанные компоненты находятся в смежной связи.

[196] Конструкция экспрессии по настоящему изобретению может содержать промоторную последовательность, функционально связанную с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид по настоящему изобретению. Промоторы могут быть включены в полинуклеотид с помощью стандартных методик, известных в уровне техники. В конструкции экспрессии по настоящему изобретению можно использовать несколько копий промоторов или несколько промоторов. В предпочтительном варианте осуществления промотор может быть расположен приблизительно на таком же расстоянии от сайта начала транскрипции в конструкции экспрессии, как и от сайта начала транскрипции в естественном генетическом окружении. Допускается некоторое изменение этого расстояния без существенного снижения активности промотора. Сайт начала транскрипции обычно включен в конструкцию экспрессии.

[197] Конструкция ядерной экспрессии по настоящему изобретению необязательно может содержать последовательность терминации транскрипции, последовательность терминации трансляции, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, и/или энхансерные элементы. Области терминации транскрипции обычно можно получить из 3'-нетранслируемой области последовательности эукариотического или вирусного гена. Для обеспечения эффективной терминации последовательности терминации транскрипции могут быть нижележащими относительно кодирующей последовательности. Сигнальная

пептидная последовательность представляет собой короткую аминокислотную последовательность, обычно присутствующую на аминоконце белка, которая отвечает за перемещение функционально связанного зрелого полипептида в широкий спектр посттрансляционных клеточных мест назначения, начиная от компартмента конкретной органеллы и заканчивая сайтами действия белков и внеклеточной среды. Для применения с полипептидами по настоящему изобретению предусмотрено нацеливание генных продуктов на предполагаемое клеточное и/или внеклеточное место назначения посредством применения функционально связанной сигнальной пептидной последовательности. Классические энхансеры представляют собой цис-действующие элементы, которые повышают транскрипцию генов, и также могут быть включены в конструкцию экспрессии. Классические энхансерные элементы известны в уровне техники и включают без ограничения энхансерный элемент раннего промотора цитомегаловируса (CMV) и энхансерный элемент SV40. Также в уровне техники известны интрон-опосредованные энхансерные элементы, которые усиливают экспрессию генов. Такие элементы должны присутствовать в транскрибируемой области и зависят от ориентации.

[198] Также в конструкцию экспрессии можно включить последовательности ДНК, которые управляют полиаденилированием mRNA, транскрибируемой с конструкции экспрессии, такие как поли-A-сигнал SV40, и к ним относятся без ограничения октопинсинтазный или нопалинсинтазный сигнал.

[199] Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут состоять либо из РНК, либо из ДНК, либо из их гибридов. Настоящее изобретение также охватывает те полинуклеотиды, которые комплементарны по последовательности раскрываемым в данном документе полинуклеотидам. Полинуклеотиды и полипептиды по настоящему изобретению могут быть представлены в очищенной или выделенной форме.

Нуклеиновые кислоты

[200] Для выделения молекулы ДНК и осуществления манипуляций с ней можно применять любые способы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Например, как описано ранее, для амплификации конкретной исходной молекулы ДНК и/или для получения вариантов исходной молекулы ДНК можно применять технологию ПЦР. Молекулы ДНК или их фрагменты также можно получать с помощью любых методик, известных в уровне техники, включая прямой синтез фрагмента химическими средствами. Таким образом, можно синтезировать всю нуклеиновую кислоту или ее часть, которые описаны в данном документе.

[201] Используемые в данном документе термины “нуклеиновая кислота” и “полинуклеотид” относятся к дезоксирибонуклеотиду, рибонуклеотиду или смешанному полимеру из дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов в одноцепочечной или двухцепочечной форме и, если не указано иное, будут охватывать известные аналоги природных нуклеотидов, которые могут функционировать аналогично природным нуклеотидам. Полинуклеотидные последовательности предусматривают

последовательность цепи ДНК, которая транскрибируется в РНК, и последовательность цепи, которая комплементарна транскрибируемой цепи ДНК. Полинуклеотидные последовательности также предусматривают как полноразмерные последовательности, так и более короткие последовательности, полученные из полноразмерных последовательностей. Полинуклеотидная последовательность предусматривает как смысловую, так и бессмысловую цепи, либо в виде отдельных цепей, либо в виде дуплекса.

Наборы

[202] Настоящим изобретением дополнительно предусмотрен набор, содержащий один или несколько одноразовых контейнеров, содержащих описываемую в данном документе вакцину на основе NOMV. В некоторых вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может содержать композицию, содержащую вакцину на основе NOMV, для лечения или предупреждения гонококковой и/или менингококковой инфекции, как описано в данном документе. В других вариантах осуществления описываемый в данном документе набор может содержать описываемый в данном документе бактериальный штамм, например, в культуре или в виде замороженной биомассы в сочетании, например, с глицерином. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать фармацевтическую композицию, содержащую вакцину на основе NOMV или очищенный препарат гонококкового белка, такого как GNA1220, MetQ, MetQSM и/или NHBA, в виде полипептида (например, в смеси со вспомогательным веществом), как описано в данном документе, для введения субъекту или пациенту. В других вариантах осуществления при необходимости могут быть предоставлены стерильные реагенты и/или расходные материалы для введения вакцины на основе NOMV, очищенного гонококкового белка, РНК, векторов и/или фармацевтической композиции, которые описаны в данном документе. Набор может дополнительно содержать реагенты для трансформации и/или трансфекции клеток, бактериальную или вирусную культуру и т. д.

[203] Компоненты, представленные в наборе по настоящему изобретению, могут включать, например, любые исходные материалы, применимые для осуществления описываемого в данном документе способа. Такой набор может содержать один или несколько таких реагентов или компонентов для применения в ряде анализов, включая, например, анализы нуклеиновых кислот, например, анализы PCR или RT-PCR, анализы с люциферазой (Luc), анализы трансформации/трансфекции клеток, анализы с вирусной/клеточной культурой, анализы крови, т. е. общий анализ крови (СВС), анализы вирусного титра/вирусной нагрузки, анализы антител, анализы обнаружения вирусных антигенов, анализы обнаружения ДНК или РНК, анализы бактериальных титров, анализы нейтрализации вирусов, анализы генетической комплементации или любой другой анализ, применимый в соответствии с настоящим изобретением. Компоненты могут быть представлены в лиофилизированной, обезвоженной или высушенной форме, при необходимости, или могут быть представлены в виде водного раствора или другой

жидкой среды, подходящей для применения в соответствии с настоящим изобретением.

[204] Наборы, применимые для настоящего изобретения, могут также включать дополнительные реагенты, например буферы, субстраты, антитела, лиганды, реагенты для обнаружения, компоненты среды, такие как соли, в том числе $MgCl_2$, фермент полимеразу, дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, векторы экспрессии и др., реагенты для выделения ДНК, трансфекции ДНК/РНК и др., как описано в данном документе. Такие реагенты или компоненты хорошо известны в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления в набор по настоящему изобретению могут быть включены одно или несколько описываемых в данном документе вспомогательных средств. При необходимости реагенты, включенные в такой набор, могут поставляться либо в том же контейнере или среде, что и любая пара праймеров, либо с несколькими парами праймеров. В некоторых вариантах осуществления такие реагенты могут размещаться во втором или дополнительном отдельном контейнере, в котором может размещаться дополнительная композиция или реагенты, и могут быть соответствующим образом разделены на аликвоты. В качестве альтернативы, реагенты могут поставляться в одном контейнере. Набор по настоящему изобретению может также включать упаковочные компоненты, инструкции по применению, включающие, при необходимости, требования к хранению отдельных компонентов. Такой набор, описываемый в данном документе, может быть составлен для применения в клинических условиях, таких как больница, лечебный центр или клиническое учреждение, или может быть составлен, при необходимости, для личного применения.

Определения

[205] Если указан диапазон значений, подразумевается, что настоящим изобретением охватывается каждое промежуточное значение с точностью до десятой доли единицы нижнего предела, если контекст явно не указывает иное, между верхним и нижним пределом такого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут независимо быть включены в меньшие диапазоны и также охватываются настоящим изобретением с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. В тех случаях, когда указанный диапазон включает один или оба предела, в настоящее изобретение также включены диапазоны, исключаящие один или оба указанных предела.

[206] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при реализации на практике или тестировании настоящего изобретения можно также применять любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые в данном документе публикации включены в данный документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми процитированы

публикации. Рассматриваемые в данном документе публикации приведены исключительно в связи с их раскрытием до даты подачи настоящей заявки. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как допущение того, что настоящее изобретение не может предшествовать такой публикации в силу предшествующего раскрытия. Дополнительно, представленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут потребовать независимого подтверждения.

[207] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Ниже определена конкретная терминология, имеющая особое значение для описания настоящего изобретения.

[208] Используемая в данном описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа вместе с аналогичными отсылками, используемыми в контексте описания конкретного варианта осуществления (особенно в контексте определенных пунктов представленной далее формулы изобретения), может быть истолкована как охватывающая как единственное, так и множественное число, если специально не указано иное. Так, например, “активное средство” относится не только к одному активному средству, но и к комбинации двух или более различных активных средств, “лекарственная форма” относится к комбинации лекарственных форм, а также к однократной лекарственной форме и т. п. В некоторых вариантах осуществления используемый в данном документе термин “или”, включая формулу изобретения, используют для обозначения “и/или”, если явно не указано, что он относится только к альтернативам или альтернативы являются взаимоисключающими.

[209] В некоторых вариантах осуществления числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как молекулярный вес, условия реакции и т. д., применяемые для описания и заявления определенных вариантов осуществления настоящего изобретения, следует понимать как модифицированные в некоторых случаях термином “приблизительно”. В некоторых вариантах осуществления термин “приблизительно” применяют для обозначения того, что значение включает стандартное отклонение среднего значения для устройства или способа, используемого для определения значения. В некоторых вариантах осуществления числовые параметры, указанные в письменном описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьировать в зависимости от требуемых свойств, которые должны быть получены с помощью конкретного варианта осуществления. В некоторых вариантах осуществления числовые параметры следует интерпретировать в свете количества указанных значащих цифр и путем применения обычных методик округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, задающие широкий объем некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, представляют собой приближения, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, представлены настолько точно, насколько это практически возможно. Числовые значения, представленные в некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения, могут содержать определенные ошибки, обязательно являющиеся следствием стандартного отклонения, имеющего места в их соответствующих результатах измерения, полученных в ходе тестирования. Перечисление диапазонов значений в данном документе подразумевают лишь как служащее в качестве сокращенного способа отсылки к каждому отдельному значению, попадающему в данный диапазон. Если в данном документе не указано иное, каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было приведено в данном документе отдельно. В некоторых вариантах осуществления “приблизительно” относится к указанному значению +/- 10%, или 9%, или 8%, или 7%, или 6%, или 5%, или 4%, или 3%, или 2%, или 1%.

[210] Термины “содержать”, “иметь” и “включать” являются открытыми глаголами-связками. Также открытыми являются любые формы или времена одного или нескольких из данных глаголов, такие как “содержит”, “содержащий”, “имеет”, “имеющий”, “включает” и “включающий”. Например, любой способ, который “содержит”, “имеет” или “включает” одну или несколько стадий, не ограничивается наличием только данных одной или нескольких стадий и может также охватывать другие неперечисленные стадии. Аналогично, любая композиция или любое устройство, которое “содержит”, “имеет” или “включает” один или несколько элементов, не ограничивается наличием только данных одного или нескольких элементов и может также охватывать другие неперечисленные элементы.

[211] Используемый в данном документе термин “нежелательное явление” относится к любому неблагоприятному медицинскому проявлению, ассоциированному с применением описываемого в данном документе лекарственного средства или вакцины у людей, независимо от того, считается ли оно связанным с лекарственным средством или нет. АЕ или подозреваемую нежелательную реакцию можно рассматривать как “серьезное нежелательное явление”, если оно приводит к любому из следующих исходов: смерть или непосредственный риск смерти, госпитализация в стационар или продление существующей госпитализации, стойкая или серьезная недееспособность или существенное нарушение способности вести нормальную жизнедеятельность, врожденная аномалия/врожденный дефект. Нежелательное явление также может быть важным медицинским явлением, которое может не приводить к смерти, не быть опасным для жизни или не нуждаться в госпитализации, но может представлять опасность для пациента или субъекта и может нуждаться в медицинском или хирургическом вмешательстве для предупреждения одного из вышеуказанных исходов. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление относится к инфузионной реакции в результате введения описываемого в данном документе лекарственного средства или вакцины.

[212] Используемый в данном документе термин “анафилаксия” относится к тяжелой, острой аллергической реакции, которая может развиваться в течение периода от нескольких минут до нескольких часов. Анафилаксия может задействовать кожу, слизистую ткань или и то, и другое и может характеризоваться одним или несколькими

симптомами, в том числе без ограничения генерализованной сыпью, зудом (чесоткой), гиперемией, отеком губ, языка, горла или язычка, одышкой, рвотой, головокружением, стерторозным дыханием, нестабильностью гемодинамики и высыпаниями или крапивницей. Кроме того, анафилаксия может сопровождаться по меньшей мере одним из следующих симптомов: нарушение дыхания (например, диспноэ, хрипы с бронхоспазмом, стридор, снижение пиковой скорости выдоха, гипоксемия) и снижение кровяного давления (т. е. систолическое кровяное давление <90 мм рт. ст. или снижение более чем на 30% по сравнению с исходным уровнем у данного человека) или сопутствующие симптомы недостаточности целевых органов (например, гипотония [обморочное состояние], синкопе, недержание). Анафилаксию в соответствии с настоящим изобретением определяют с помощью клинических критериев Национального института по изучению аллергических и инфекционных заболеваний/Сети по изучению пищевой аллергии и анафилаксии (NIAID/FAAN) для диагностики анафилаксии.

[213] Используемые в данном документе термины “антиген” или “иммуноген” применяют взаимозаменяемо для обозначения вещества, обычно белка, которое способно индуцировать иммунный ответ у субъекта. Данный термин также относится к белкам, которые являются иммунологически активными в том смысле, что при его введении субъекту (либо непосредственно, либо путем введения субъекту нуклеотидной последовательности или вектора, кодирующего белок) он способен вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против такого белка.

[214] Используемый в данном документе термин “совместное введение” относится к одновременному введению одного или нескольких лекарственных средств с другим лекарственным средством. В других вариантах осуществления оба лекарственных средства вводят одновременно. Как описано в других разделах в данном документе, совместное введение может также относиться к любому конкретному периоду времени введения любого одного лекарственного средства или обоих лекарственных средств. Например, как описано в данном документе, лекарственное средство можно вводить за несколько часов, дней или недель до введения другого лекарственного средства, и это все еще считается совместным введением. В некоторых вариантах осуществления совместное введение может относиться к любому моменту введения любого одного лекарственного средства, так чтобы оба лекарственных средства присутствовали в организме пациента одновременно. В некоторых вариантах осуществления любое лекарственное средство можно вводить до или после другого, при условии, что они оба присутствуют в организме пациента в течение достаточного периода времени, чтобы пациент получил надлежащие клинические или фармакологические эффекты.

[215] Используемые в данном документе термины “эффективное количество” и “терапевтически эффективное количество” относятся к количеству средства, вакцины, соединения, лекарственного средства, композиции или комбинации, которое является нетоксичным и эффективным для получения требуемого терапевтического эффекта при введении субъекту или пациенту (например, субъекту-человеку или пациенту), с тем

чтобы уменьшить или устранить признак или симптом патологического состояния или заболевания. Например, как описано в данном документе, эффективное количество может представлять собой количество, необходимое для лечения или предупреждения гонококковой инфекции или для заметного изменения внешних симптомов гонококковой инфекции. В целом, данного количества будет достаточно для заметного ингибирования бактериальной репликации или инфекционности или для облегчения симптомов инфекции. В некоторых примерах “эффективное количество” представляет собой количество, которое обеспечивает лечение (в том числе профилактику) одного или нескольких симптомов и/или основных причин любого из нарушения или заболевания. В одном примере эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество. В одном примере эффективное количество представляет собой количество, которое предупреждает развитие одного или нескольких признаков или симптомов конкретного заболевания или патологического состояния.

[216] Используемый в данном документе термин “эпитоп” относится к антигенной детерминанте. Эпитопы представляют собой определенные химические группы или пептидные последовательности на молекуле, которые являются антигенными, так что они вызывают специфический иммунный ответ, например, эпитоп представляет собой область антигена, на которую дают ответ В- и/или Т-клетки. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, совмещенных в результате третичной укладки белка.

[217] Используемый в данном документе термин “конструкция экспрессии” относится к конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает кодирующую экзогенный белок нуклеиновую кислоту, которая может быть транскрибирована и транслирована для осуществления своей функции у реципиента, которому она была введена. В некоторых вариантах осуществления такая конструкция экспрессии может содержать последовательности ДНК, последовательности РНК или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления такая конструкция может быть способами генной инженерии встроена в плазмиду или вектор, подходящие для введения субъекту или пациенту, такому как конкретный бактериальный штамм или пациент-человек. Например, как описано в данном документе, конструкция по настоящему изобретению может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гонококковый белок.

[218] Используемый в данном документе термин “экзогенная последовательность” относится к последовательности нуклеиновой кислоты, источник происхождения которой находится за пределами клетки-хозяина. Экзогенная последовательность может представлять собой последовательность ДНК, последовательность РНК или их комбинацию. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой тип нуклеиновой кислоты, доступный в уровне техники, что будет понятно специалисту в данной области техники. Такая последовательность нуклеиновой кислоты может быть получена из другого вида или того же вида, что и клетка, в которую ее доставляют. В некоторых вариантах осуществления последовательность экзогенной нуклеиновой

кислоты в соответствии с настоящим изобретением может кодировать описываемый в данном документе гонококковый белок, подходящий для введения субъекту или пациенту. Такой рекомбинантный полипептид можно вводить субъекту или пациенту с целью лечения или предупреждения гонококковой и/или менингококковой инфекции.

[219] Используемый в данном документе термин “доставка гена” относится к введению экзогенного полинуклеотида в клетку для переноса гена и может охватывать нацеливание, связывание, поглощение, транспорт, локализацию, встраивание репликона и экспрессию.

[220] Используемый в данном документе термин “перенос гена” относится к введению экзогенного полинуклеотида в клетку, что может охватывать нацеливание, связывание, поглощение, транспорт, локализацию и встраивание репликона, но отличается тем, что не подразумевает последующей экспрессии гена.

[221] Используемый в данном документе термин “экспрессия гена” или “экспрессия” относится к процессу транскрипции гена, трансляции и посттрансляционной модификации.

