

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046480**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.20

(21) Номер заявки
202190184

(22) Дата подачи заявки
2019.08.09

(51) Int. Cl. *A61K 39/095* (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ МЕНИНГОКОККОВОГО fHbp**

(31) **18188321.6**

(32) **2018.08.09**

(33) **EP**

(43) **2021.05.14**

(86) **PCT/EP2019/071410**

(87) **WO 2020/030782 2020.02.13**

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

(72) Изобретатель:
**Скарселли Мария, Веджи Даньеле
(IT)**

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

(56) WO-A1-2011126863
WO-A1-2015128480
WO-A1-2016008961
WO-A1-2016008960
WO-A2-2006081259
WO-A1-2011051893

STEVEN JOHNSON ET AL.: "Design and Evaluation of Meningococcal Vaccines through Structure-Based Modification of Host and Pathogen Molecules", PLOS PATHOGENS, vol. 8, no. 10, 25 October 2012 (2012-10-25), page e1002981, XP055129501, DOI:10.1371/journal.ppat.1002981, abstract; figure 1

(57) В изобретении предложены мутированные полипептиды fHbp и слитые белки, содержащие указанные мутированные полипептиды fHbp, которые полезны в качестве компонентов иммуногенных композиций для иммунизации против инфекции, вызываемой *Neisseria meningitidis*.

B1

046480

046480

B1

Область техники

Данное изобретение относится к области инженерии белков, в частности относится к менингококковому белку, связывающемуся с фактором Н (fHbp), представляющему собой полезный иммуноген для вакцин.

Предшествующий уровень техники

Инвазивную менингококковую инфекцию (ИМИ) вызывает бактериальный патоген *Neisseria meningitidis*. Из пяти серогрупп, преимущественно ассоциированных с ИМИ во всем мире (MenA, B, C, W и Y), преобладающей серогруппой является MenB, вызывая ИМИ в ряде регионов, включая Канаду, Соединенные Штаты Америки, Австралию, Новую Зеландию и Европу. MenB вызывает тяжелое и зачастую фатальное заболевание, главным образом поражающее детей и людей молодого возраста. Оно часто неверно диагностируется, может вызывать летальный исход в течение 24 ч с момента начала и может привести к постоянной утрате трудоспособности, несмотря на оказанное лечение.

В настоящее время лицензированы две вакцины, предназначенные для иммунизации против менингококка серогруппы B: BEXSERO от компании GSK и TRUMENBA от компании Pfizer.

BEXSERO (также известная под непатентованным названием 4CMenB) содержит препарат везикул наружной мембраны (OMV) из эпидемического штамма NZ98/254 менингококка группы B наряду с пятью менингококковыми антигенами: Гепаринсвязывающим белком A нейссерий (NHBA), вариантом 1.1 белка, связывающего фактор Н (fHbp), адгезивным белком A нейссерий (NadA) и вспомогательными белками GNA1030 и GNA2091. Четыре из этих антигенов находятся в виде слитых белков (слитый белок NHBA-GNA1030 и слитый белок GNA2091-fHbp). 4CMenB описана в литературе (например, см. Bai et al. (2011), *Expert. Opin. Biol. Ther.* 11:969-85, Su & Snape (2011), *Expert. Rev. Vaccines*, 10:575-88). Термины "BEXSERO" и "4CMenB" в данном документе используются взаимозаменяемо.

TRUMENBA содержит два липидированных антигена fHbp MenB (v1.55 и v3.45), адсорбированных на алюминия фосфате.

fHbp (также известный в области техники как происходящий из генома *Neisseria* антиген (GNA) 1870, LP2086 и белок 741) связывается с человеческим фактором Н (hfH), который представляет собой крупный (180 кДа) мультидоменный растворимый гликопротеин, состоящий из 20 регулирующих комплемент белковых элементов (ССР), соединенных короткими линкерными последовательностями. hfH циркулирует в плазме человека и регулирует альтернативный путь системы комплемента. Функциональное связывание fHbp с hfH преимущественно зависит от ССР 6-7 элементов (или доменов) hfH и увеличивает резистентность бактерий к комплемент-опосредованному цитолизу. Таким образом, экспрессия fHbp обеспечивает выживаемость в человеческой крови и сыворотке *ex vivo*.

Предложены различные схемы классификации fHbp, существует специализированная база данных с единой номенклатурой fHbp для обозначения новых подвариантов: (<http://neisseria.org/nm/typing/fhbp>) (а также (<https://pubmlst.org/neisseria/fHbp/>)).

В классификации fHbp выделяют три (основных) варианта 1, 2 и 3, которые дополнительно подразделяют на подварианты fHbp-1.x, fHbp-2.x и fHbp-3.x, где x обозначает определенный подвариант пептида. В отличие от v2 и v3, fHbp v1 является высокогетерогенным и включает несколько подвариантов. Согласно другой номенклатуре, подварианты объединяют в подсемейство A (соответствующее вариантам 2 и 3) и подсемейство B (соответствующее варианту 1) на основе разнообразия последовательностей.

Прогнозируется, что BEXSERO обеспечит широкое перекрытие штаммов MenB, циркулирующих в мире (Medini D. et al., *Vaccine*, 2015; 33:2629-2636; Vogel U. et al., *Lancet Infect Dis.* 2013; 13:416-425; Křížová et al., *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2014; 63:103-106; Tzanakaki G. et al., *BMC Microbiol.* 2014; 14:111; Wasko I. et al., *Vaccine*, 2016; 34:510-515; 6. Simões M.J. et al., *PLoS ONE*, 12(5):e0176177; и Parikh S.R. et al., *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17:754-62). Кроме того, после введения BEXSERO в национальную программу иммунизации детей в Великобритании в сентябре 2015 г. данные через 10 месяцев показали 83% эффективность вакцины в отношении всех штаммов MenB после введения двух доз (Parikh S.R. et al., *Lancet*, 2016; 388:2775-82).