[222] Используемый в данном документе термин “нативная везикула внешней мембраны” или “NOMV” относится к внешней мембране *N. meningitidis*, состоящей в основном из липоолигосахаридов (LOS), белков внешней мембраны (OMP) и фосфолипидов, и в норме очень слабо прикреплена к клеточной стенке. При стационарном росте бактерий везикулы или пузырьки внешней мембраны высвобождаются в окружающую среду. Данные нативные везикулы внешней мембраны (NOMV) состоят из интактной внешней мембраны, включая все ассоциированные белки и LOS, но без периплазматических и цитоплазматических компонентов. Используемый в данном документе термин NOMV относится к OMV, которые не подвергнуты обработке детергентом, т. е. к “нативным”.

[223] Используемый в данном документе термин “*Neisseria gonorrhoeae*” или “Ng” относится к гонококковому бактериальному штамму, применяемому так, как описано в данном документе, который является причиной гонококковой инфекции.

[224] Используемый в данном документе термин “*Neisseria meningitidis*” или “Nm” относится к менингококковому бактериальному штамму, применяемому так, как описано в данном документе, для экспрессии описываемого в данном документе гонококкового белка. Nm является возбудителем менингококковой инфекции.

[225] Под “фармацевтически приемлемым” подразумевают материал, который не является биологически или иным образом нежелательным, т. е. материал может быть включен в фармацевтическую композицию, вводимую пациенту, без индукции каких-либо нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любым из других компонентов композиции, в которой он содержится. При использовании термина “фармацевтически приемлемый” для обозначения фармацевтического носителя или вспомогательного вещества подразумевают, что носитель или вспомогательное вещество соответствует требуемым стандартам токсикологических и производственных испытаний

или что он включен в Руководство по неактивным ингредиентам, подготовленное Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США. “Фармакологически активное” (или просто “активное”), как в случае “фармакологически активного” (или “активного”) производного или аналога, относится к производному или аналогу, обладающему тем же типом фармакологической активности, что и исходное соединение, и примерно в эквивалентной степени. Термин “фармацевтически приемлемые соли” включает соли присоединения кислоты, которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т. п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т. п.

[226] Используемый в данном документе термин “уменьшение” относится к снижению или ослаблению, такому как уменьшение симптомов гонококковой инфекции. В некоторых вариантах осуществления введение описываемой в данном документе вакцины, такой как вакцина на основе NOMV, может привести к “уменьшению” или ослаблению симптомов у пациента по сравнению с пациентом, которому не была введена такая вакцина. “Уменьшение” может также относиться к уменьшению симптомов заболевания в результате описываемого в данном документе лечения, либо отдельно, либо при совместном введении с другим лекарственным средством.

[227] Используемый в данном документе термин “субъект”, или “индивидуум”, или “пациент” относится к любому пациенту, для которого или которому требуется терапия или лечение от гонококковой и/или менингококковой инфекции, и обычно относится к получателю терапии. “Субъект” или “пациент” относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, например, человеку и отличным от человека млекопитающим. Примеры отличных от человека животных включают собак, кошек, крупный рогатый скот, лошадей, овец, свиней, коз, кроликов и т. д. Если не упомянуто иное, термины “пациент” или “субъект” в данном документе применяют взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению по терапевтическим задачам по настоящему изобретению, может представлять собой примата, например, человека и отличных от человека приматов.

[228] В контексте данного документа введение полинуклеотида или вектора в клетку-хозяина или субъекту относится к введению в клетку или субъекту с помощью любых обычно применяемых на практике способов. Сюда относится “трансдукция”, “трансфекция”, “трансформация” или “трансдукция”, как хорошо известно в уровне техники. Все данные термины относятся к стандартным способам введения экзогенного полинуклеотида, например, гонококкового белка, в клетку-хозяина (например, *N. meningitidis*), что приводит к экспрессии полинуклеотида, например трансгена в клетке, и предусматривает применение плазмид и/или рекомбинантных вирусов для введения

экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяина. Трансдукцию, трансфекцию или трансформацию полинуклеотида в клетке можно определить способами, хорошо известными в уровне техники, в том числе без ограничения с помощью экспрессии белка (в том числе стационарных уровней), например, с помощью ELISA, проточной цитометрии и вестерн-блоттинга, измерения ДНК и РНК с помощью анализов, например, нозерн-блоттинга, саузерн-блоттинга, анализов функции с репортером (Luc) и/или анализов подвижности по смещению в геле. Способы, применяемые для введения экзогенного полинуклеотида, включают хорошо известные методики, такие как бактериальная и/или вирусная инфекция или трансфекция, липофекция, трансформация и электропорация, а также другие невирусные методики доставки генов. Введенный полинуклеотид может стабильно или временно сохраняться в клетке-хозяине.

[229] Термины “транскрипционные регуляторные последовательности” или “TRS”, используемые в настоящем изобретении, обычно включают по меньшей мере один транскрипционный промотор и могут также включать один или несколько энхансеров и/или терминаторов транскрипции. “Функционально связанные” относятся к расположению двух или более компонентов, где описываемые таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать скоординированным образом. В качестве иллюстрации, транскрипционная регуляторная последовательность или промотор функционально связаны с кодирующей последовательностью, если TRS или промотор способствует транскрипции кодирующей последовательности. Функционально связанная TRS обычно соединена в цис-положении с кодирующей последовательностью, но не обязательно находится непосредственно рядом с ней.

[230] Термины “осуществление лечения” и “лечение”, или “облегчение”, или “уменьшение”, используемые в данном документе, относятся к уменьшению или ослаблению тяжести и/или частоты проявления симптомов, устранению симптомов и/или основной причины, а также к улучшению или устранению повреждения например, гонококковой и/или менингококковой инфекции. Фраза “введение пациенту” относится к процессу введения композиции, вакцины или лекарственной формы пациенту с помощью известных в уровне техники средств введения. “Осуществление лечения” или “облегчение” также включает введение соединений или средств субъекту для предупреждения или задержки появления симптомов, осложнений или биохимических признаков заболевания (например, гонококковой и/или менингококковой инфекции), облегчения симптомов или остановки либо ингибирования дальнейшего развития заболевания, патологического состояния или нарушения. К нуждающимся в лечении субъектам относятся субъекты, которые уже страдают от заболевания или нарушения, а также субъекты, у которых есть риск развития заболевания или нарушения. Лечение может быть профилактическим (для предупреждения или отсрочки начала заболевания или для предупреждения проявления его клинических или субклинических симптомов) или терапевтическим подавлением или облегчением симптомов после проявления заболевания.

[231] “Вектор” представляет собой нуклеиновую кислоту с носителем или без него, которую можно ввести в клетку. Векторы, способные управлять экспрессией генов, кодирующих один или несколько полипептидов, называются “векторами экспрессии”. Примеры векторов, подходящих для настоящего изобретения, включают, например, вирусные векторы, плазмидные векторы, липосомы и другие среды-носители для доставки генов.

[232] Все способы, описываемые в данном документе, могут быть осуществлены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иным образом явно не противоречит контексту. Применение всех без исключения примеров или иллюстративных формулировок (например, “такой как”), представленных в отношении определенных вариантов осуществления в данном документе, предназначено лишь для лучшего освещения настоящего изобретения и не налагает ограничения на объем в остальном заявляемого настоящего изобретения. Никакая формулировка в описании не должна быть истолкована как указывающая на какой-либо не заявленный элемент, существенный для реализации на практике настоящего изобретения.

[233] Группы альтернативных элементов или вариантов осуществления настоящего изобретения, которые раскрыты в данном документе, не должны истолковываться как ограничения. Каждый член группы может упоминаться и заявляться индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, упоминаемыми в данном документе. По соображениям удобства или патентоспособности в группу могут быть включены один или несколько членов группы или исключены из нее.

[234] После подробного описания настоящего изобретения станет очевидным, что возможны модификации, вариации и эквивалентные варианты осуществления без отклонения от объема настоящего изобретения, определяемого в прилагаемой формуле изобретения. Более того, следует понимать, что все примеры в настоящем изобретении представлены в качестве неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

[235] В последующих примерах представлены примеры вариантов осуществления настоящего изобретения. Последующие примеры представлены лишь в качестве иллюстрации и для помощи специалисту в применении настоящего изобретения. Примеры никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Нокаут генов *fhbp*, *siaD-galE* и *lpxL1* путем вставки гена, кодирующего антигена *N. gonorrhoeae* (Ng)

[236] Трансформация *N. meningitidis*

[237] Штамм H44/76, в котором были инактивированы гены *fhbp*, *siaD-galE* и *lpxL1* (H44/76 Δ FHbp Δ Capsule Δ lpxL1) и вставлены копии GNA1220, MetQ и/или MetQSM, получали путем гомологичной рекомбинации посредством трансформации плазмидами pBS-FHbpKO-[GNA1220, MetQ или MetQSM]-ERM с применением отбора с помощью эритромицина (10 мкг/мл), pGEM-SiaD/GalEKO-[GNA1220, MetQ или MetQSM]-SPC с

применением отбора с помощью спектиномицина (50 мкг/мл), pUC18-lpxL1KO-[GNA1220, MetQ или MetQSM]-KAN с применением отбора с помощью канамицина (50 мкг/мл) и pFP12-[GNA1220, MetQ или MetQSM]-CAT. Трансформации, начиная со штамма дикого типа, осуществляли в следующем порядке:

[238] (1) гены белков оболочки подвергали нокауту и вносили первую копию [GNA1220, MetQ или MetQSM] (плазмида pGEM-SiaD/GalEKO-[GNA1220, MetQ или MetQSM]-SPC);

[239] (2) ген lpxL1 подвергали нокауту и вносили вторую копию [GNA1220, MetQ или MetQSM] (плазмида pUC18-lpxL1KO-[GNA1220, MetQ или MetQSM]-KAN);

[240] (3) ген FHbp подвергали нокауту и вносили третью копию [GNA1220, MetQ или MetQSM] (плазмида pBS-FHbpKO-[GNA1220, MetQ или MetQSM]-ERM);

[241] (4) сверхэкспрессия [GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA] (плазмида pFP12-[GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA]-CAT).

[242] Следует отметить, что NHBA экспрессировался в родительском штамме с pFP12, в котором были нокаутированы siaD-galE, LpxLa и FHbp, но не заменены копиями NHBA.

[243] Из чашки с агаровой средой TSB (триптический соевый бульон, неживотного происхождения) отбирали от десяти до 15 колоний штамма H44/76, которые выращивали в течение ночи. Колонии бактерий смешивали с 3 мкг плазмиды, высевали на чашку с агаровой средой TSB и инкубировали в течение 6 ч при температуре 37°C. Серийные разведения бактерий повторно культивировали на чашках с агаровой средой TSB, содержащих антибиотик для отбора. Планшеты с культурами инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, а затем колонии подвергали скринингу в отношении экспрессии GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA и в отношении отсутствия экспрессии FHbp, Capsule и lpxL1 с помощью анализа способом проточной цитометрии с применением специфических антител и с помощью ПЦР с применением термоинактивированных клеток. Положительные отдельные колонии замораживали в 10% обезжиренном молоке (вес/объем) и 15% глицерине и хранили при температуре -80°C.

[244] Праймеры

[245] Праймеры для перехода к плазмидам pUC18 Lpxl1 и pBS FHbp были следующими:

[246] MetQ WT и с мутацией N238A.

[247] Прямой праймер MetQ_neisseria: 5'atacaattgCCTCAGCGCATGCATC 3' (SEQ ID NO:9).

[248] Обратный праймер MetQ_SbfI: 5' tatCCTGCAGGTTATACGACTGCCTTATTTG 3' (SEQ ID NO:10).

[249] GNA1220.

[250] Прямой праймер MetQ_neisseria: 5'atacaattgCCTCAGCGCATGCATC 3' (SEQ ID NO:9).

[251] Обратный праймер GNA1220_SbfI:

[252] 5' tatCCTGCAGGTTATACGACTGCCTTATTTG 3' (SEQ ID NO:10).

[253] Праймеры для перехода к плазмиде pGEM SiaD/GalE.

[254] MetQ WT, с мутацией N238A и GNA1220.

[255] Прямой праймер MetQ_neisseria: 5' atacaattgCCTCAGCGCATGCATC 3' (SEQ ID NO:9).

[256] Обратный праймер MetQ_neisseria: 5' tattctagaTTATACGACTGCCTTATTTGGC 3' (SEQ ID NO:11).

[257] Праймеры для перехода к плазмиде pFP12.

[258] MetQ WT и с мутацией N238A.

[259] Прямой праймер MetQ_neisseria: 5' atacaattgCCTCAGCGCATGCATC 3' (SEQ ID NO:9).

[260] Обратный праймер MetQ_SpeI: 5' tatACTAGTTTATACGACTGCCTTATTTGGCTG 3' (SEQ ID NO:12).

[261] GNA1220.

[262] Прямой праймер MetQ_neisseria: 5' atacaattgCCTCAGCGCATGCATC 3' (SEQ ID NO:9).

[263] Обратный праймер GNA1220_StuI: 5' tatAGGCCTTATACGACTGCCTTATTTGGC 3' (SEQ ID NO:13).

[264] Нижележащий прямой праймер metQ pBS: 5' CCCTGTTCCAAGAGCCGAGC 3' (SEQ ID NO:15).

[265] Нижележащий обратный праймер RBD pBS: 5' AGCTTCTTCCAGCGCGAACG 3' (SEQ ID NO:16), дающий фрагмент длиной 800 п. о.

[266] Вышележащий прямой праймер Fhbr (также данный набор праймеров применяли для RBD): 5' GGCGAAATCGGCGTATTGGG 3' (SEQ ID NO:17).

[267] Вышележащий обратный праймер Fhbr: 5' CTACATTACGCATTTGGAATACC 3' (SEQ ID NO:18), дающий фрагмент длиной 800 п. о.

[268] Построение челночного вектора pFP12, содержащего GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA с сигнальной последовательностью липопротеина Nm, или построение его же с точкой начала репликации от E. coli

[269] Характеристика мутанта штамма H44/76 Nm, содержащего 3 хромосомные копии, кодирующие GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA, и многокопийную плазмиду, кодирующую GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA, каждая с сигнальной последовательностью липопротеина Nm.

[270] ПЦР

[271] ПЦР-праймеры были разработаны для амплификации вышележащих и нижележащих конструкций, вставленных в штамм H44/76 Neisseria meningitidis, несущих фланкирующую область для генов fhbr, siaD-galE или lpxL1, ген GNA1220, MetQ или MetQSM и кассету устойчивости к антибиотикам. ПЦР проводили на термоинактивированных клетках. В качестве отрицательного контроля использовали

термоинактивированные клетки H44/76 дикого типа.

[272] Проточная цитометрия

[273] Связывание очищенных моноклональных и поликлональных антител к GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA с поверхностью живых бактерий *N. meningitidis* или *N. gonorrhoeae* измеряли способом проточной цитометрии, как описано ранее (Giuntini et al., Clin Vaccine Immunol 23:698-706, 2016). В качестве тестового штамма использовали H44/76, сконструированный для экспрессии целевых антигенов. Вкратце: бактерии выращивали в среде Франца+лактат или в среде с определенным химическим составом (CDM) (Müller et al 2015, Infect Immun 83:1257-1264), содержащей 20 mM вместо 4 mM лактата, до плотности $OD_{620 \text{ нм}}$, составляющей 0,6-0,7. Для измерения связывания антител к MetQ или к NHBA фиксированную концентрацию антител к MetQ или к NHBA или, в качестве отрицательного контроля, 10 мкг/мл нерелевантного антитела инкубировали с 10^7 бактерий/мл. Связанное антитело выявляли с применением конъюгированного с AlexaFluor 488 вторичного антитела козы к IgG мыши или кролика (Jackson Immuno Research Laboratories) (фиг. 1). На фиг. 1 изображено усиленное связывание по результатам проточной цитометрии поликлональных антител к MetQ с пассированным в лаборатории штаммом H44/76 без PorA, в котором локусы *siaD-galE*, *lpxL1* и *fhbp* были разрушены с помощью копий генов, кодирующих MetQ и MetQSM соответственно, и дополнительно несущих многокопийную плазмиду (карты иллюстративных плазмид, изображенные на фиг. 2-4) с каждым соответствующим геном. Также на фиг. 1 показано усиленное связывание поликлональных антител к NHBA с тем же родительским штаммом, в котором локусы *siaD-galE*, *lpxL1* и *fhbp* были разрушены, но рекомбинантный ген NHBA представлен только многокопийной плазмидой rFP12-NHBA, в сравнении с экспрессией менингококкового NHBA дикого типа, природно экспрессируемого данным штаммом.

[274] Получение и изучение характеристик вакцины на основе NOMV, содержащей GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA

[275] Получение NOMV

[276] Везикулы внешней мембраны (OMV) получают из культивируемого штамма *Neisseria meningitidis* spp., генетически модифицированного так, чтобы он экспрессировал полноразмерные белки GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA и их производные. OMV можно получить из культуры *Neisseria meningitidis*, выращенной в бульонной культуре или в культуре на твердой среде, предпочтительно путем отделения бактериальных клеток от культуральной среды (например, путем фильтрации или низкоскоростного центрифугирования, при котором осаждаются клетки, или т. п.), лизиса клеток (например, путем добавления детергента, осмотического шока, обработки ультразвуком, кавитации, гомогенизации или т. п.) и отделения фракции внешней мембраны от цитоплазматических молекул (например, путем фильтрации, или путем дифференцированного осаждения или агрегации внешних мембран и/или везикул внешней мембраны, или способами аффинного разделения с применением лигандов, которые специфически распознают молекулы

внешней мембраны, или путем высокоскоростного центрифугирования, при котором осаждаются внешние мембраны и/или везикулы внешних мембран, или т. п.); фракции внешних мембран можно использовать для получения OMV.

[277] OMV получали из *Neisseria meningitidis*, выращенных в среде Франца+лактат или в среде с определенным химическим составом (CDM) (Müller et al 2015, *Infect Immun* 83:1257-1264), содержащей 20 мМ вместо 4 мМ лактата, инокулированной бактериями до плотности $OD_{620 \text{ нм}}$, составляющей 0,15-0,2, из ночных колоний бактерий на чашках с агаровой средой TSB (триптическим соевым бульоном, неживотного происхождения). Культуру инкубировали при температуре 37°C в среде в атмосфере 5% CO₂ и объем среды последовательно увеличивали, начиная с индивидуальных колоний, инокулированных в 24 мл среды с плотностью $OD_{620 \text{ нм}} \approx 0,15$, до 1 л путем переноса культуры в следующий больший объем при достижении $OD_{620 \text{ нм}}$ значения, составляющего 0,6-0,7 (т. е. от 24 мл до 90 мл до 300 мл до 1 л). По достижении конечного объема культуру оставляли расти на дополнительные 15 часов во встряхиваемой колбе с вентилируемой камерой. Затем бактерии центрифугировали (10000 x g, 20 минут), надосадочную жидкость фильтровали через стекловолоконный фильтр для удаления дебриса, затем подвергали стерилизующей фильтрации (фильтр с размером пор 0,22 мкм) и концентрировали ультрафильтрацией (фильтр отсечения 100 тыс. или 30 тыс., Amicon) и добавляли бензоназу (1000 ед./л). Обработку бензоназой продолжали в течение по меньшей мере 1 ч при температуре окружающей среды. Концентрированный фильтрат центрифугировали (202601 x g, 1,5 ч, 4°C) для сбора NOMV. NOMV суспендировали в 10 мМ Tris•HCl, pH 7,4, 3% (вес/объем) сахарозы, еще раз центрифугировали так, как описано для предыдущей стадии, и, наконец, суспендировали в растворе Tris/сахароза до концентрации 1-3 мг/мл белка, что определяли с помощью анализа DC Protein Assay (Bio-Rad). Препарат NOMV хранили замороженным при температуре -70°C до последующего применения.

[278] ИФА-анализ

[279] Для определения экспрессии MetQ или MetQSM в вакцине на основе NOMV (белка, обозначенного NOMV) в 96-луночные планшеты (Nunc) в течение ночи при температуре 4°C наносили покрытие определенного титра очищенного NOMV-MetQ или NOMV-MetQSM. Планшеты блокировали посредством 1% BSA+0,05% Tween 20 в PBS. Поликлональные антитела к MetQ в фиксированной концентрации (1 мкг/мл) разводили в PBS+0,1% Tween 20 и вносили в планшеты на 2 часа. Планшеты красили конъюгированными с щелочной фосфатазой антителами козы к IgG мыши (Jackson Immuno Research Laboratories) (1:2000) или антителами козы к IgG кролика (Jackson Immuno Research Laboratories) (1:2000) в течение 1 часа и проявляли с применением п-нитрофенилфосфата (Thermo Fisher Scientific). Результаты для MetQ и MetQSM изображены на фиг. 5.

Пример 2. Иммунизация

[280] Препарат или рекомбинантный белок NOMV-GNA1220, NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM или NOMV-NHBA разводили в 10 мМ Tris•HCl, pH 7,4, 3% (вес/объем)

сахарозы и адсорбировали с равным объемом гидроксида алюминия в качестве адъюванта (2% ALHYDROGEL, Invivogen). Вакцины получали накануне вечером перед иммунизацией и инкубировали в течение ночи при 4°C. Группы из 4-6-недельных самок мышей CD1 (Charles River Breeding Laboratories) (N=10 на группу) иммунизировали внутрибрюшинно (IP). Каждая мышь получала дозу, содержащую 10-2,5 мкг общего белка NOMV или 10 мкг рекомбинантного GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA, предварительно смешанного с 600 мкг адъюванта. Всего производили три инъекции, каждую с интервалом в 3 недели. Через две недели после введения третьей дозы у мышей брали кровь посредством сердечной пункции и умерщвляли. Отделяли сыворотку крови и хранили замороженной при температуре -80°C.

Пример 3. Интраназальная иммунизация посредством NOMV-GNA1220 или NOMV-MetQ

[281] Для определения того, может ли интраназальная вакцинация давать защитный ответ с образованием антител с участием слизистых оболочек, мышей CD1 будут интраназально вакцинировать посредством 50 мкг вакцины на основе NOMV-GNA1220, NOMV-MetQ или NOMV-MetQSM. Под анестезией изофлураном мышам будут ингаляционным способом вносить по 10 мкл вакцинного препарата в каждую ноздрю. Мышей будут иммунизировать 2-3 раза с интервалом 3-4 недели. Также с 1-2 интраназальными введениями будут сочетать одну внутрибрюшинную инъекцию 5 мкг вакцины.

Пример 4. Изучение характеристик ответов с образованием антител в отношении содержащей белок вакцины на основе NOMV у мышей CD1

[282] Для изучения активности связывания поликлональных антител, вырабатываемых у мышей, иммунизированных вакциной на основе рекомбинантного MetQ (rMetQ), NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM, в 96-луночные планшеты (Nunc) наносили покрытие 2 мкг/мл белка rMetQ в течение ночи при температуре 4°C. Планшеты блокировали посредством 1% BSA+0,05% Tween 20 в PBS. Сыворотку крови от иммунизированных мышей разводили в PBS+0,1% Tween 20 и вносили в планшеты на 2 часа. Планшеты красили конъюгированными с щелочной фосфатазой вторичным антителом козы к IgG мыши (Jackson Immuno Research Laboratories) (1:3000) в течение 1 часа и проявляли с применением п-нитрофенилфосфата (Thermo Fisher Scientific). Поглощение при OD 405 нм измеряли на прецизионном планшет-ридере Emax (Molecular Devices).

[283] На фиг. 6 продемонстрировано, что титры IgG были схожими у мышей, иммунизированных посредством 2,5-10 мкг вакцин на основе NOMV, за исключением мышей, получавших дозы по 10 мкг NOMV-MetQ, где средний титр был значимо ниже по сравнению со всеми остальными группами. Средний титр IgG у мышей, иммунизированных посредством rMetQ, был значимо выше ($p < 0,01$), чем у всех остальных групп.

[284] Для сравнения связывания поликлональных антител от мышей,

иммунизированных посредством rMetQ, rNHBA, NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM, NOMV-GNA1220 и NOMV-NHBA, с живыми бактериями применяли проточную цитометрию. Анализ связывания с гонококковыми штаммами FA1090 и MS11 и менингококковым штаммом MD1224 серогруппы В проводили так, как описано выше. На фиг. 7 показано, что все вакцины индуцировали выработку антител, которые связываются с обоими протестированными гонококковыми штаммами. На фиг. 10 показано, что только антитела, продуцируемые при иммунизации посредством NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM и NOMV-GNA1220, связываются со штаммом Nm MD1224 при разведении антисыворотки 1:200.

[285] Сывороточная бактерицидная активность (SBA) поликлональных антител от мышей, иммунизированных посредством rMetQ, rNHBA, NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM, NOMV-GNA1220 и NOMV-NHBA, против штаммов FA1090 и MS11 Ng. Бактерии выращивали в течение ночи на шоколадном агаре с добавлением IsoVitaleX™ (Fischer Scientific) или эквивалентном слое питательной среды при 37°C с 5% CO₂ и пассировали на следующий день на предварительно нагретый шоколадный агар IsoVitaleX™ или эквивалентный слой питательной среды. Слой питательной среды инкубировали в течение 5 часов при 37°C с 5% CO₂. Бактерии суспендировали в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), содержащем 0,15 мМ CaCl₂ и 1 мМ MgCl₂ (HBSS++) с 0,1% BSA, до OD_{620 нм}, составляющей 0,6. Окончательное разведение 1:12500 в HBSS++ с 0,1% BSA (с получением ~5×10⁴ КОЕ/мл) осуществляли на бактерицидном 96-луночном планшете. Сыворотку крови от иммунизированных мышей обедняли в отношении IgM перед анализом с применением антитела козы к IgM мыши (специфического к μ-цепи)-агарозе (Millipore) и серийно разводили в HBSS++. Двадцать процентов (объем/объем) сыворотки крови человека, обедненной в отношении IgG и IgM, применяли в качестве источника комплемента и вносили в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшет инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C с 5% CO₂ и высевали серийные разведения для определения количеств колониеобразующих единиц (КОЕ). Хотя иммунизация рекомбинантными белками давала равные или более высокие титры антител со схожим связыванием с обоими гонококковыми штаммами, NOMV-MetQ и NOMV-NHBA характеризовались большей SBA-активностью в отношении гонококковых штаммов FA1090 и MS11, чем антитела, выработка которых была индуцирована соответствующими рекомбинантными белками, как изображено на фиг. 8.

[286] Влияние поликлональных антител от мышей, иммунизированных посредством rMetQ, rNHBA, NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM, NOMV-GNA1220 и NOMV-NHBA, на колонизацию тестировали посредством гонококковых штаммов FA1090 и MS11. Клетки ME180 (ATCC HTB33), представляющие собой линию эпителиально-подобных клеток, полученную из карциномы шейки матки человека, поддерживали в среде МакКоя 5А, дополненной 10% (объем/объем) фетальной телячьей сыворотки и смесью пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (1 мг/мл). Для анализа прикрепления клетки высевали в 96-луночные планшеты по 2,5×10⁵ клеток/лунку и инкубировали в 5% CO₂ при температуре 37°C в течение 24 часов. На неконфлюэнтные монослои

(конфлюэнтность на уровне 70-80%) наносили 100 мкл бактерий (10^7 бактерий/мл), инкубировали в течение 1 ч в 5% CO_2 при температуре 37°C и промывали три раза по 5 мин каждый раз в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, pH 7,4). На 15 мин при температуре 37°C вносили акутазу (100 мкл/лунку) и высевали серийные разведения для определения количеств колониеобразующих единиц (КОЕ). Гонококки колонизируют различные биологические ниши, которые создают различные пищевые стрессы для бактерий. Различные условия питания приводят к экспрессии различных белков на поверхности бактерий. Поликлональные антитела тестировали на их влияние в отношении колонизации FA1090 и MS11 в двух различных условиях. Как изображено на фиг. 10, колонизация наиболее сильно ингибировалась антителами к NOMV-GNA1220 и антителами к NOMV-NHBA при выращивании бактерий на слоях среды с шоколадным агаром, в то время как антитела к NOMV-MetQSM и антитела к NOMV-NHBA оказывали наибольшее влияние на бактерии, выращиваемые в жидкой культуре в CDM, содержащей 10% (объем/объем) сыворотки крови человека, обедненной в отношении IgG/IgM.

[287] Сывороточную бактерицидную активность (SBA) поликлональных антител от мышей, иммунизированных 2 дозами по 2,5 мкг, 5 мкг или 10 мкг NOMV-MetQ, NOMV-MetQSM, NOMV-GNA1220, отдельно адьюванта или 10 мкг рекомбинантного MetQ (rMetQ), определяли так, как описано в Beernink et al. J Infect Disease 219:1131, 2019. Как изображено на фиг. 11, мыши с NOMV-MetQ, но особенно с NOMV-MetQSM, были эффективны в опосредовании SBA с человеческим комплементом, что коррелирует с защитой у людей.

[288] В целом, представленные данные свидетельствуют о том, что антитела, продуцируемые при иммунизации консервативными гонококковыми антигенами в менингококковой NOMV, характеризуются большим связыванием с гонококковыми и менингококковыми штаммами, большей SBA и большим ингибированием колонизационной функциональной активности, чем антитела, продуцируемые при иммунизации соответствующими рекомбинантными белками.

Пример 5. Модели перепрограммируемых при определенных условиях культур эпителиальных клеток человека (CRC) для оценки защиты антителами, выработка которых была вызвана вакциной, на ранних стадиях инфекции Nm и Ng

[289] Возможность при перепрограммировании получать первичные культуры эпителиальных клеток человека, обладающие характеристиками тканей, является относительно новой методикой, а также новым является ее применение для оценки влияния антител, выработка которых была вызвана вакциной, на колонизацию, патогенез Nm и защиту как от первого, так и от второго. Особый интерес представляет защита с помощью антител, выработка которых вызывается вакциной, на наиболее ранних стадиях инфекции, поскольку исторически она была менее хорошо изучена, но имеет решающее значение для контроля заболевания в больших популяциях. Иммутизированные линии клеток человека (например, 16HBE14о- и ME180) доступны, но не воспроизводят разнообразие типов клеток и характеристики CRC-клеток. Эксплантаты тканей человека

также важны, но они малодоступны, что затрудняет проведение ряда экспериментов, необходимых для сравнения влияний антител, выработка которых вызвана относительно большим количеством предлагаемых для тестирования вакцин. Была создана модель менингококковой колонизации первичных клеток носового эпителия (pNE), и аналогичные способы будут использованы (Suprynowicz et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109(49):20035-40) для создания модели колонизации Ng первичных клеток шейки матки. Совместно данные модели первичных культур клеток человека обеспечивают важный и инновационный подход для оценки потенциала антител, выработка которых вызвана вакциной, влиять на ход колонизации и инвазии Nm и Ng. Клетки шейки матки человека ME180 были использованы для описываемых в данном документе исследований адгезии, а также будет изучена адгезия к CRC-клеткам.

Пример 6. Модельные мыши, трансгенные (Tg) по CEACAM1/FH человека, для оценки защиты антителами, выработка которых была вызвана вакциной, на ранних стадиях инфекции, вызываемой Nm и Ng

[290] Была получена уникальная трансгенная по генам человека (Tg) модельная мышь с функциональной системой комплемента, экспрессирующая гены человека, облегчающие колонизацию (CEACAM1) и иммунную защиту (FH), которая колонизируется Nm посредством интраназальной инфекции, и у нее быстро развиваются менингитоподобные симптомы с миграцией бактерий из носоглотки в мозговые оболочки, окружающие головной мозг. Кроме того, были внесены технические усовершенствования в Tg модельную мышь, которые сделали возможным различать прикрепившиеся бактерии от неприкрепившихся бактерий, которые были выделены из носоглотки. Tg по CEACAM1/FH человека мыши также могут быть применимы для измерения защиты антителами, выработка которых вызвана вакциной, против колонизации Ng у самок модельных мышей, обработанных эстрадиолом (Jerse et al., Front Microbiol 2011;2:107), поскольку CEACAM1 экспрессируется у данных мышей в клетках столбчатого эпителия, которые выстилают поверхность матки и эндоцервикса, при этом связывание Opa с CEACAM1 усиливает ассоциацию и проникновение Ng в данные ткани (Islam et al., Infect Immun 2018;86(8)). Кроме того, связывание FH человека производными NspA, PorB2 и LOS обеспечивает уклонение от иммунитета и, возможно, дополнительные механизмы адгезии эпителиальных клеток.

Пример 7. Электропорация для увеличения количества ДНК в NOMV

[291] Оценивали электропорацию для увеличения количества плазмиды в NOMV. Для увеличения эффективности электропорации тестировали различные соотношения NOMV:плазмидная ДНК, различные напряжения электропорации и количество импульсов. В результате электропорации содержание dsDNA увеличивалось в NOMV до 5 раз по сравнению с содержанием, которое было в клетках без электропорации.

[292] NOMV и плазмидную ДНК подвергали электропорации в соотношении 2:1 или в соотношении 1:1 в 300 мМ сахарозном буфере. Подробности смотри в представленных ниже таблицах 1 и 2. После электропорации образцы в течение ночи

инкубировали с бензоназой для устранения какой-либо остаточной/внешней ДНК. После обработки бензоназой NOMV лизировали 1% раствором SDS и измеряли содержание dsDNA с применением набора для анализа Qubit™ 1X dsDNA HS.

Таблица 1. Параметры для электропорации

Соотношение 2:1 NOMV:pFP12	dsDNA, нг/мкг NOMV	Кратность увеличения
Без электропорации	0,94	
800 В, 2X импульс	1,9	2
900 В, 2X импульс	2,9	3
1000 В, 2X импульс	3,12	3,3

Таблица 2. Параметры для электропорации 900 В, 2X импульс

2X импульс	dsDNA, нг/мкг NOMV	Кратность увеличения
Без электропорации	0,76	
Соотношение 2:1 NOMV:0FP12	2,28	3
Соотношение 1:1 NOMV:pFP12	3,8	5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая вакцинная композиция, содержащая множество бактериальных нативных везикул внешней мембраны (NOMV), содержащих по меньшей мере один рекомбинантный белок, полученный от *Neisseria gonorrhoeae*, где гонококковый рекомбинантный белок представляет собой липопроtein или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопроtein.

2. Фармацевтическая вакцинная композиция по п. 1, где гонококковый рекомбинантный белок модифицирован путем удаления частей белка, которые не экспонированы на поверхности, и добавления сигнальной последовательности липопроteина к оставшейся С-концевой части, где гонококковый рекомбинантный белок экспонирован на поверхности бактерий, а NOMV продуцируются бактериями в форме липопроteина.

3. Фармацевтическая вакцинная композиция по п. 1 или п. 2, где по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA или их производные или фрагменты или их комбинации.

4. Фармацевтическая вакцинная композиция по п. 1, где NOMV получены от *Neisseria meningitidis*.

5. Фармацевтическая вакцинная композиция по п. 4, где менингококковый штамм представляет собой H44/76.

6. Штамм *Neisseria meningitidis*, содержащий по меньшей мере один ген, кодирующий по меньшей мере один рекомбинантный белок, полученный от *Neisseria gonorrhoeae*, где по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой липопроtein или модифицирован так, чтобы он представлял собой липопроtein.

7. Менингококковый штамм по п. 6, где по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок представляет собой GNA1220, MetQ, MetQSM или NHBA или их производные или фрагменты или их комбинации.

8. Менингококковый штамм по п. 7, где по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок экспрессируется с трансгена в плазмиде.

9. Менингококковый штамм по п. 7, где по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок экспрессируется с трансгена, вставленного в бактериальный геном.

10. Менингококковый штамм по любому из пп. 6-9, где менингококковый штамм представляет собой H44/76.

11. Менингококковый штамм по п. 10, где менингококковый штамм H44/76 не экспрессирует порин PorA.

12. Менингококковый штамм по любому из пп. 6-11, где экспрессия трансгена, кодирующего по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, находится под управлением последовательности сильного промотора, которая обеспечивает высокие скорости транскрипции гена в *Neisseria meningitidis*.

13. Менингококковый штамм по п. 12, где сильный промотор предусматривает промотор *PogA* или его производное.

14. Менингококковый штамм по п. 13, где промотор содержит последовательность, изложенную на фиг. 2-4.

15. Менингококковый штамм по пп. 6-14, где трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *lpxL1* бактериального генома, где вставка нарушает экспрессию гена ацилтрансферазы, и где нарушение заставляет бактерии продуцировать липоолигосахарид, который является пентаацилированным, а не гексаацилированным.