Однако бактерицидная активность является вариант-специфичной; антитела против одного из вариантов необязательно будут обеспечивать перекрестную защиту против других вариантов, несмотря на то, что для fHbp v2 и v3 описана перекрестная активность (Massignani V. et al., *J. Exp. Med.* 2003; 197:789-799). Антитела против подварианта fHbpv1.1, включенного в вакцину 44CMenB, обладают высокой перекрестной реактивностью с наиболее часто распространенными подвариантами fHbp v1, но меньшей перекрестной реактивностью с подвариантами v1, обладающие наиболее низкой степенью родства с v1.1. Кроме того, антитела против подварианта fHbpv1.1, включенного в вакцину 44CMenB, характеризуются плохой перекрестной реактивностью с fHbp v2 и v3 (Brunelli B. et al., *Vaccine*, 2011; 29:1072-1081). Это означает, что 44CMenB не перекрывает некоторые штаммы менингококка, несущие fHbp v2, v3, или штаммы, несущие некоторые подварианты v1.

Таким образом, несмотря на эффективность лицензированных вакцин против менингококка серогруппы B, таких как BEXSERO, остается потребность в разработке вакцин против менингококка, сохраняющих эффективность и не уступающих существующим одобренным вакцинам, таким как 44CMenB, однако отличающихся лучшим перекрытием штаммов менингококка, несущих варианты fHbp, кото-

рые плохо перекрываются существующими вакцинами.

Краткое изложение сущности изобретения

В первом аспекте изобретения предложен мутантный менингококковый полипептид fHbp v1.13, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2, где аминокислотная последовательность указанного мутантного менингококкового полипептида fHbp v1.13 включает мутацию с заменой E211, S216, E232 в последовательности SEQ ID NO: 2 или их комбинации.

Во втором аспекте изобретения предложен мутантный менингококковый полипептид fHbp v1.15, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6, где аминокислотная последовательность указанного мутантного менингококкового полипептида fHbp v1.15 включает мутацию с заменой E214, S219, E235 в последовательности SEQ ID NO: 6 или их комбинации.

В третьем аспекте изобретения предложен слитый полипептид, содержащий все три менингококковых полипептида fHbp v1, v2 и v3, где варианты последовательностей fHbp расположены в порядке v2-v3-v1 от N- к C-концу и где полипептид v1 представляет собой мутантный полипептид fHbp v1.13 согласно первому аспекту изобретения или мутантный полипептид fHbp v1.15 согласно второму аспекту изобретения.

В четвертом аспекте изобретения предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, возможно, плазида, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный полипептид fHbp v1.13 согласно первому аспекту изобретения, мутантный полипептид fHbp v1.15 согласно второму аспекту изобретения или слитый полипептид согласно третьему аспекту изобретения.

В пятом аспекте изобретения предложена рекомбинантная клетка-хозяин, трансформированная молекулой нуклеиновой кислоты согласно четвертому аспекту изобретения.

В шестом аспекте изобретения предложены везикулы наружной мембраны, полученные или приготовленные из рекомбинантной клетки-хозяина согласно пятому аспекту изобретения.

В седьмом аспекте изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая мутантный полипептид fHbp v1.13 согласно первому аспекту изобретения, мутантный полипептид fHbp v1.15 согласно второму аспекту изобретения, слитый полипептид согласно третьему аспекту изобретения или везикулу наружной мембраны согласно шестому аспекту изобретения. Указанная иммуногенная композиция является полезной для иммунизации млекопитающего, предпочтительно человека, против инфекции, вызванной *Neisseria meningitidis*.

Описание графических материалов

Фиг. 1А представляет собой график, демонстрирующий встречаемость штаммов В менингококка, экспрессирующих подварианты fHbp v1.x, и показывающий, какие из этих подвариантов v1.x перекрываются (черный) или не перекрываются (белый) вакциной 44CMenB.

Фиг. 1В представляет собой график, демонстрирующий встречаемость штаммов В менингококка, несущих fHbp v2, и показывающий, какие из этих штаммов перекрываются (черный) или не перекрываются (белый) вакциной 44CMenB.

Фиг. 1С представляет собой график, демонстрирующий встречаемость штаммов В менингококка, несущих fHbp v3, и показывающий, какие из этих штаммов перекрываются (черный) или не перекрываются (белый) вакциной 44CMenB.

Фиг. 2 включает четыре графика (термограммы), где сравниваются данные дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для fHbp v1.1, fHbp v1.13 (дикий тип) и fHbp v.1.13 E211A (фиг. 2А); fHbp v.1.13 S216R (фиг. 2В); fHbp v.1.13 E211A/E232A (фиг. 2С) и fHbp v.1.13 E211A/S216R (фиг. 2D).

Фиг. 3 включает четыре графика (сенсограммы), где сравнивается связывание доменов 6-7 фактора Н с fHbp v1.1, fHbp v1.13 (дикий тип) и fHbp v.1.13 E211A (фиг. 3А); fHbp v.1.13 S216R (фиг. 3В); fHbp v.1.13 E211A/E232A (фиг. 3С) и fHbp v.1.13 E211A/S216R (фиг. 3D).

Фиг. 4А-Д включает четыре графика (сенсограммы), где сравнивается связывание полноразмерного белка фактора Н с fHbp v1.1, fHbp v1.13 (дикий тип) и fHbp v.1.13 E211A (фиг. 4А); fHbp v.1.13 S216R (фиг. 4В); fHbp v.1.13 E211A/E232A (фиг. 4С) и fHbp v.1.13 E211A/S216R (фиг. 4D).

Фиг. 5А-Д включает четыре графика (сенсограммы), где сравнивается связывание доменов 6-7 фактора Н с fHbp v1.1, fHbp v1.15 (дикий тип) и fHbp v.1.15 E214A (фиг. 5А); fHbp v.1.15 S219R (фиг. 5В); fHbp v.1.15 E214A/E235A (фиг. 5С) и fHbp v.1.15 E214A/S219R (фиг. 5D).

Фиг. 6А-Д включает четыре графика (сенсограммы), где сравнивается связывание полноразмерного белка фактора Н с fHbp v1.1, fHbp v1.15 (дикий тип) и fHbp v.1.15 E214A (фиг. 6А); fHbp v.1.15 S219R (фиг. 6В); fHbp v.1.15 E214A/E235A (фиг. 6С) и fHbp v.1.15 E214A/S219R (фиг. 6D).

Фиг. 7А, В включает два графика (сенсограммы), где показано связывание доменов 6-7 фактора Н с двумя различными слитыми белками fHbp по изобретению в сравнении с известными слитыми fHbp. На фиг. 7А сравнивается связывание fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и слитого fHbp 231.13 E211A/S216R. На фиг. 7В сравнивается связывание fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и слитого fHbp 231.13 E211A/E232A.

На фиг. 8 сравнивается связывание доменов 6-7 фактора Н с fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и сли-

тым fHbp 231.15 E214A/E235A по изобретению.

Фиг. 9А, В включает два графика, где показано связывание полноразмерного белка фактора Н с двумя различными слитыми белками fHbp по изобретению в сравнении с известными слитыми fHbp.

На фиг. 9А сравнивается связывание fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и слитого fHbp 231.13 E211A/S216R.

На фиг. 9В сравнивается связывание fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и слитого fHbp 231.13 E211A/E232A.

На фиг. 10 сравнивается связывание полноразмерного белка фактора Н с fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и слитым fHbp 231.15 E214A/E235A по изобретению.

На фиг. 11А показаны бактерицидные титры сыворотки, измеренные в присутствии кроличьего комплемента (rSBA) для каждого из шести относящихся к fHbp антигенов и BEXSERO-подобной композиции, в отношении ряда штаммов менингококка, экспрессирующих fHbp v1.x. Каждая точка отображает бактерицидный титр сыворотки в отношении отдельного штамма, измеренный в пулированной сыворотке.

На фиг. 11В показаны бактерицидные титры сыворотки, измеренные в присутствии человеческого комплемента (hSBA) для каждого из шести относящихся к fHbp антигенов и BEXSERO-подобной композиции, в отношении того же ряда штаммов, экспрессирующих fHbp v1.x.

На фиг. 12А показаны бактерицидные титры сыворотки, измеренные в присутствии кроличьего комплемента (rSBA) для каждого из шести относящихся к fHbp антигенов и BEXSERO-подобной композиции, в отношении ряда штаммов менингококка, экспрессирующих fHbp v2 или v3. Каждая точка отображает бактерицидный титр сыворотки в отношении отдельного штамма, измеренный в пулированной сыворотке.

На фиг. 12В показаны бактерицидные титры сыворотки, измеренные в присутствии человеческого комплемента (hSBA) для каждого из шести относящихся к fHbp антигенов и BEXSERO-подобной композиции, в отношении того же ряда штаммов, экспрессирующих fHbp v2 или v3.

На фиг. 13 показана бактерицидная активность пулированной сыворотки, измеренная в присутствии человеческого комплемента (hSBA) для каждой из композиций, в отношении штаммов типов var2/3 (фиг. 13А) и v1.x (фиг. 13В). Сыворотку, полученную у вакцинированных мышей, исследовали в пулированном виде в присутствии человеческой плазмы как источника комплемента (hSBA) на 50 штаммах MenB, сгруппированных как штаммы var1 (30 штаммов) и штаммы var2/3 (20 штаммов). На данной фигуре fHbp 2-3-1.13 относится к слитому белку, содержащему v1.13 дикого типа, fHbp 2-3-1.13 NB ES относится к слитому 231.13_E211A/S216R, fHbp 2-3-1.13 NB EE относится к слитому 231.13_E211A/E232A, fHbp 2-3-1.15 относится к слитому белку, содержащему v1.15 дикого типа, а fHbp 2-3-1.15 NB EE относится к слитому 231.15_E214A/E235A.

На фиг. 14 показан процент перекрытия штаммов, экспрессирующих fHbp var2/3 (А) и fHbp var1 (В), тестируемыми вакцинными композициями в исследовании на мышах. На данной фигуре fHbp 2-3-1.13 относится к слитому белку, содержащему v1.13 дикого типа, fHbp 2-3-1.13 NB ES относится к слитому 231.13_E211A/S216R, fHbp 2-3-1.13 NB EE относится к слитому 231.13_E211A/E232A, fHbp 2-3-1.15 относится к слитому белку, содержащему v1.15 дикого типа, а fHbp 2-3-1.15 NB EE относится к слитому 231.15_E214A/E235A.

На фиг. 15 показаны бактерицидные титры сыворотки мышей, измеренные в присутствии человеческого комплемента (hSBA) в отношении 11 штаммов, включая референтные штаммы BEXSERO и штаммы fHbp вариантов 1.1 и 1.4. На данной фигуре fHbp 2-3-1.13 относится к слитому белку, содержащему v1.13 дикого типа, fHbp 2-3-1.13 NB ES относится к слитому 231.13_E211A/S216R, fHbp 2-3-1.13 NB EE относится к слитому 231.13_E211A/E232A, fHbp 2-3-1.15 относится к слитому белку, содержащему v1.15 дикого типа, а fHbp 2-3-1.15 NB EE относится к слитому 231.15_E214A/E235A.

На фиг. 16 композиции по изобретению, содержащие слитый белок BEXSERO + fHbp231.13_E211A/S216R (обозначенные на графиках как "BEXSERO PLUS PLUS"), сравниваются со стандартной композицией BEXSERO в отношении панели из четырех индикаторных штаммов BEXSERO: M14459 для fHbp var1.1 (фиг. 16А); NZ98/254 для PorA P1.4 (фиг. 16В); M4407 для NHBA (фиг. 16С) и 96217 для NadA (фиг. 16D).

На фиг. 17 показана бактерицидная активность пулированной сыворотки, измеренная в присутствии человеческого комплемента (hSBA) для каждой из композиций, в отношении штаммов типов var2/3 (фиг. 17А) и v1.x (фиг. 17В). Сыворотку, полученную у вакцинированных кроликов, исследовали в пулированном виде на штаммах MenB, сгруппированных как штаммы var1 и var2/3. На данном графике fHbp 2-3-1.13 относится к слитому белку, содержащему v1.13 дикого типа, fHbp 2-3-1.13 NB ES относится к слитому 231.13_E211A/S216R, fHbp 2-3-1.15 относится к слитому белку, содержащему v1.15 дикого типа, а fHbp 2-3-1.15 NB EE относится к слитому 231.15_E214A/E235A.