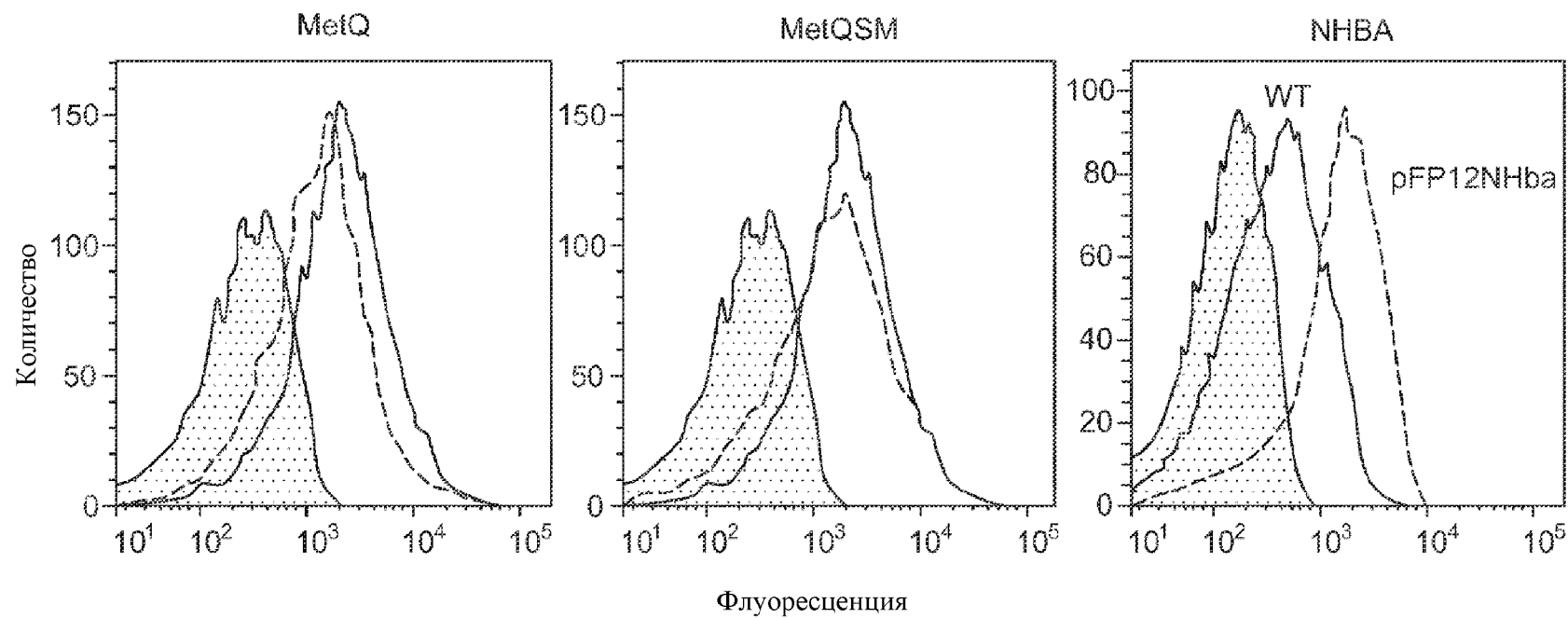
16. Менингококковый штамм по любому из пп. 6-14, где трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *siaD-galE* бактериального генома, и где вставка нарушает экспрессию оболочечного полисахарида и сialiрование липоолигосахаридных антигенов хозяина.

17. Менингококковый штамм по любому из пп. 6-14, где трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *siaA*.

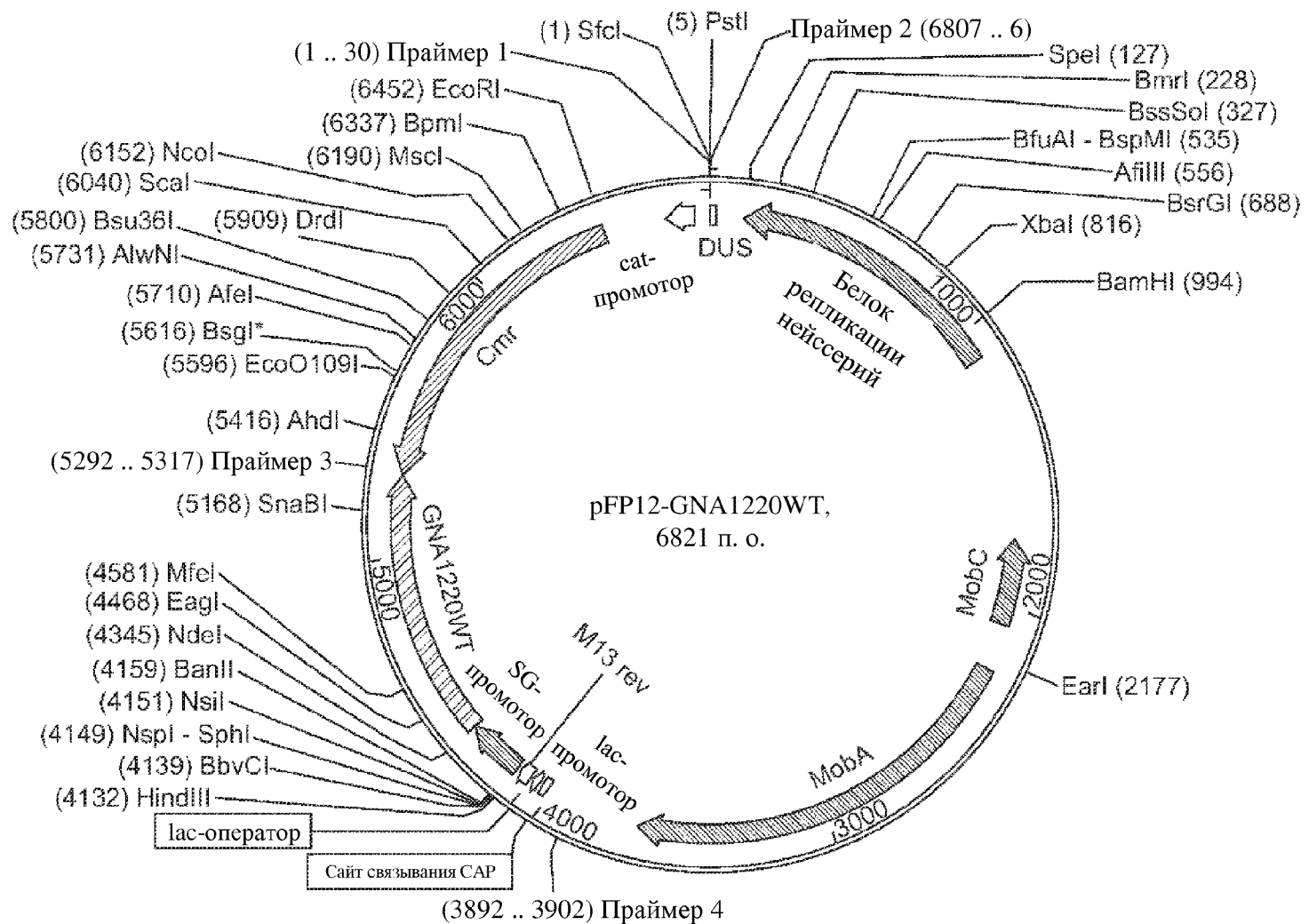
18. Менингококковый штамм по любому из пп. 6-17, где трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *fhbp* (белка, связывающего фактор H).

19. Менингококковый штамм по любому из пп. 6-17, где трансген, кодирующий по меньшей мере один гонококковый рекомбинантный белок, вставлен в локус *pogA*.

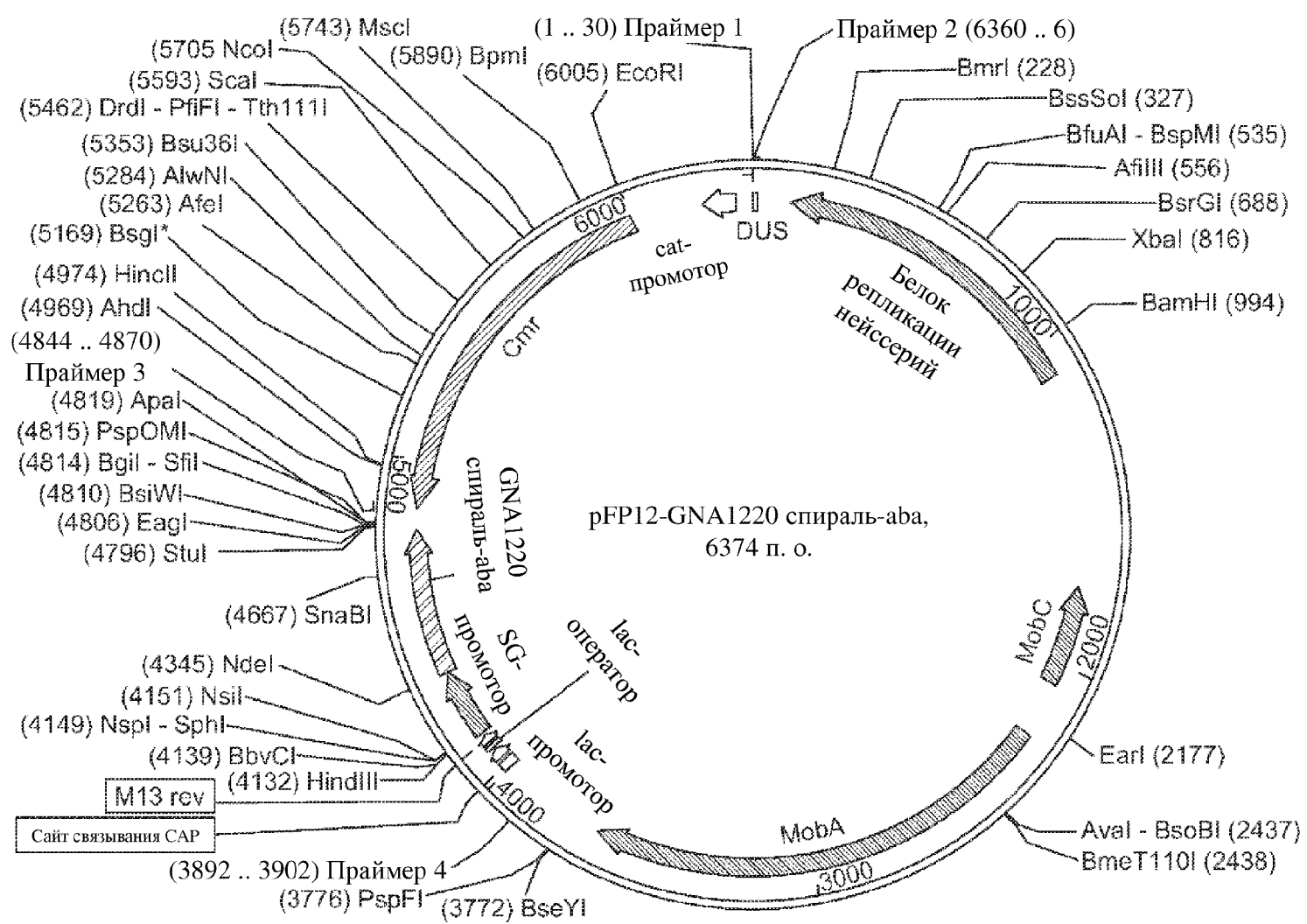
По доверенности



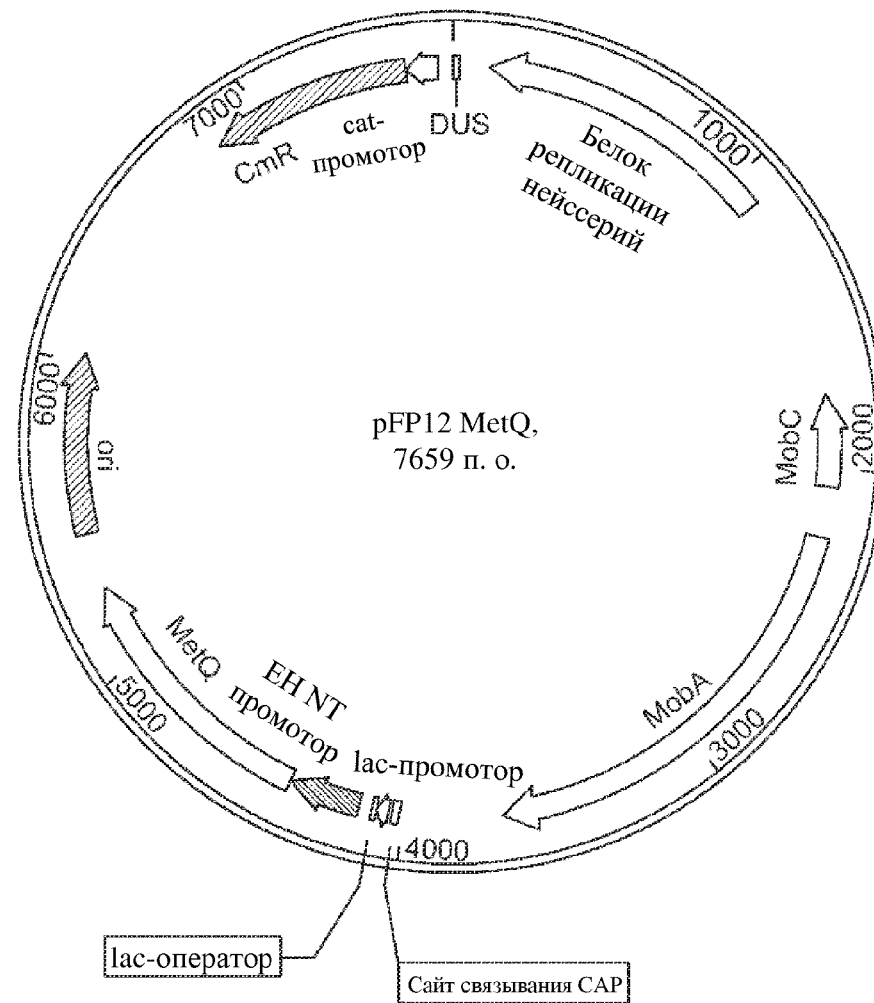
ФИГ. 1



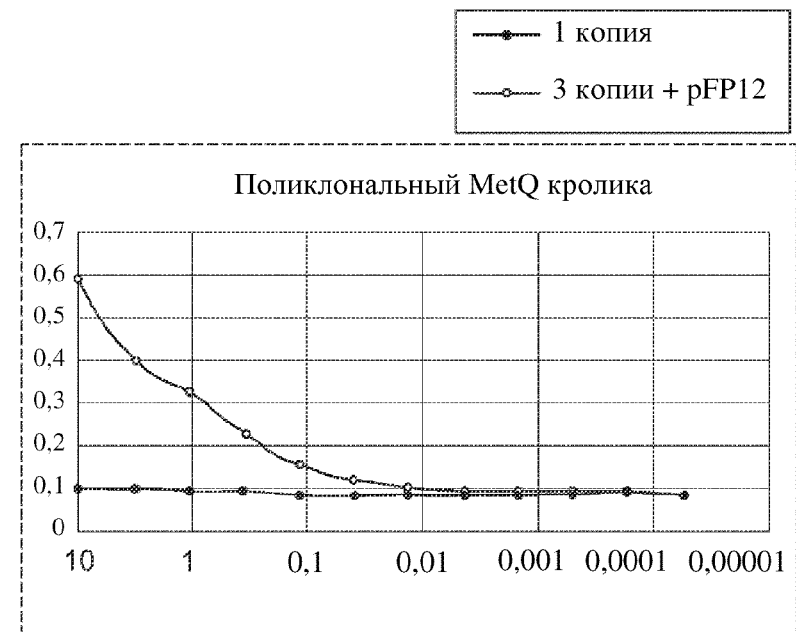
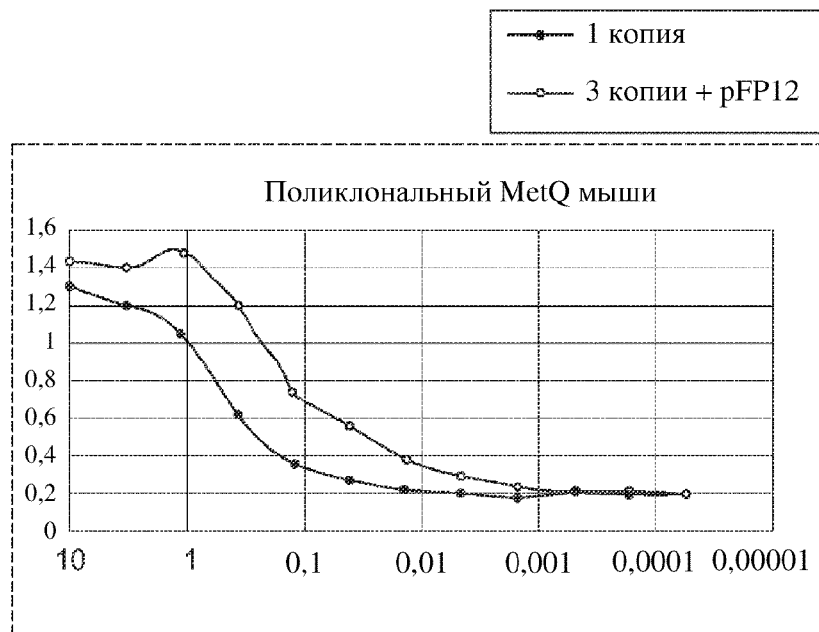
ФИГ. 2