На фиг. 18 показан процент перекрытия штаммов, экспрессирующих fHbp var2/3 (А) и fHbp var1 (В), обеспечиваемый вакцинными композициями в исследовании на кроликах. На данной фигуре fHbp 2-3-1S относится к слитому белку 231.1R41S предшествующего уровня техники, fHbp 2-3-1.13 относится к слитому белку, содержащему v1.13 дикого типа, fHbp 2-3-1.13 NB ES относится к слитому

231.13_E211A/S216R, fHbp 2-3-1.13 NB EE относится к слитому 231.13_E211A/E232A, fHbp 2-3-1.15 относится к слитому белку, содержащему v1.15 дикого типа, а fHbp 2-3-1.15 NB EE относится к слитому 231.15_E214A/E235A.

На фиг. 19 показаны бактерицидные титры сыворотки кроликов, измеренные в присутствии человеческого комплемента (hSBA) в отношении 11 штаммов, включая референтные штаммы BEXSERO и штаммы fHbp вариантов 1.1 и 1.4. На данной фигуре fHbp 2-3-1.13 относится к слитому белку, содержащему v1.13 дикого типа, fHbp 2-3-1.13 NB ES относится к слитому 231.13_E211A/S216R, fHbp 2-3-1.15 относится к слитому белку, содержащему v1.15 дикого типа, а fHbp 2-3-1.15 NB EE относится к слитому 231.15_E214A/E235A.

На фиг. 20 показана динамика бактериального заражения (биолюминесцентным MC58 cc32/var. 1) у иммунизированных и неиммунизированных мышей. Мышей группы А иммунизировали 4CMenB+fHbp 23(S)1.13 дикого типа, тогда как мышей группы В иммунизировали 4CMenB+fHbp 23(S)1.13_E211A/S216R. Неиммунизированная мышь получала только фосфатно-солевой буфер (PBS) в качестве контроля.

На фиг. 21А и В представлена количественная и сравнительная оценка динамики бактериального заражения (биолюминесцентным MC58 cc32/var. 1) у иммунизированных и неиммунизированных мышей. При сравнении использовали необработанные суммарные сигналы (в фотонах в секундах на мышью в каждый момент времени) (фиг. 21А) или отношение сигналов через 30 мин и 6 ч после бактериального заражения (фиг. 21В).

Подробное описание изобретения

Белок, связывающийся с липопротеиновым фактором Н (fHbp), экспрессируется на поверхности всех штаммов MenB. fHbp связывается с человеческим белковым фактором Н (hfH), регулирующим комплемент Н (hfH), образуя комплекс, который защищает бактерий от опосредованного комплементом цитолиза и создает механизм, обеспечивающий выживание *N. meningitidis* в кровотоке человека. Антитела против fHbp выполняют двойную функцию: они являются бактерицидными сами по себе, а предупреждая связывание с hfH, они делают бактериальные штаммы более подверженными цитолизу. Снижение или устранение способности fHbp связываться с hfH повышает иммуногенность антигена fHbp за счет предотвращения образования между fHbp и hfH защитных комплексов, которые способны маскировать эпитопы fHbp и предотвращать связывание антитела.

Существует три различных генетических и иммуногенных варианта fHbp (v1, v2 и v3) и множество подвариантов. Большинство штаммов MenB, не перекрываемых 44CMenB, экспрессируют fHbp v2 или v3 или подварианты v1 с низкой степенью родства с var1.1.

В современной эпидемиологии с применением подхода MATS (как описано, например, Medini et al. *Vaccine* 2015; 33(23): 2629-36) показано, что штаммы с v1.1 и v1.4 встречаются наиболее часто, за ними идут v1.15, v1.14 и v1.13, как показано на фиг. 1А. Антитела против подварианта fHbp v1.1, включенные в вакцину 44CMenB, обладают выраженной перекрестной реактивностью с наиболее часто встречающимися подвариантами fHbp v1 (v1.1 и v1.4), но меньшей перекрестной реактивностью с подвариантами v1, которые обладают наиболее низкой степенью родства с v1.1 (например, v1.15 и v1.13). Это показано на фиг. 1, поскольку штаммы менингококка В, экспрессирующие fHbp v1.15 и v1.13, являются наиболее часто встречающимися штаммами, которые не перекрываются вакциной 44CMenB.

Кроме того, антитела против подварианта fHbp v1.1, включенного в вакцину 44CMenB, обладают плохой перекрестной реактивностью с fHbp v2 и v3 (Brunelli B. et al., *Vaccine*, 2011; 29:1072-1081). На фиг. 1В и С показаны пробелы в перекрывании 44CMenB некоторых наиболее часто встречающихся штаммов, экспрессирующих fHbp v2 или v3.

Это означает, что 44CMenB не перекрывает некоторые штаммы менингококка, несущие fHbp v2, v3, или штаммы, несущие некоторые под варианты v1.

В данном изобретении предложены мутированные полипептиды fHbp варианта 1.13 или варианта 1.15 (v1.13 или v1.15), которые являются иммуногенными и которые могут быть скомбинированы с существующими вакцинами против менингококка для обеспечения лучшего перекрывания штаммов *N. meningitidis*.

В частности, полипептиды v1 по изобретению являются подвариантами fHbp варианта 1, которые генетически различаются с антигеном fHbp v1.1, включенным в 44CMenB.

Кроме того, полипептиды v1 по изобретению мутированы с целью уменьшения связывания с hfH по сравнению с соответствующим полипептидом v1 дикого типа. Напротив, антиген fHbp v1.1, включенный в BEXSERO, и антигены fHbp v1.55 и v3.45, включенные в TRUMENB, связываются с hfH.

Полипептиды v1 по изобретению могут быть представлены в отдельном виде или являться компонентом слитого белка, наряду с мутантными формами fHbp вариантов 2 и 3, которые были модифицированы для улучшения стабильности, а также для уменьшения связывания с fHbp. Предложив единый слитый белок, содержащий указанные антигены v2 и v3 наряду с антигеном v1 по изобретению, авторы изобретения добились лучшего перекрывания штаммов по сравнению с существующими лицензированными вакцинами против менингококка В. Для ясности, ни антиген v2, ни v3 не присутствуют, например, в 44CMenB. Присутствие антигенов v2 и v3 в составе слитых белков по данному изобретению улучшает

перекрытие штаммов по сравнению, например, с 44CMenB.