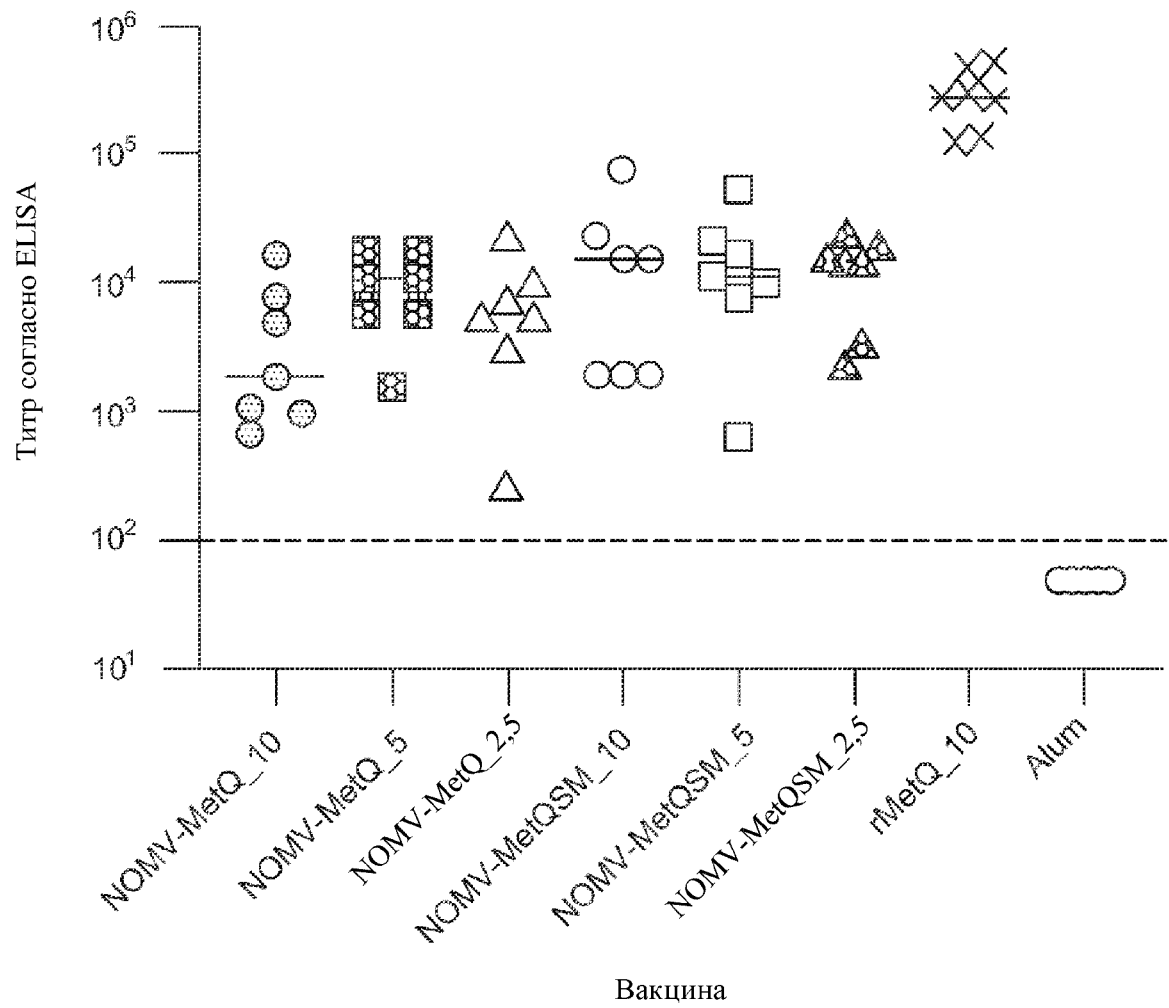
ФИГ. 3



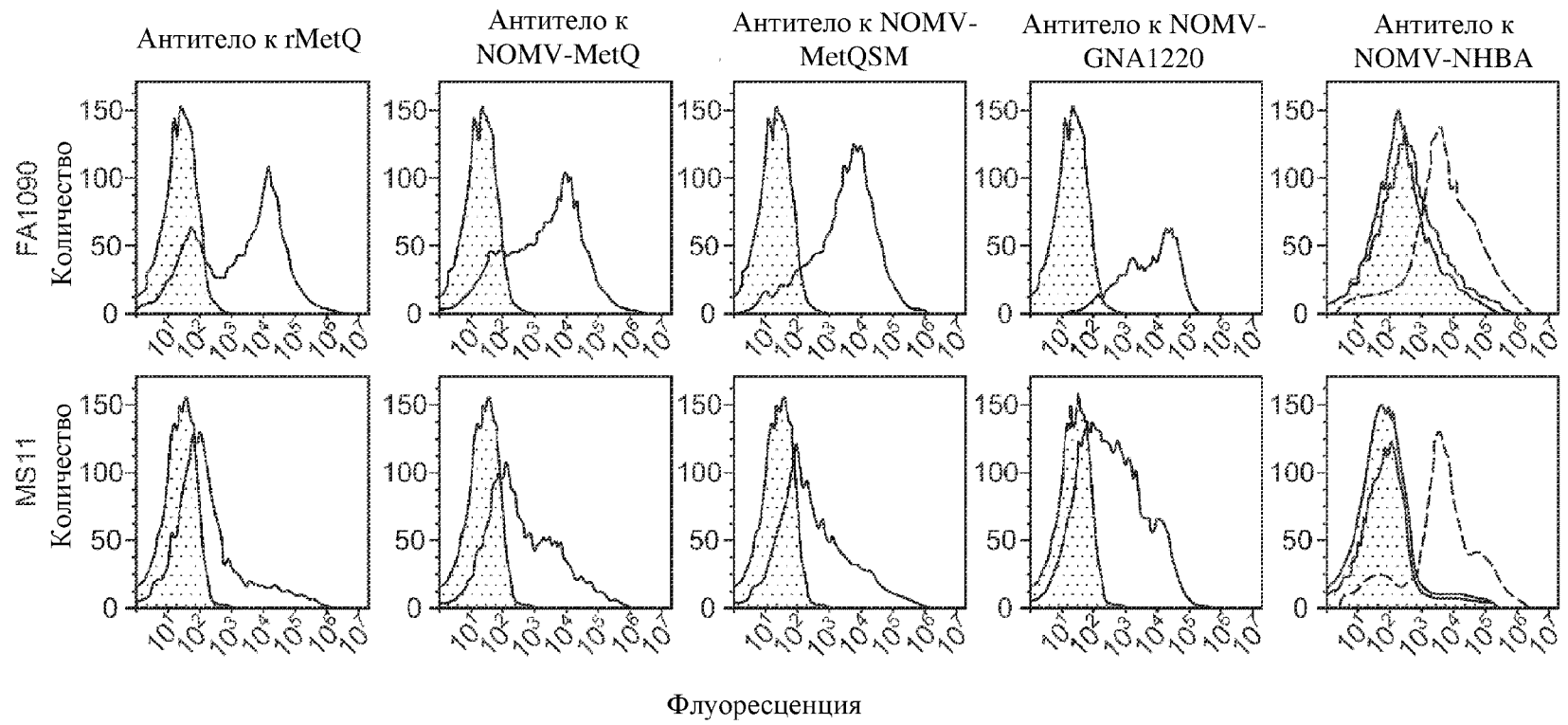
ФИГ. 4



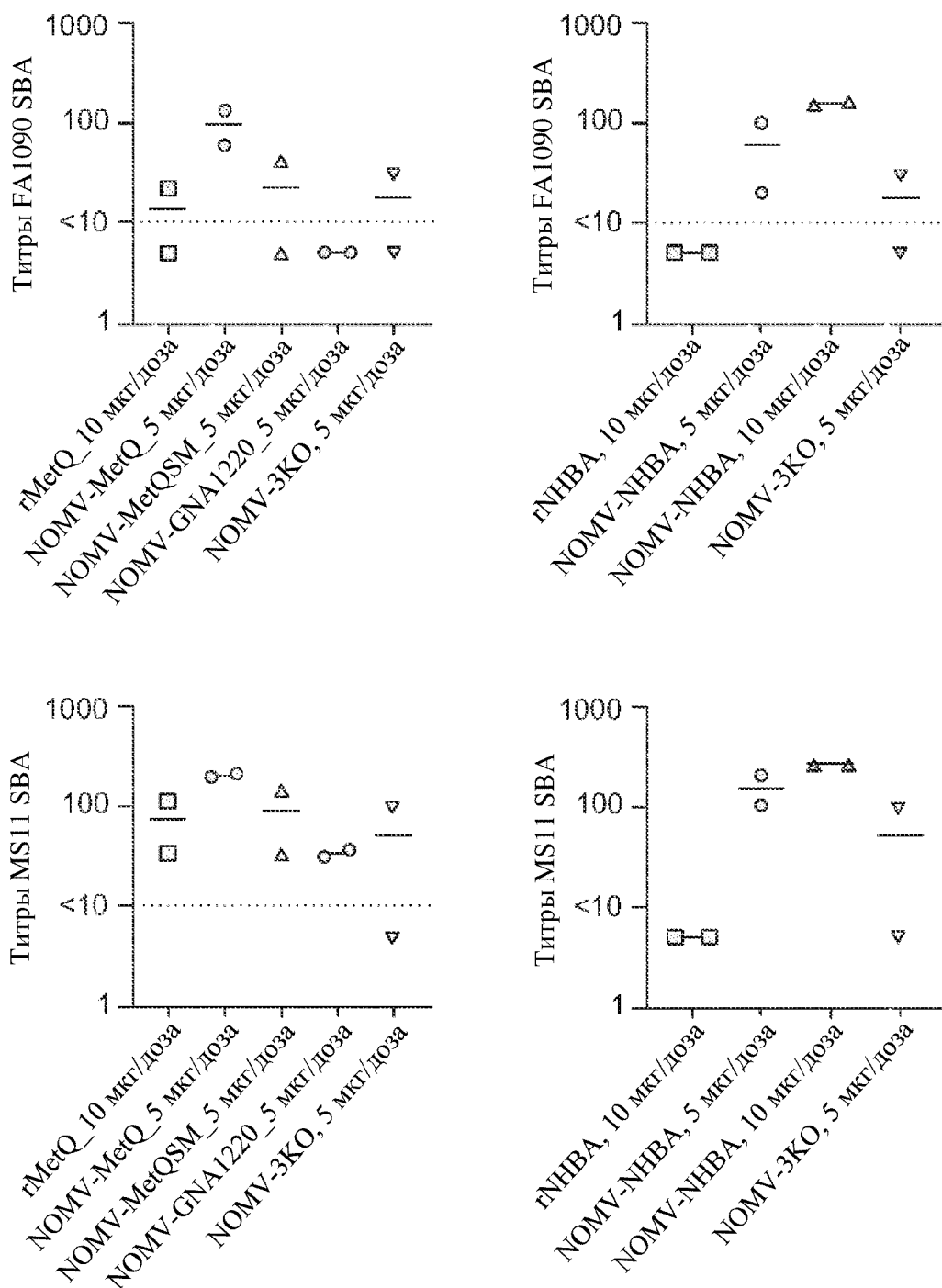
ФИГ. 5



ФИГ. 6

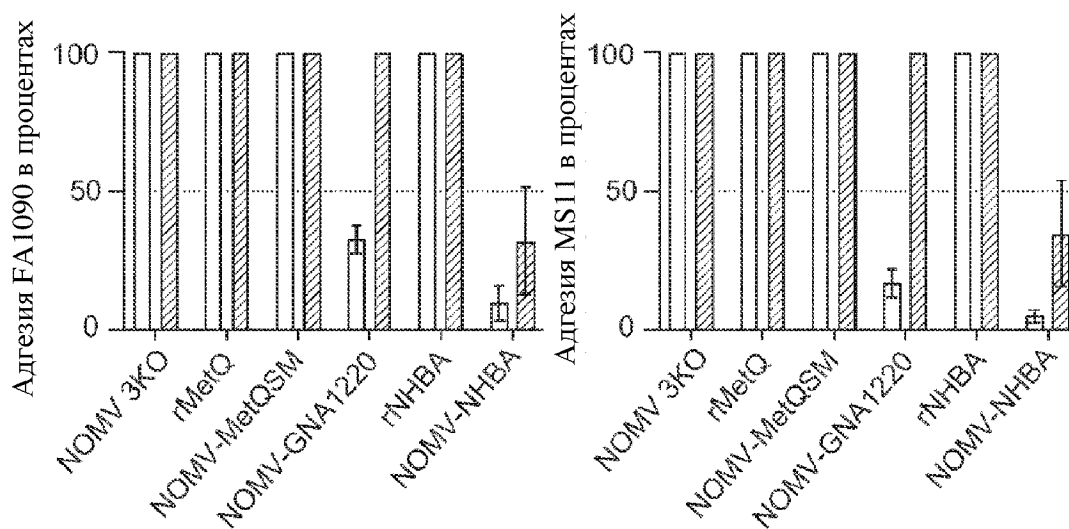


ФИГ. 7

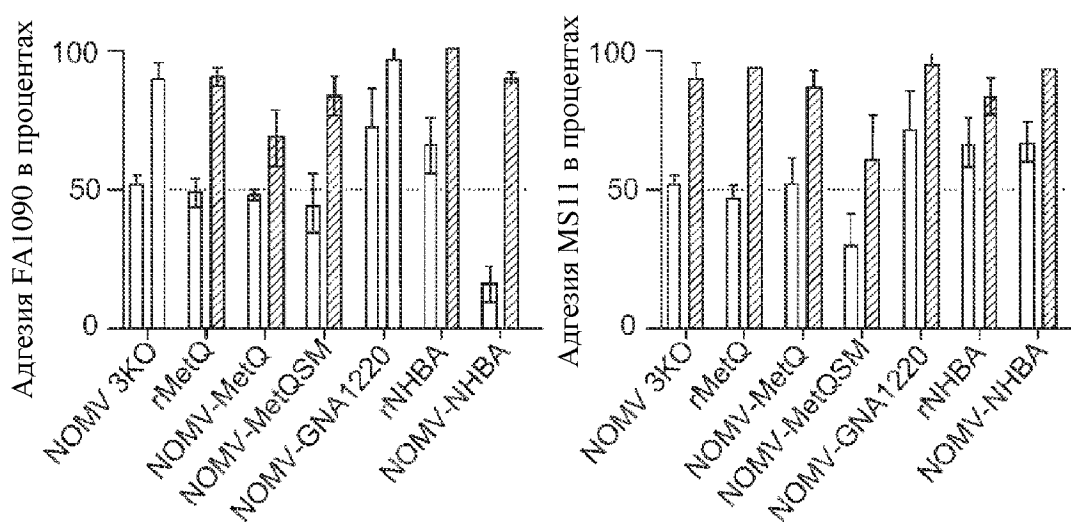


ФИГ. 8

Бактерии, выращенные на слоях среды с шоколадным агаром

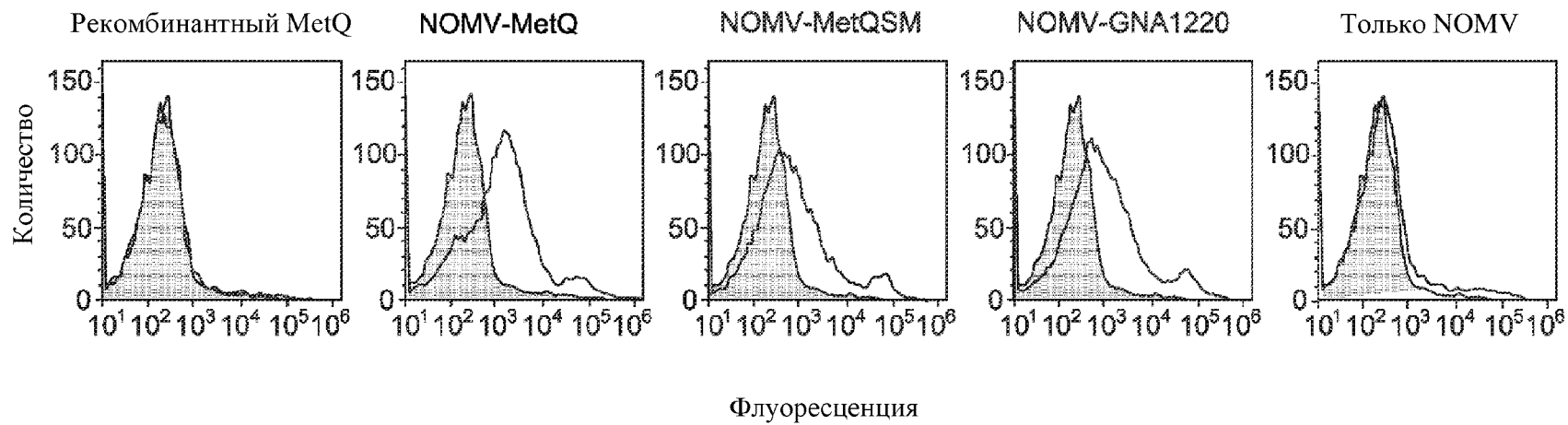


Бактерии, выращенные на CDM+10% жидкой среды, представляющей собой сыворотку крови человека, обедненную в отношении IgG/IgM

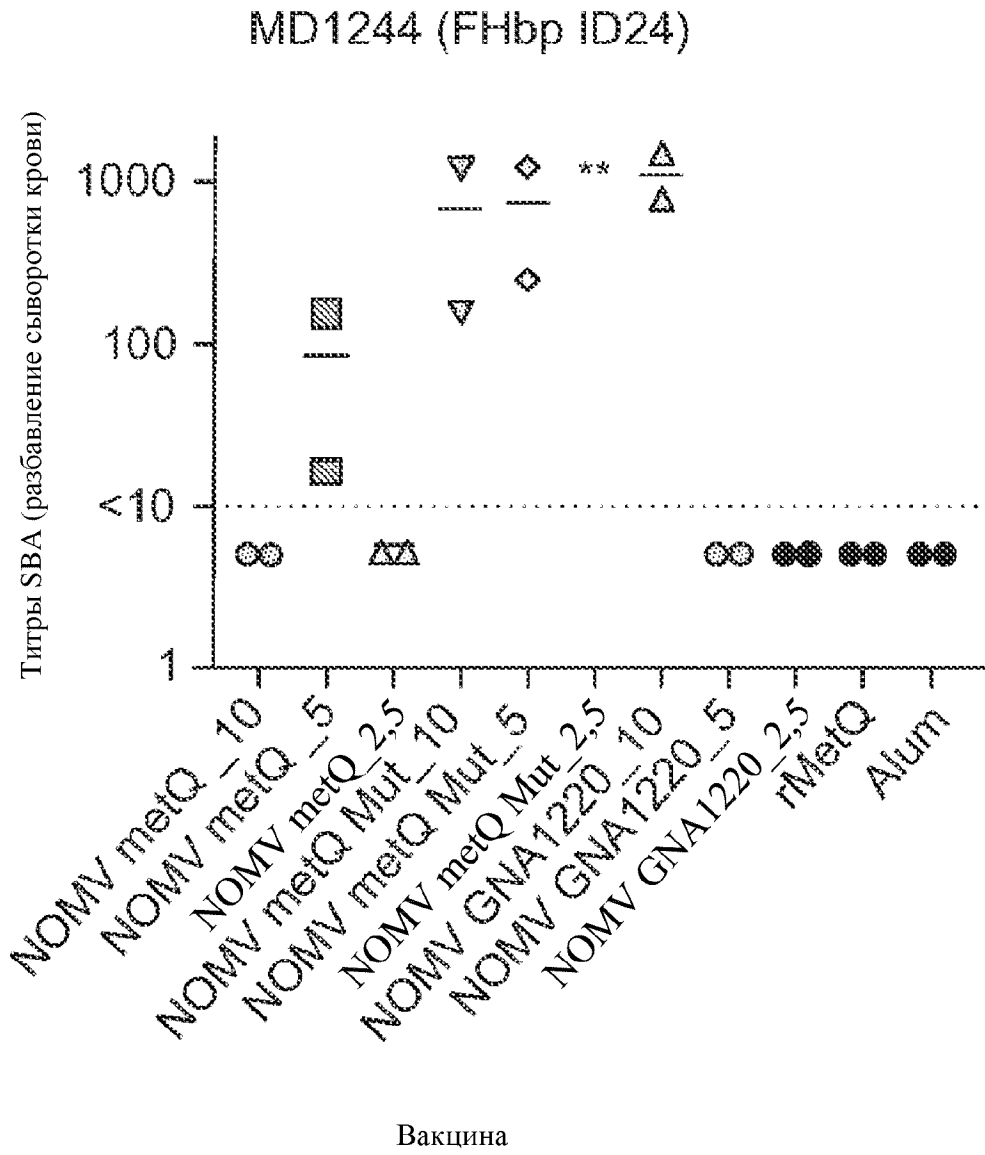


ФИГ. 9

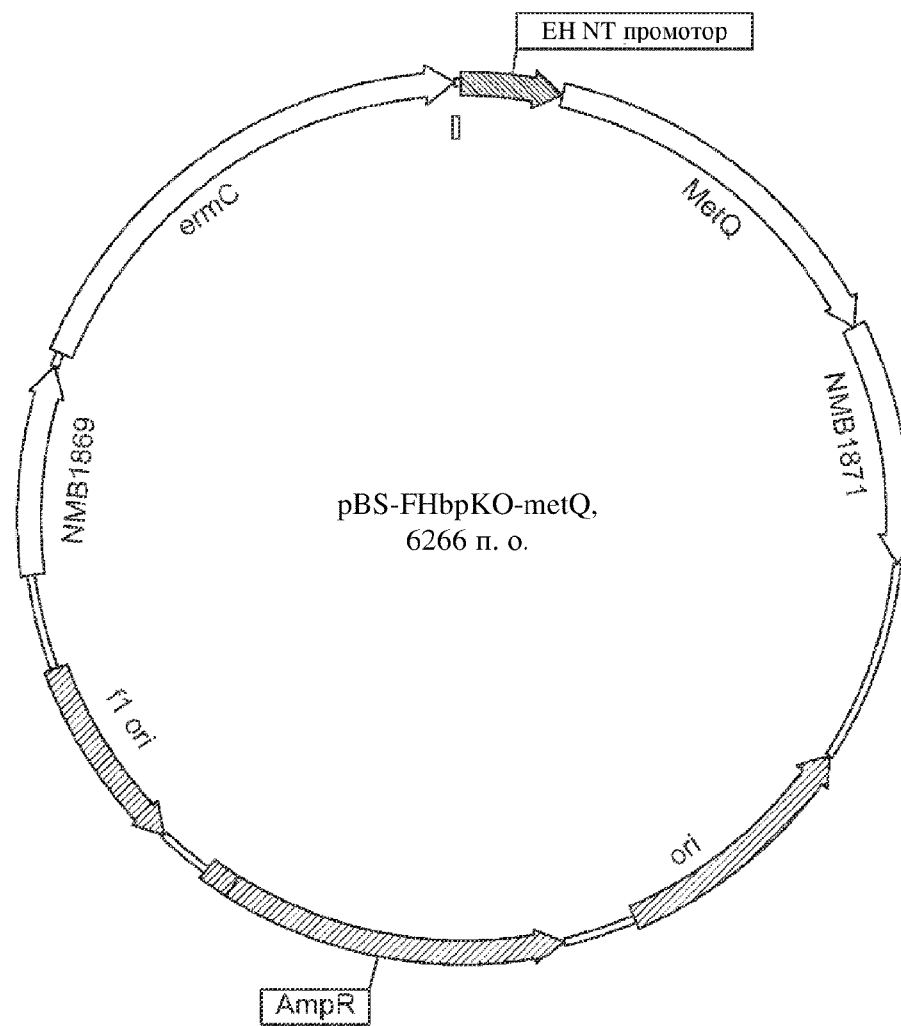
Антисыворотка (разбавление 1:200)



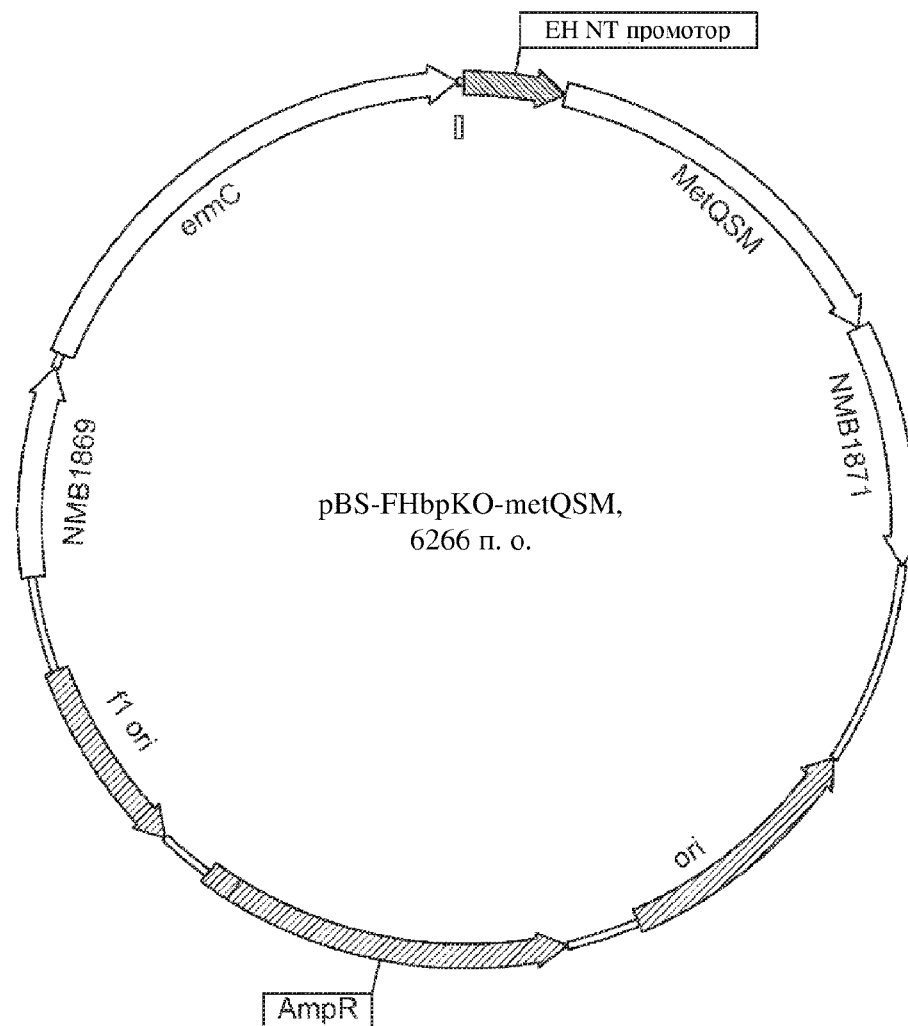
ФИГ. 10



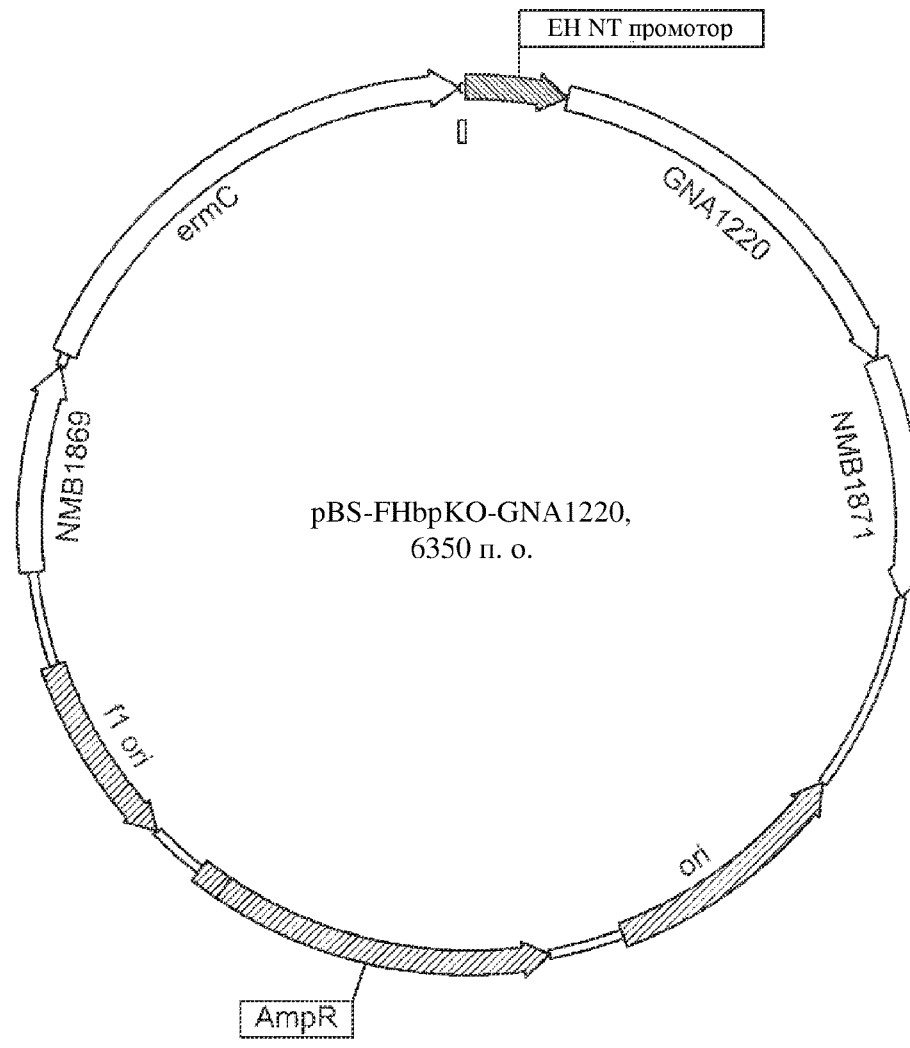
ФИГ. 11



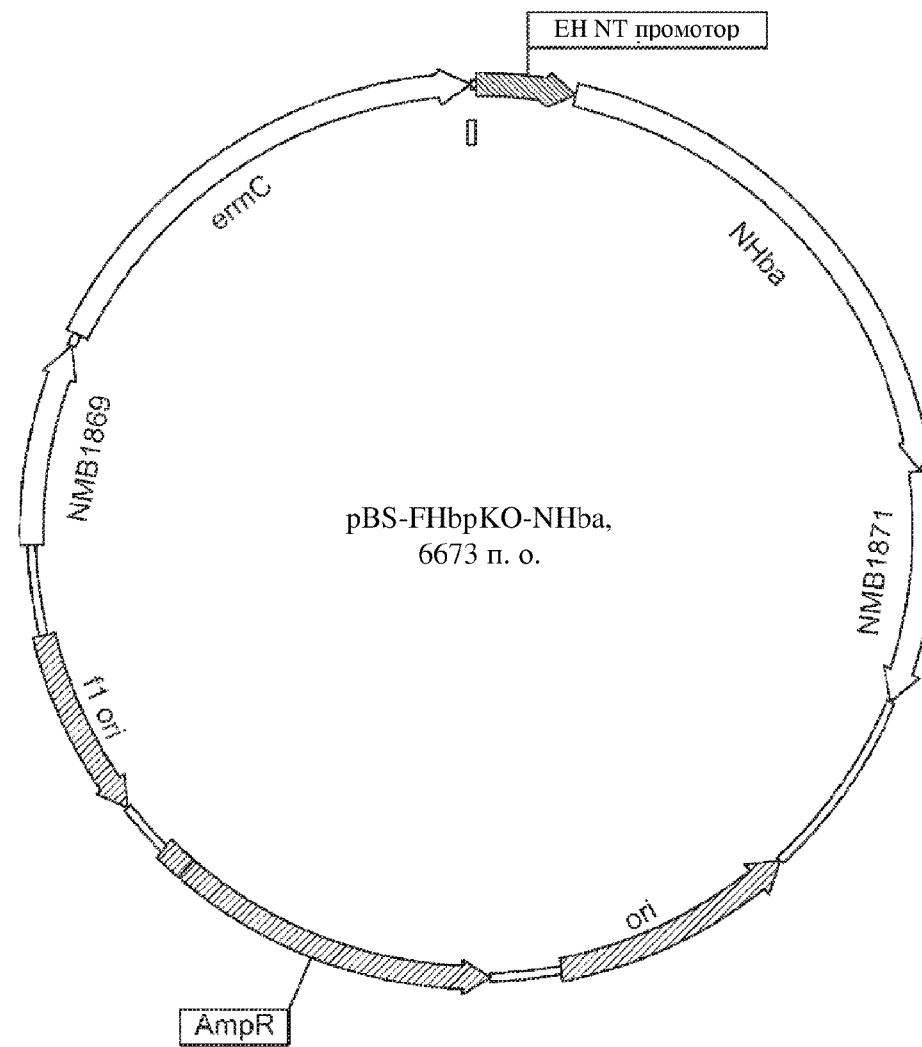
ФИГ. 12



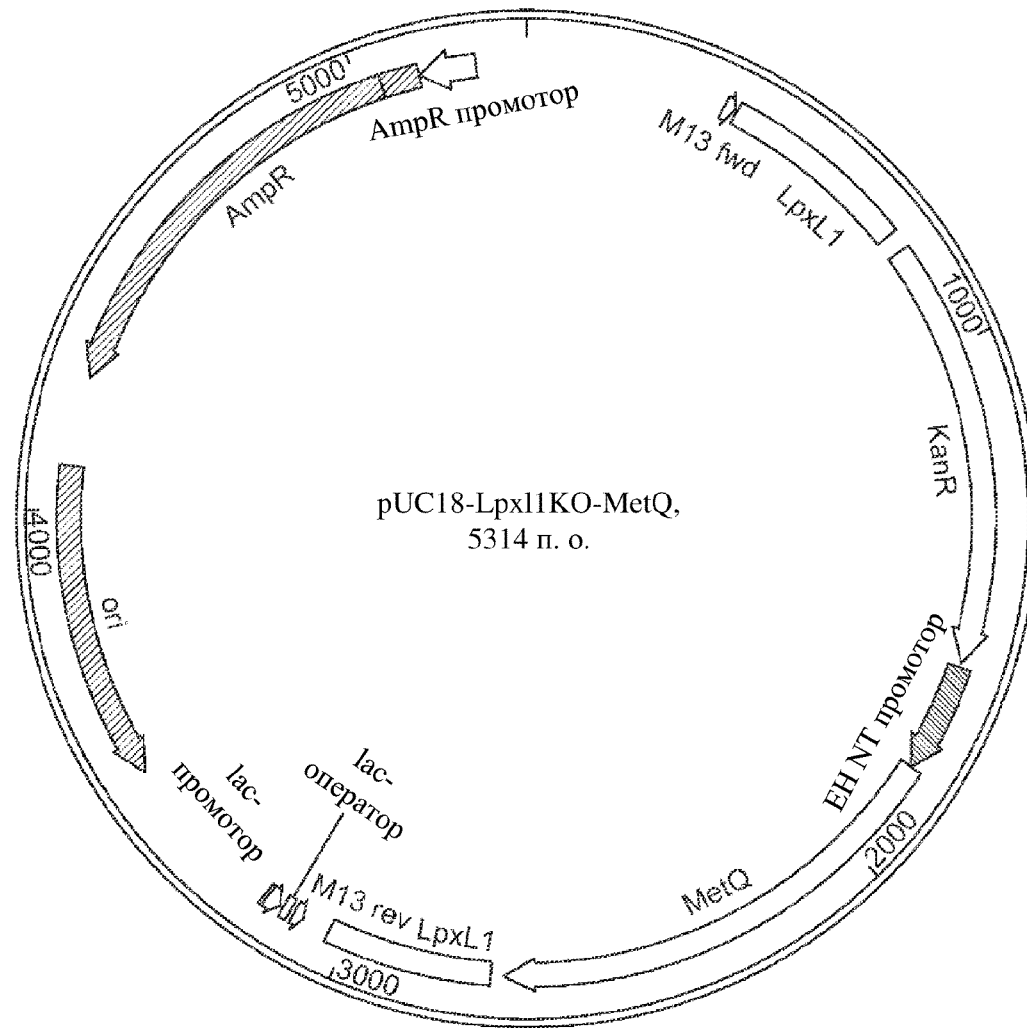
ФИГ. 13



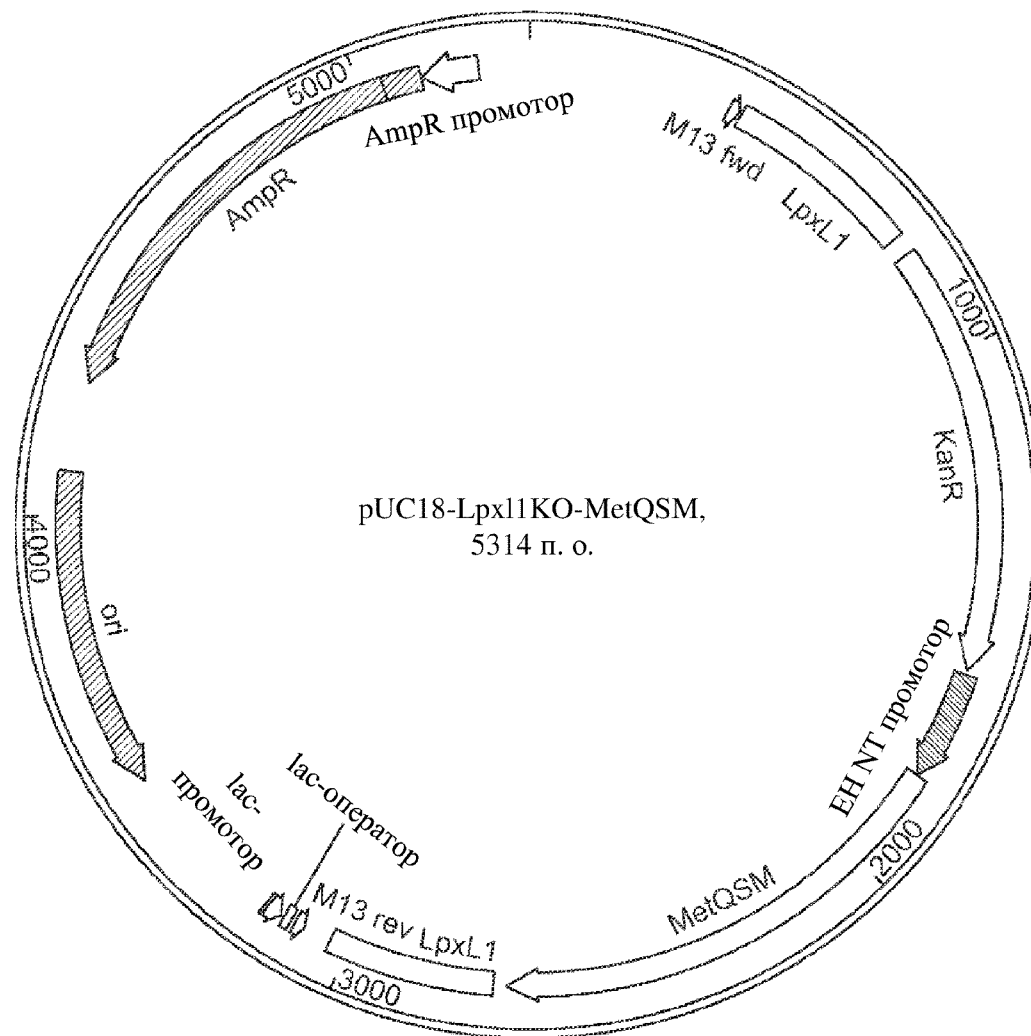
ФИГ. 14



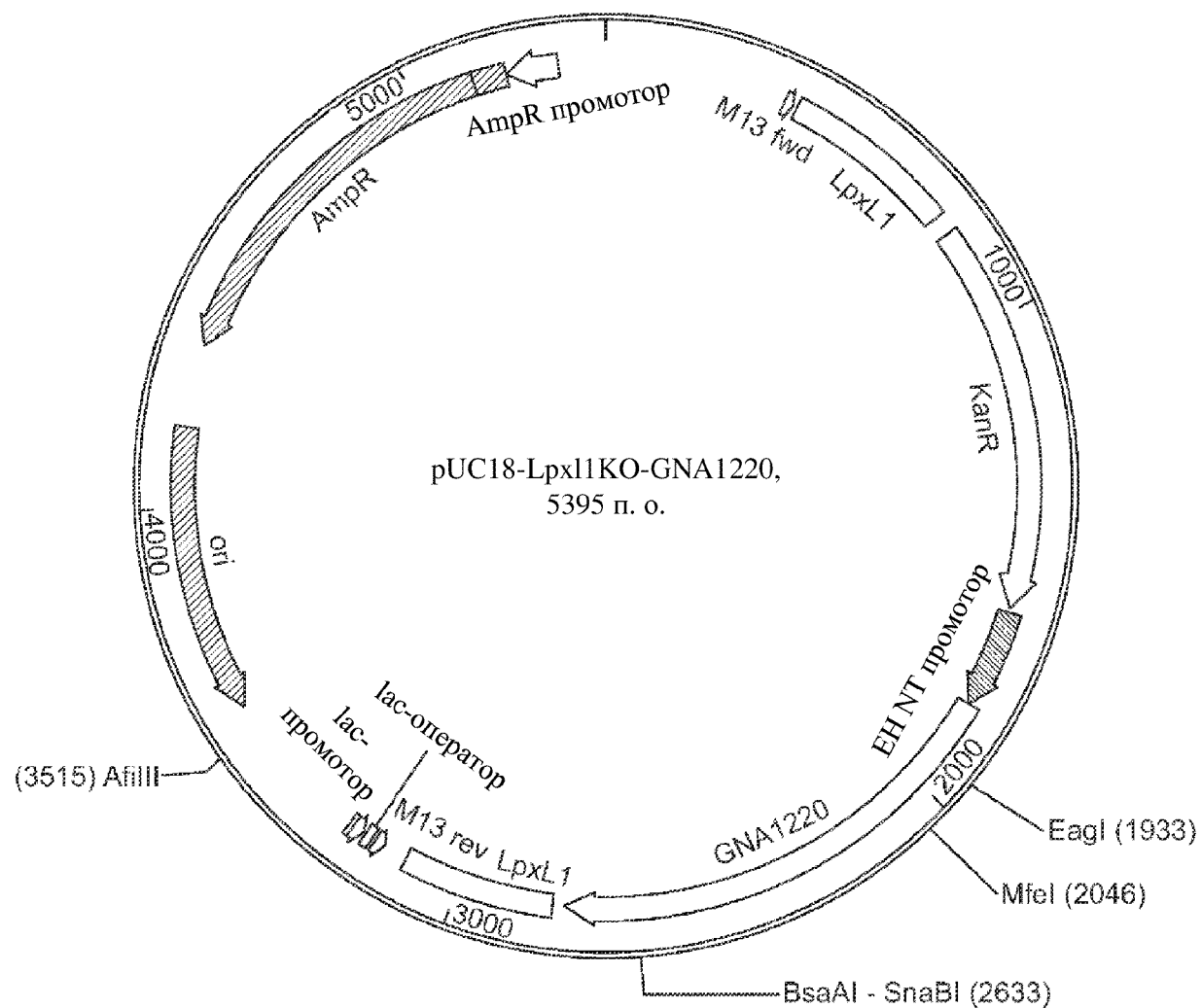