Полипептиды v1 и слитые белки по изобретению могут применяться в отдельности или в комбинации с менингококковым антигеном NHBA, менингококковым антигеном NadA, менингококковым антигеном fHbp и везикулой наружной мембраны менингококка (например, в комбинации с композицией BEXSERO) для получения комбинированной иммуногенной композиции, обладающей повышенной иммуногенностью (благодаря добавлению/включению несвязывающихся форм вариантов fHbp), и лучшего перекрытия штаммов *N. meningitidis* (благодаря добавлению новых вариантов/подвариантов fHbp) по сравнению с BEXSERO в отдельности.

Мутантные полипептиды менингококкового fHbp v1.13.

Авторы данного изобретения обнаружили остатки в последовательности fHbp v1.13, которые могут быть модифицированы для уменьшения связывания с hfH. Такие мутанты в данном документе обозначают несвязывающимися мутантами (NB). Авторы изобретения также обнаружили комбинации мутаций в последовательности v1.13, которые особенно эффективны для снижения связывания с hfH. fHbp v1.13 также известен в области техники как вариант fHbp B09.

Зрелый липопротеин fHbp v1.13 дикого типа из штамма M982 (номер доступа в GenBank AAR84475.1) имеет следующую аминокислотную последовательность, где подчеркнута N-концевая полиглициновая сигнальная последовательность:

CSSGGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKAAQGAECT
YNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIFRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQV
QDSEDSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTITID
FAAKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGG
QAQEVAGSAEVETANGINHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 1)

Зрелый липопротеин v1.13 отличается от полноразмерной последовательности дикого типа тем, что полноразмерный полипептид имеет дополнительные 19 остатков N-концевой лидерной последовательности, которая отщепляется от зрелого полипептида. Так, полноразмерный fHbp v1.13 дикого типа имеет следующую аминокислотную последовательность (с N-концевой лидерной последовательностью, показанной жирным шрифтом):

MNRTAFCCFSLTAALIL**TACSSGGGG**VAAIDIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLD
QSVRKNEKLLKAAQGAECTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIFRQIEVDGKLITLESGE
FQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATY
RGTAFGSDDAGGKLTITIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKRHAVISG
SVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGINHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 31)

У ΔG формы зрелого липопротеина v1.13 отсутствует N-концевая полиглициновая последовательность зрелого полипептида, т.е. у нее отсутствуют первые 7 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 1, и у нее отсутствуют первые 26 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 31:

VAAIDIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKAAQGAECTYNGDLSL
NTGKLNKDKVSRFDIFRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSG
KMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTITIDFAAKQGH
GKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAG
SAEVETANGINHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 2)

Таким образом, в первом аспекте изобретения предложен мутантный менингококковый полипептид fHbp v1.13, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2, при условии, что аминокислотная последовательность указанного мутантного менингококкового полипептида fHbp v1.13 включает мутацию с заменой одного или более чем одного из остатков E211, S216 или E232 последовательности SEQ ID NO: 2.

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. Предпочтительно оно равно 80 (т.е. аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1.13 идентична по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 2), и более предпочтительно равно 85, более предпочтительно равно 90, и более предпочтительно 95. Наиболее предпочтительно аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1.13 идентична по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 2.

Предпочтительно аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 2 по меньшей мере одной или более чем одной заменой E211A, S216R или E232A. Более предпочтительно аминокислотная последовательность содержит замены множества остатков, выбранных из следующих: (i) E211A и E232A или (ii) E211A и S216R. Предпочтительно аминокислотная последовательность содержит замены остатков E211A и S216R относительно SEQ ID NO: 2.

Без ограничения какой-либо теорией, замена глутаминовой кислоты (E) на аланин (A) в положении 211 последовательности SEQ ID NO: 2 удаляет отрицательно заряженный остаток, задействованный в рекрутировании hfH, что способствует устранению связывания fH. Замена аргинина (R) на серин (S) в положении 216 последовательности SEQ ID NO: 2 замещает аминокислоту дикого типа соот-

ветствующим остатком из N. gonorrhoeae, который не связывается с hfH.

В предпочтительных воплощениях мутантный полипептид по изобретению имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (v1.13 ΔG E211A/E232A) или SEQ ID NO: 4 (v1.13 ΔG (E211A/S216R)). Более предпочтительно мутантный полипептид v1.13 по изобретению имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

После введения животному-хозяину, предпочтительно млекопитающему и более предпочтительно человеку, мутантный полипептид v1.13 по изобретению может вызывать выработку антител, которые способны распознавать менингококковые полипептиды fHbp дикого типа с последовательностью SEQ ID NO: 1. В идеальном варианте такие антитела являются бактерицидными (см. ниже).

Мутантные полипептиды менингококкового fhbp v1.15.

Авторы данного изобретения также обнаружили остатки в последовательности fHbp v1.15, которые могут быть модифицированы для предотвращения связывания с hfH. Такие мутанты в данном документе обозначают несвязывающимися мутантами (NB). Авторы изобретения также обнаружили комбинации мутаций в последовательности v1.15, которые особенно эффективны для предотвращения связывания с hfH. fHbp v1.15 также известен в области техники как вариант fHbp B44.

Зрелый липопротейн fHbp v1.15 дикого типа из штамма NM452 (номер доступа в GenBank ABL14232.1) имеет следующую аминокислотную последовательность, где подчеркнута N-концевая полиглициновая сигнальная последовательность:

CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQG
AERTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTA
LQTEQVQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHNAVISGSVLYNQAEGSY
SLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 5)

Зрелый липопротейн v1.15 отличается от полноразмерной последовательности дикого типа тем, что полноразмерный полипептид имеет дополнительные 19 остатков N-концевой лидерной последовательности, которая отщепляется от зрелого полипептида. Так, полноразмерный fHbp v1.15 дикого типа имеет следующую аминокислотную последовательность (с N-концевой лидерной последовательностью, показанной жирным шрифтом):

MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLK
SLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRFDIFIRQIEVDGQL
ITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPK
DVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEK
HNAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ (SEQ
ID NO: 32)

У ΔG формы зрелого липопротейна v1.15 отсутствует N-концевая полиглициновая последовательность, т.е. у нее отсутствуют первые 12 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 5 и у нее отсутствуют первые 31 аминокислоты последовательности SEQ ID NO: 32:

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDN
SLNTGKLNKDKISRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHS
GKMKVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQ
GHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHNAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGQAQEV
AGSAEVETANGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 6)

Таким образом, во втором аспекте изобретения предложен мутантный менингококковый полипептид fHbp v1.15, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6, при условии, что аминокислотная последовательность указанного мутантного менингококкового полипептида fHbp v1.15 включает мутацию с заменой одного или более чем одного из остатков E214, S219 или E235 последовательности SEQ ID NO: 6.