ФИГ. 15



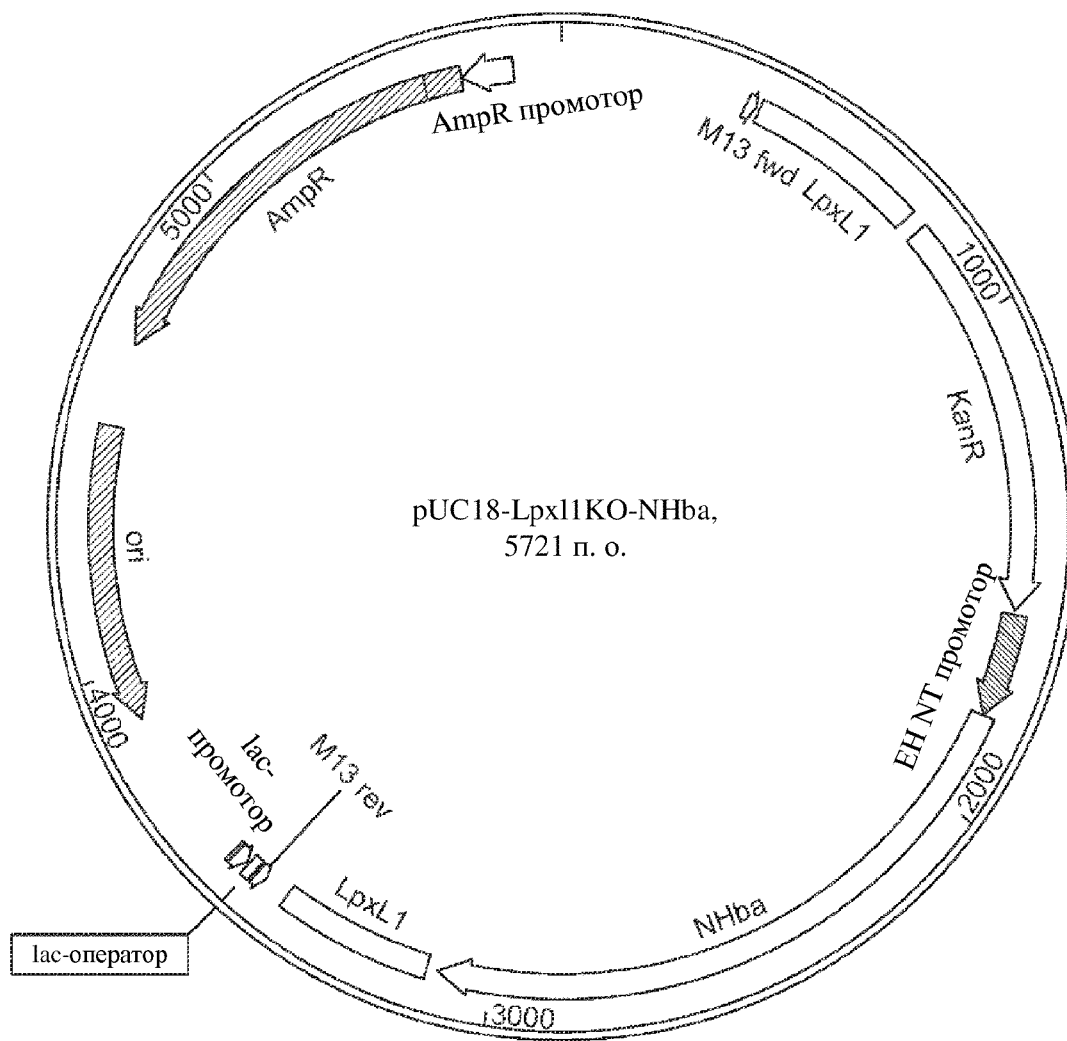
ФИГ. 16



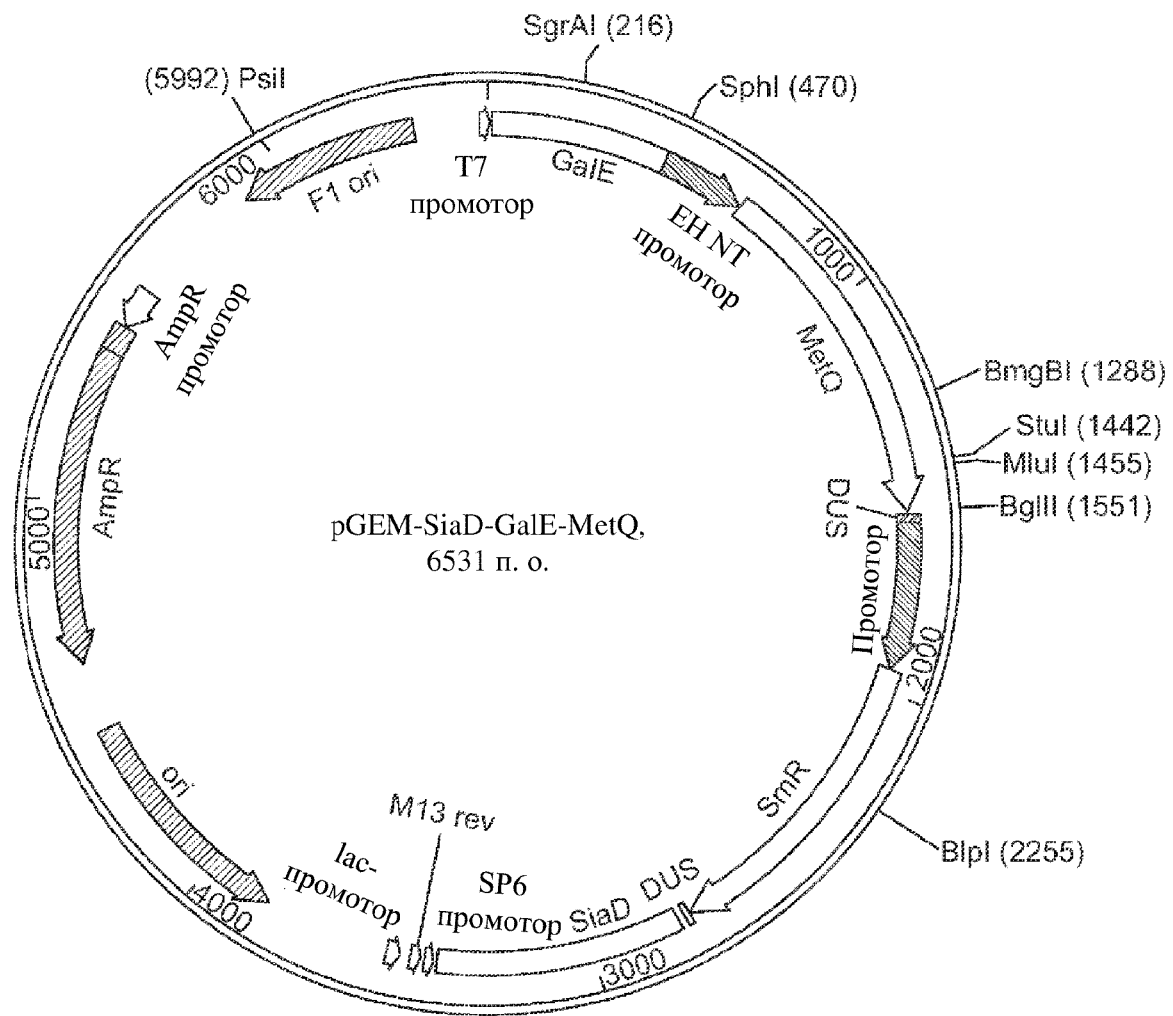
ФИГ. 17



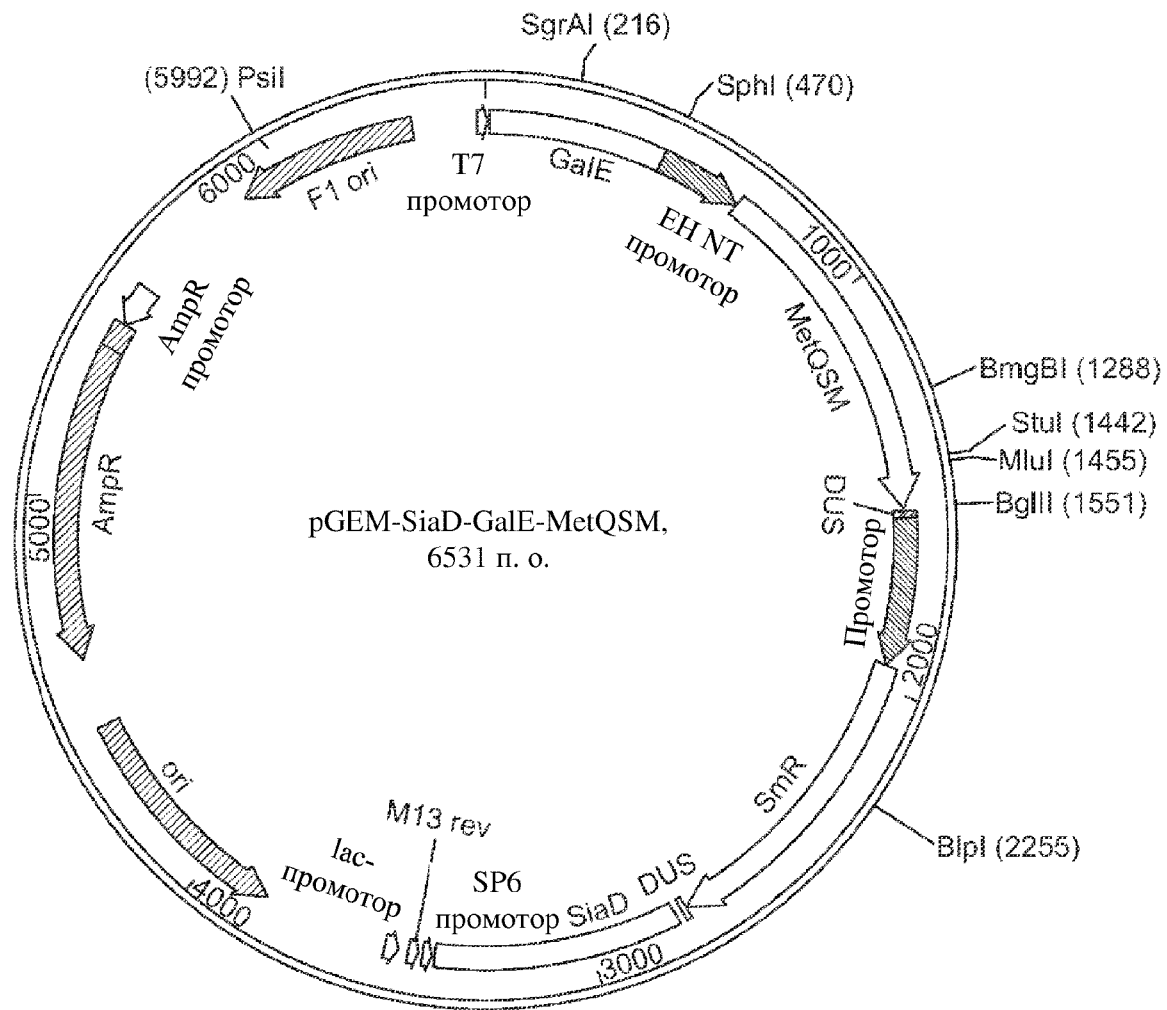
ФИГ. 18



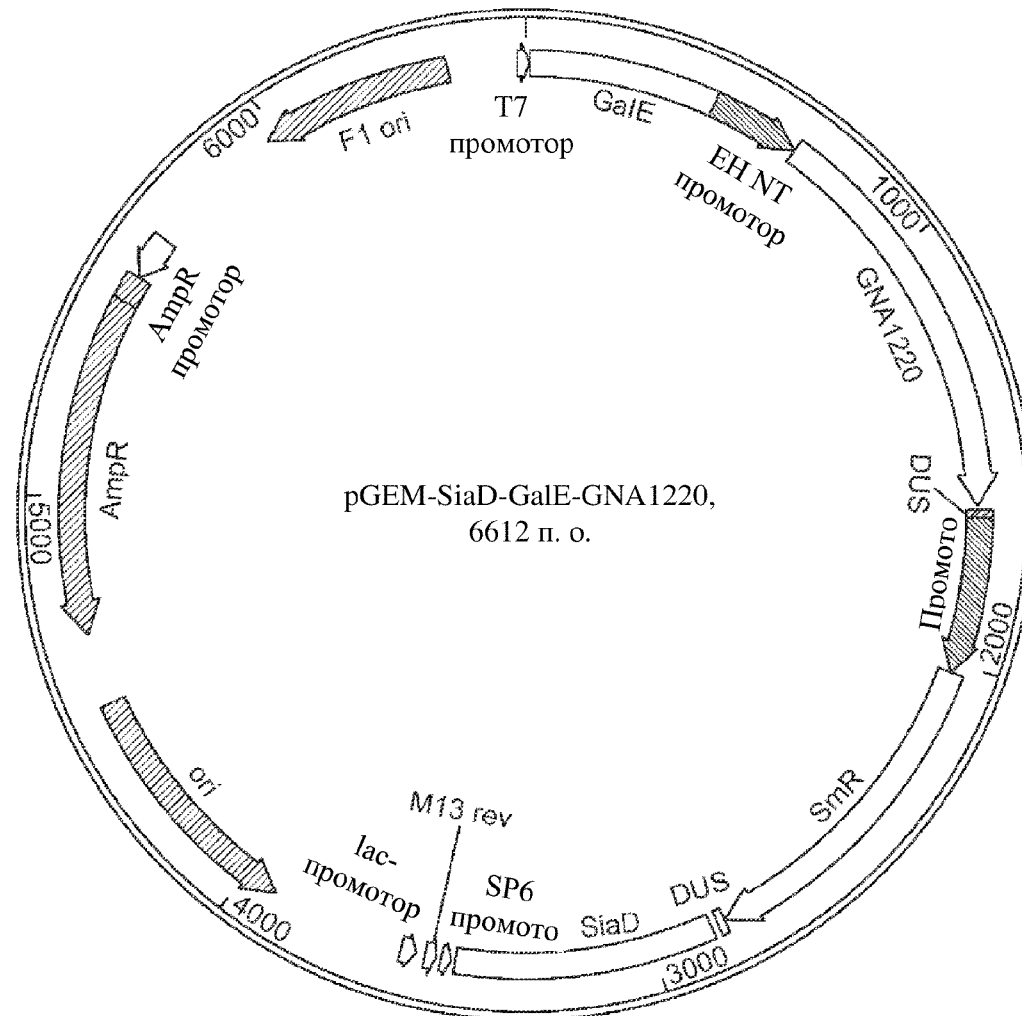
ФИГ. 19



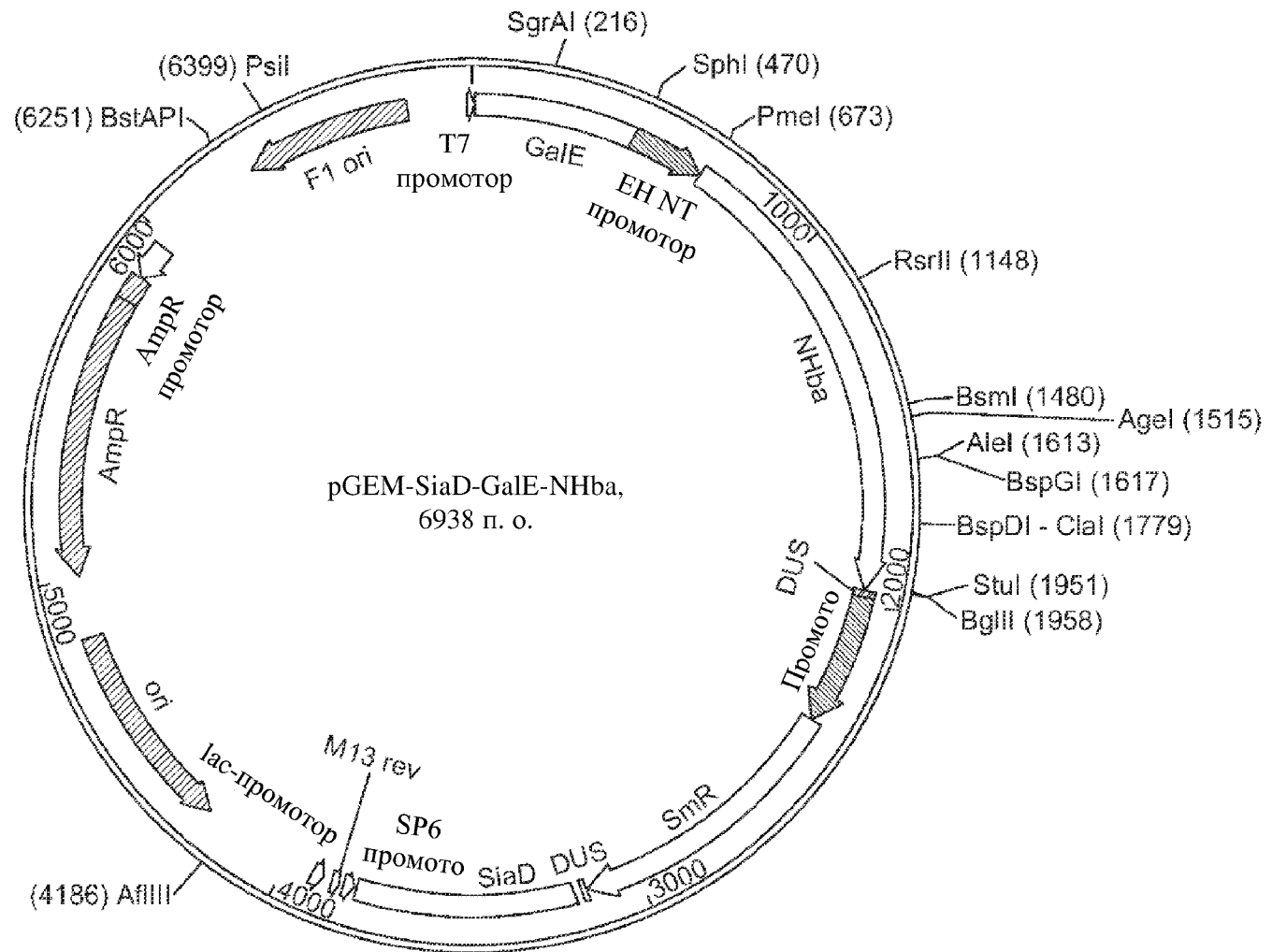
ФИГ. 20



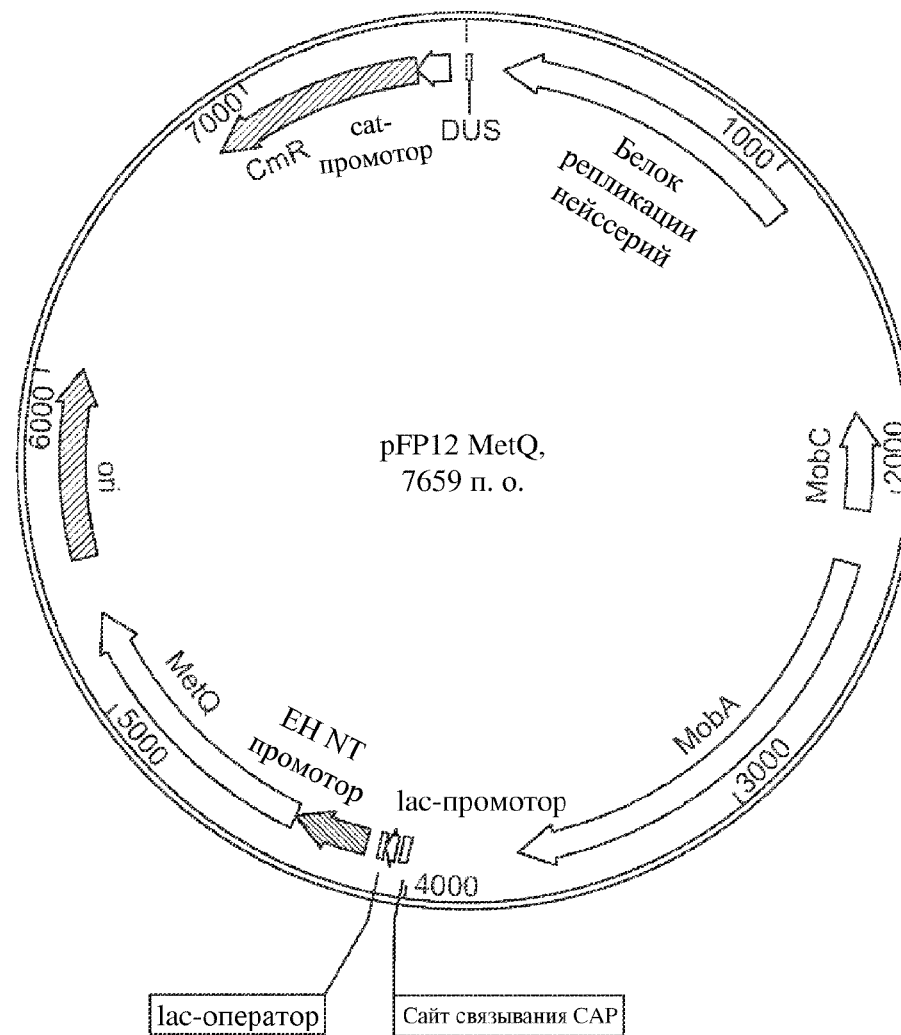
ФИГ. 21



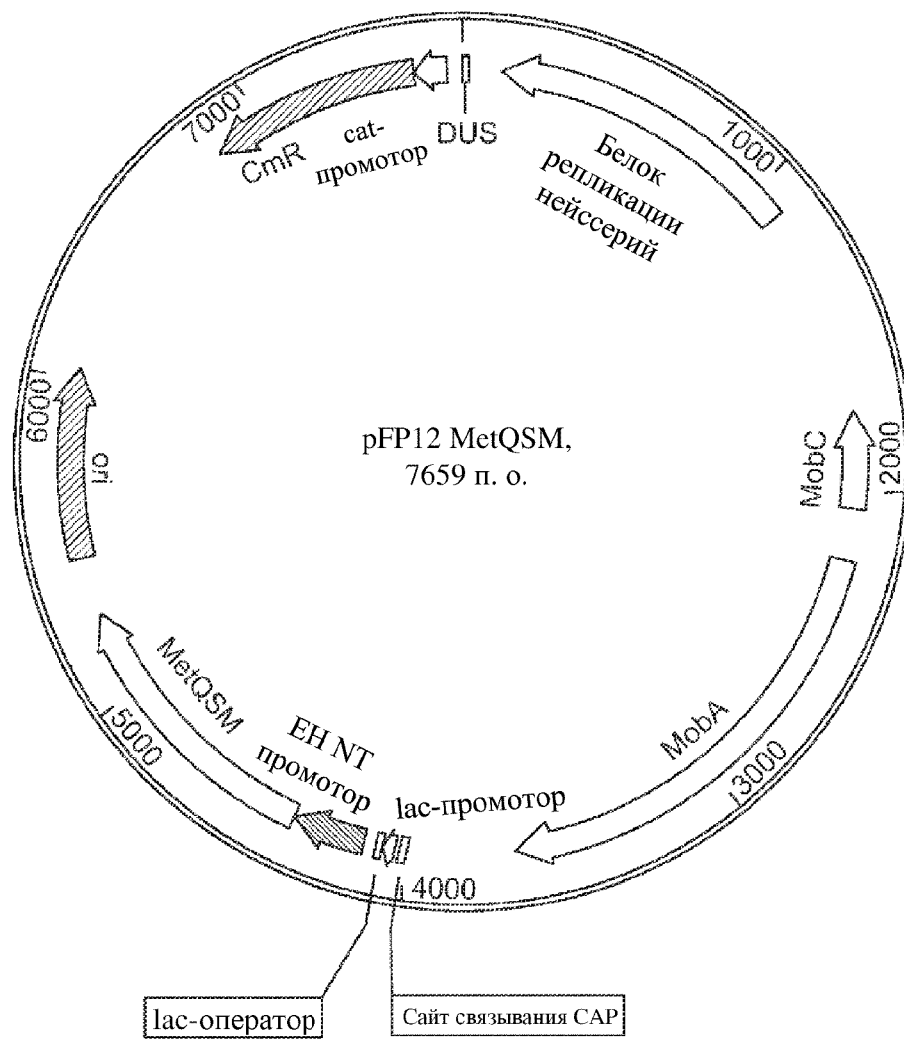
ФИГ. 22



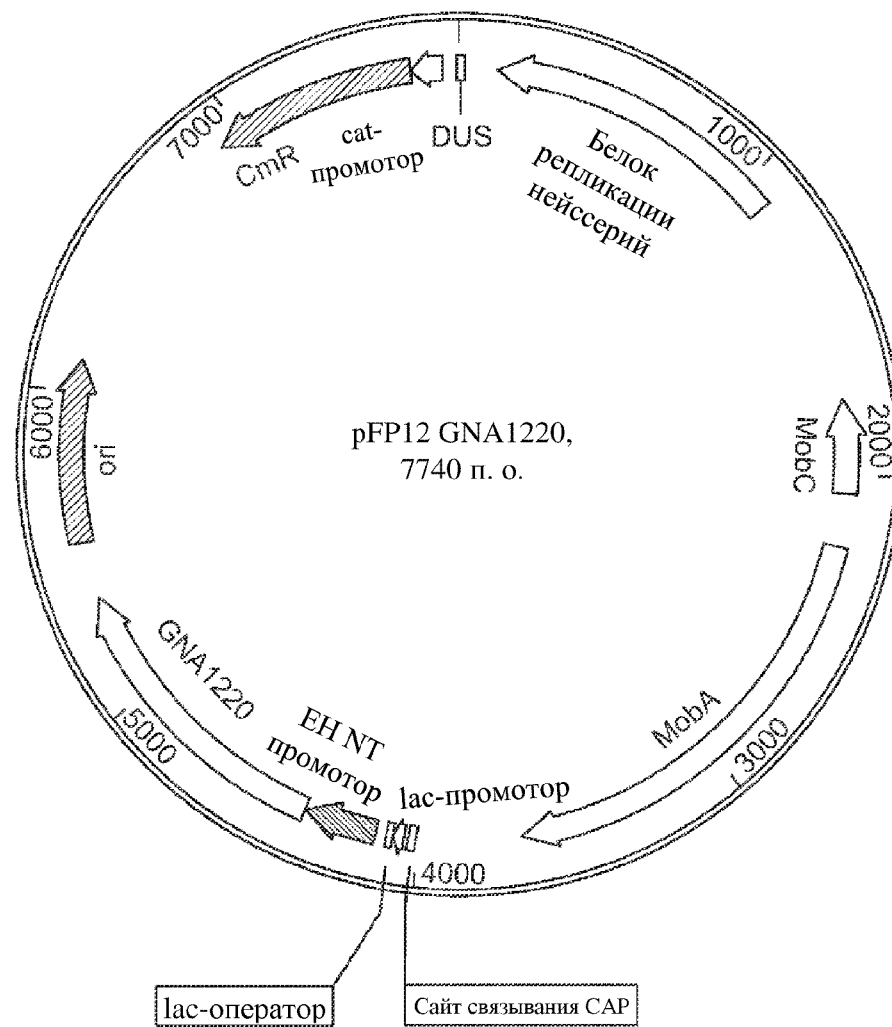
ФИГ. 23



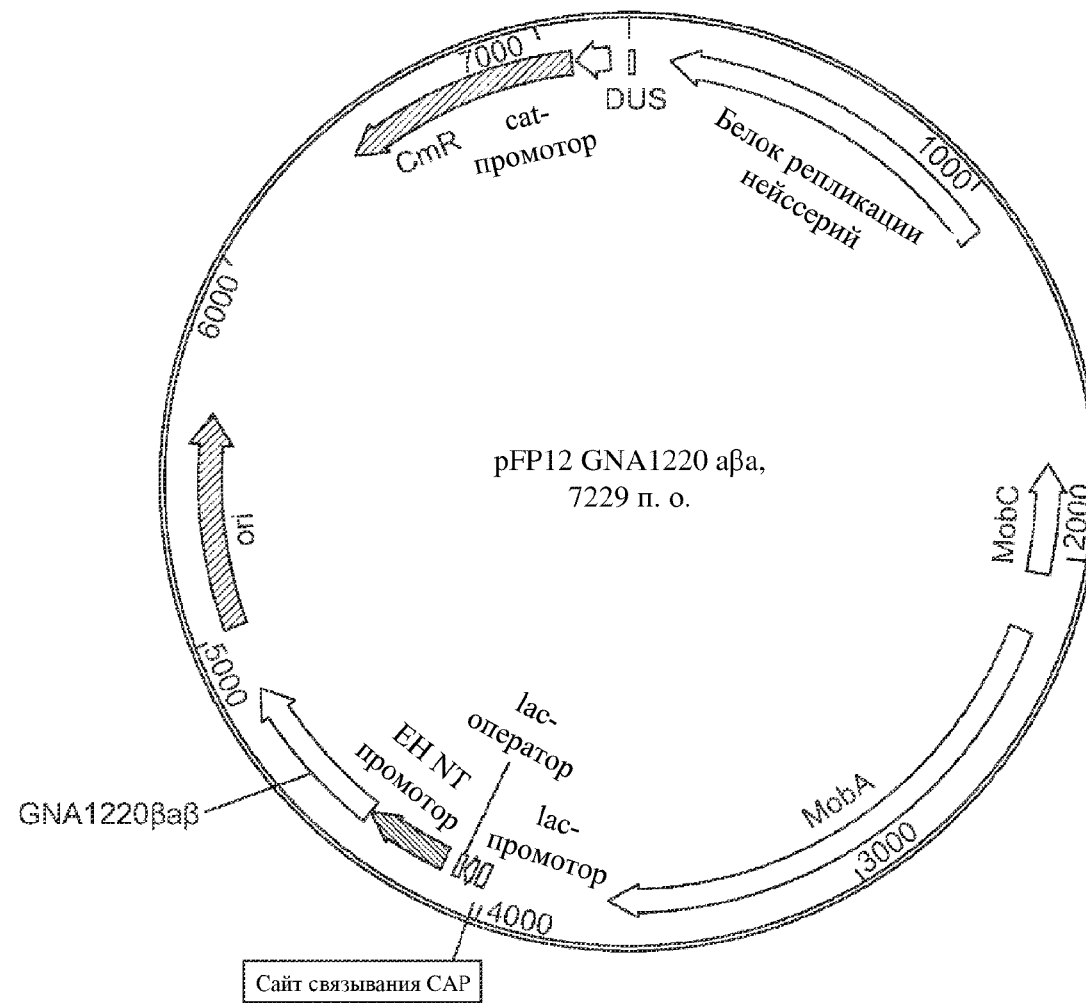
ФИГ. 24



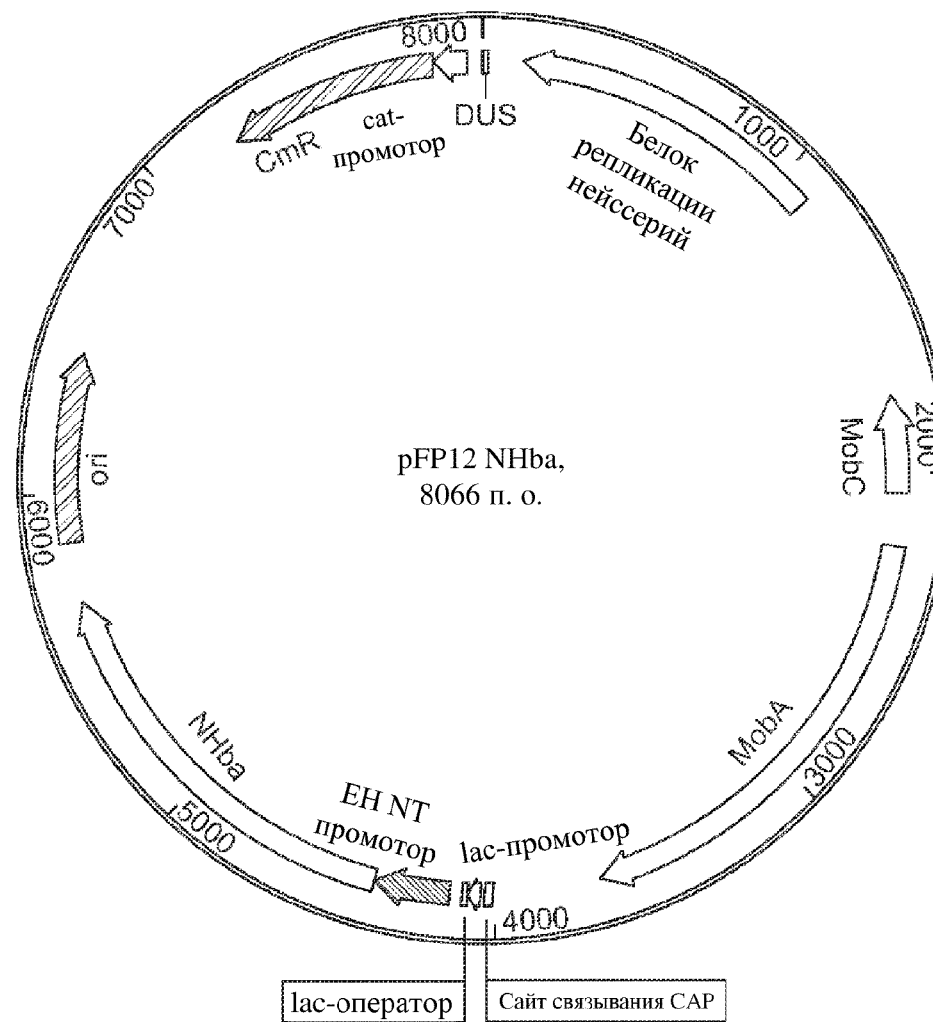
ФИГ. 25



ФИГ. 26



ФИГ. 27



ФИГ. 28