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. Предпочтительно оно равно 80 (т.е. аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1.15 идентична по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 6), более предпочтительно равно 85, более предпочтительно равно 90 и более предпочтительно 95. Наиболее предпочтительно аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1.15 идентична по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 6.

Предпочтительно аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 6 по меньшей мере одной или более чем одной из замен E214A, S219R или E235A. Более предпочтительно аминокислотная последовательность содержит замены остатков, выбранных из следующих: (i) S219R, (ii) E214A и S219R и (iii) E214A и E235A.

В предпочтительных воплощениях мутантный полипептид v1.15 по изобретению имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (v1.15_S219R), SEQ ID NO: 8 (v1.15_E214A/S219R) или SEQ ID NO: 9 (v1.15_E214A/E235A).

После введения животному-хозяину, предпочтительно млекопитающему и более предпочтительно

человеку, мутантный полипептид v1.15 по изобретению может вызывать выработку антител, которые способны распознавать менингококковые полипептиды fHbp дикого типа с последовательностью SEQ ID NO: 5. В идеальном варианте такие антитела являются бактерицидными (см. ниже).

Слитый полипептид.

В изобретении также предложен слитый полипептид, содержащий все три менингококковых полипептида fHbp v1, v2 и v3, где варианты последовательностей fHbp расположены в порядке v2-v3-v1 от N- к С-концу. В предпочтительном воплощении слитый полипептид fHbp имеет аминокислотную последовательность формулы NH₂-A-[-X-L]₃-В-COOH, где каждый X представляет собой различный вариант последовательности fHbp, L представляет собой аминокислотную последовательность возможного линкера, А представляет собой возможную N-концевую аминокислотную последовательность и В представляет собой возможную С-концевую аминокислотную последовательность.

Компонент, представляющий собой полипептид fHbp v1 слитого полипептида по изобретению, представляет собой либо мутантный полипептид fHbp v1.13, либо мутантный полипептид fHbp v1.13, описанный выше.

Компоненты, представляющие собой полипептиды fHbp v2 и v3 по изобретению, предпочтительно представляют собой мутантные полипептиды v2 и v3, обладающие улучшенной стабильностью и пониженной способностью связываться с hfH по сравнению с полипептидами v2 и v3 дикого типа. Как объяснялось выше, уменьшение связывания fHbp с hfH предпочтительно, поскольку предотвращает образование между fHbp и hfH защитных комплексов, которые способны маскировать эпитопы fHbp, и, таким образом, повышает иммуногенность полипептидного антигена.

Авторы изобретения ранее обнаружили остатки в последовательностях v2 и v3, которые могут быть модифицированы для увеличения стабильности полипептида, а также для уменьшения связывания с hfH. Эти мутированные последовательности v2 и v3 подробно описаны в WO 2015/128480.

Полноразмерный fHbp v2 дикого типа из штамма 2996 имеет следующую аминокислотную последовательность (лидерная последовательность показана жирным шрифтом, а полиглициновая последовательность подчеркнута):

МNR**T**AF**C**CL**S**L**T**AA**L**IL**T**AC**S**SGGGG**V**AADIGAGLADAL**T**APLDHKDKSLQSL**T**LD
QSVRKNEKLK**L**AAQGA**E**KTYNGD**S**LN**T**GK**L**KNDK**V**SRFD**F**IRQ**I**EV**D**G**Q**L**L**IT**L**ES**G**E
FQ**I**Y**Q**D**H**SA**V**VA**L**Q**I**E**K**IN**N**PD**K**ID**S**LN**Q**RS**F**LV**S**GL**G**GE**H**T**A**FN**Q**LP**D**G**K**AE**Y**NG
K**A**F**S**SD**D**AG**G**K**L**TY**T**ID**F**AA**K**Q**G**H**G**K**I**E**H**L**K**T**P**E**Q**N**V**E**L**AA**E**L**K**AD**E**K**S**H**A**V**I**L**G**D
TRY**G**SE**E**K**G**TY**H**L**A**LF**G**DR**A**Q**E**I**A**GS**A**TV**K**IG**E**K**V**HE**I**GI**A**G**K**Q (SEQ ID NO: 10)

У зрелого липопротеина отсутствуют первые 19 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 10:

CSSGGGG**V**AADIGAGLADAL**T**APLDHKDKSLQSL**T**LDQSVRKNEKLK**L**AAQGA**E**K**T**
Y**G**NGD**S**LN**T**GK**L**KNDK**V**SRFD**F**IRQ**I**EV**D**G**Q**L**L**IT**L**ES**G**EFQ**I**Y**Q**D**H**SA**V**VA**L**Q**I**E**K**IN
N**P**DK**I**D**S**LN**Q**RS**F**LV**S**GL**G**GE**H**T**A**FN**Q**LP**D**G**K**AE**Y**NG**K**AF**S**SD**D**AG**G**K**L**TY**T**ID**F**AA
K**Q**G**H**G**K**I**E**H**L**K**T**P**E**Q**N**V**E**LAA**E**L**K**AD**E**K**S**H**A**V**I**L**G**DTRY**G**SE**E**K**G**TY**H**L**A**LF**G**DR**A**
Q**E**I**A**GS**A**TV**K**IG**E**K**V**HE**I**GI**A**G**K**Q (SEQ ID NO: 11)

У ΔG формы SEQ ID NO: 10 отсутствуют первые 26 аминокислот:

VAADIGAGLADAL**T**APLDHKDKSLQSL**T**LDQSVRKNEKLK**L**AAQGA**E**KTYNGD**S**L
N**T**G**L**K**N**D**K**V**S**RFD**F**IRQ**I**EV**D**G**Q**L**L**IT**L**ES**G**EFQ**I**Y**Q**D**H**SA**V**VA**L**Q**I**E**K**IN**N**PD**K**ID**S**L
IN**Q**RS**F**LV**S**GL**G**GE**H**T**A**FN**Q**LP**D**G**K**AE**Y**NG**K**AF**S**SD**D**AG**G**K**L**TY**T**ID**F**AA**K**Q**G**H**G**K**I**
E**H**L**K**T**P**E**Q**N**V**E**L**AA**E**L**K**AD**E**K**S**H**A**V**I**L**G**DTRY**G**SE**E**K**G**TY**H**L**A**LF**G**DR**A**Q**E**I**A**GS**A**
TV**K**IG**E**K**V**HE**I**GI**A**G**K**Q (SEQ ID NO: 12)

В предпочтительном воплощении слитый полипептид по изобретению содержит мутантный полипептид fHbp v2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 12, при условии, что аминокислотная последовательность fHbp v2 включает мутацию с заменой одного или более чем одного из остатков S32 и L123 последовательности SEQ ID NO: 12. Предпочтительно замены представляют собой S32V и L123R.

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. Предпочтительно оно равно 80 (т.е. аминокислотная последовательность мутантного fHbp v2 идентична по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 12), более предпочтительно равно 85, более предпочтительно равно 90 и более предпочтительно 95.

В некоторых воплощениях полипептид fHbp v2, включенный в слитый белок по изобретению, укорочен относительно SEQ ID NO: 12. По сравнению со зрелой последовательностью дикого типа SEQ ID NO: 12 уже укорочена на N-конце и, в том числе, не включает полиглициновую последовательность (сравните SEQ ID NO: 11 и 12), однако SEQ ID NO: 12 может быть укорочена на С-конце и/или дополнительно укорочена на N-конце.

В предпочтительном воплощении полипептид fHbp v2, включенный в слитый белок, содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

Полипептид fHbp v2, включенный в слитый белок по изобретению, имеет более высокую стабильность в тех же условиях эксперимента, чем такой же полипептид без отличий в последовательности по

остаткам S32 и L123, например, более высокую стабильность, чем менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 10. Мутация S32V стабилизирует структуру благодаря возникновению благоприятных гидрофобных взаимодействий. Мутация L123R устраняет связывание fHb в результате появления нестыковок с fHb и препятствующих связыванию зарядов.

Улучшение стабильности можно оценивать при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), например, как обсуждается Johnson (2013), Arch. Biochem. Biophys. 531:100-9 и Bruylants et al., Current Medicinal Chemistry, 2005; 12:2011-20. DSC ранее применяли для оценки стабильности fHbp v2 (Johnson et al. PLoS Pathogen, 2012; 8:e1002981). Подходящие условия для оценки стабильности при помощи DSC могут заключаться в использовании 20 мкМ полипептида в буферном растворе (например, 25 мМ Tris) с pH между 6 и 8 (например, 7-7,5) с 100-200 мМ NaCl (например, 150 мМ).

Об увеличении стабильности свидетельствует повышение температуры фазового перехода (T_m) по меньшей мере для одного пика на кривой DSC по меньшей мере на 5°C, например, по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35°C или более по сравнению с диким типом. При разворачивании fHbp дикого типа методом DSC обнаруживаются два пика (один для N-концевого домена, а другой для C-концевого домена) и, когда полипептид v2, включенный в слитый белок по изобретению, включает в себя оба таких домена, "увеличение стабильности" относится к повышению T_m для N-концевого домена по меньшей мере на 5°C. T_m для N-концевого домена в последовательностях v2 дикого типа может составлять 40°C или даже ниже (Johnson et al., (2012), PLoS Pathogen, 8: e1002981), тогда как C-концевые домены могут иметь T_m 80°C или выше. Таким образом, аминокислотная последовательность fHbp v2, включенного в слитый белок по изобретению предпочтительно имеет N-концевой домен с T_m по меньшей мере 45°C, например, ≥ 50 , ≥ 55 , ≥ 60 , ≥ 65 , ≥ 70 , ≥ 75 или даже $\geq 80^\circ\text{C}$.

Полноразмерный fHbp v3 дикого типа из штамма M1239 имеет следующую аминокислотную последовательность (лидерная последовательность показана жирным шрифтом, а полиглициновая последовательность подчеркнута):

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLK
SLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAETFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQ
TITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPG
GKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKS
HAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID
NO: 13)

У зрелого липопротеина отсутствуют первые 19 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 13:

CSSGGGGSGGGV**AADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQG**
AEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAV
ALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGL
HYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH
LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 14)

У ΔG формы SEQ ID NO: 13 отсутствуют первые 31 аминокислоты (т.е. отсутствует сигнальная последовательность и полиглициновая последовательность):

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAETFKAGDKDN
SLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKT
DSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYG
RIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGS
ATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 15)

В предпочтительном воплощении слитый полипептид по изобретению содержит мутантный полипептид fHbp v3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере k% идентичность последовательности SEQ ID NO: 15, при условии, что аминокислотная последовательность fHbp v3 включает мутацию с заменой одного или более чем одного из остатков S32 и L126 последовательности SEQ ID NO: 15. Предпочтительно замены представляют собой S32V и L126R.

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. Предпочтительно оно равно 80 (т.е. аминокислотная последовательность мутантного fHbp v2 идентична по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 15) и более предпочтительно равно 85, более предпочтительно равно 90 и более предпочтительно 95.

В некоторых воплощениях полипептид fHbp v3, включенный в слитый белок по изобретению, укорочен относительно SEQ ID NO: 15. По сравнению со зрелой последовательностью дикого типа SEQ ID NO: 15 уже укорочена на N-конце и, в том числе, не включает полиглициновую последовательность (сравните SEQ ID NO: 14 и 15), однако SEQ ID NO: 15 может быть укорочена на C-конце и/или дополнительно укорочена на N-конце.

В предпочтительном воплощении полипептид fHbp v3, включенный в слитый белок по изобретению, содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

Полипептид fHbp v3, включенный в слитый белок по изобретению, имеет в тех же условиях эксперимента более высокую стабильность, чем такой же полипептид без отличий в последовательности по

остаткам S32 и L126, например, более высокую стабильность, чем менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 13. Мутация S32V стабилизирует структуру благодаря возникновению благоприятных гидрофобных взаимодействий. Мутация L126R устраняет связывание fHb в результате появления нестыковок с fHb и препятствующих связыванию зарядов.

Улучшение стабильности можно оценивать при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), например, как обсуждается Johnson (2013), Arch. Biochem. Biophys. 531:100-9 и Bruylants et al. (2005), Current Medicinal Chemistry, 12:2011-20. DSC ранее применяли для оценки стабильности fHbp v3 (van der Veen et al. (2014), Infect. Immun. PMID, 24379280). Подходящие условия для оценки стабильности при помощи DSC могут заключаться в использовании 20 мкМ полипептида в буферном растворе (например, 25 мМ Tris) с pH между 6 и 8 (например, 7-7,5) с 100-200 мМ NaCl (например, 150 мМ).

Об увеличении стабильности свидетельствует повышение температуры фазового перехода (T_m) по меньшей мере для одного пика на кривой DSC по меньшей мере на 5°C, например, по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35°C или более по сравнению с диким типом. При разворачивании fHbp дикого типа методом DSC обнаруживаются два пика (один для N-концевого домена, а другой для C-концевого домена) и, когда полипептид v3, включенный в слитый белок по изобретению, включает в себя оба таких домена, "увеличение стабильности" относится к повышению T_m для N-концевого домена по меньшей мере на 5°C. T_m для N-концевого домена в последовательностях v3 дикого типа может составлять 60°C или ниже (Johnson et al. (2012), PLoS Pathogen, 8:e1002981), тогда как C-концевые домены могут иметь T_m 80°C или выше. Таким образом, аминокислотная последовательность мутантного fHbp v3 по изобретению предпочтительно имеет N-концевой домен с T_m по меньшей мере 65°C, например, ≥ 70 , ≥ 75 или даже ≥ 80 °C.

Как описано выше, в предпочтительном воплощении слитый полипептид fHbp имеет аминокислотную последовательность формулы $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L}]_3\text{-B-COOH}$, где каждый X представляет собой различный вариант последовательности fHbp, а L представляет собой аминокислотную последовательность возможного линкера. В предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность линкера "L" представляет собой глициновый или глицин-сериновый полимерный линкер. Примеры линкеров включают "GGSG", "GGSGG", "GSGSG", "GSGGG", "GGGSG", "GSSSG" и "GSGGGG", но не ограничиваются указанными. Специалисту в области техники будут очевидны другие подходящие глициновые или глицин-сериновые полимерные линкеры. В предпочтительном слитом полипептиде по изобретению последовательности v2 и v3 и последовательности v3 и v1 соединены глицин-сериновым полимерным линкером "GSGGGG".

В предпочтительном воплощении слитый полипептид по изобретению содержит или состоит из одной из следующих аминокислотных последовательностей (глицин-сериновые линкерные последовательности подчеркнуты, а мутированные остатки указаны жирным шрифтом):

fHbp 23S_1.13_E211A/E232A (SEQ ID NO: 18)

VAADIGAGLADALTA~~PLD~~HKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD~~FIR~~QIEVDGQ~~L~~LITLESGEFQIYKQDHS~~AV~~VALQIEKINNPDKIDSLNQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKA~~EY~~HGKAFSSDDAGGKLT~~Y~~TIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT~~Y~~HLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QSGGGG**VAADIGTGLADALTA~~PLD~~HKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLT~~L~~SAQGAEKTFKAGDKD~~NSL~~NTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKA~~EY~~HGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQYGRIEHLK~~T~~LEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT~~Y~~HLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QSGGGG**VAADIGAGLADALTA~~PLD~~HKDKGLQSLTLDQSVRNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD~~FIR~~QIEVDGKLTLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGK~~M~~VAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLT~~Y~~TIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYSLGIFGGAQEVAGSAAVETANGIHHLAAKQ

fHbp 23S_1.13_E211A/S216R (SEQ ID NO: 19)

VAADIGAGLADALTA~~PLD~~HKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD~~FIR~~QIEVDGQ~~L~~LITLESGEFQIYKQDHS~~AV~~VALQIEKINNPDKIDSLNQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKA~~EY~~HGKAFSSDDAGGKLT~~Y~~TIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT~~Y~~HLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QSGGGG**VAADIGTGLADALTA~~PLD~~HKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLT~~L~~SAQGAEKTFKAGDKD~~NSL~~NTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKA~~EY~~HGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQYGRIEHLK~~T~~LEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT~~Y~~HLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QSGGGG**VAADIGAGLADALTA~~PLD~~HKDKGLQSLTLDQSVRNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD~~FIR~~QIEVD

GKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKL
PKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEK
RHAVISGSVLYNQDAKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

fHbp_23S_1.15_S231R (SEQ ID NO: 20)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSL
TGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLIN
QRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHL
KTPQENVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIAGKQGS~~GGG~~VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTL
SAQGAETKFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNH
AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG
RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKLEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH
LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS~~GGG~~VAADIGAGLADALTAPLDHK
DKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQAERTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFIRQIEV
DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMOVAKRQFRIGDIVGEHTSFGK
LPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPD
EKHHAVISGSVLYNQAEKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

fHbp_23S_1.15_E214A/S219R (SEQ ID NO: 21)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSL
TGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLIN
QRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHL
KTPQENVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIAGKQGS~~GGG~~VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTL
SAQGAETKFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNH
AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG
RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKLEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH
LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS~~GGG~~VAADIGAGLADALTAPLDHK
DKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQAERTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFIRQIEV
DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMOVAKRQFRIGDIVGEHTSFGK
LPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPD
EKHHAVISGSVLYNQAAKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

fHbp_23S_1.15_E214A/E235A (SEQ ID NO: 22)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSL
TGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNPDKIDSLIN
QRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHL
KTPQENVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIAGKQGS~~GGG~~VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTL
SAQGAETKFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNH
AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG
RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKLEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH
LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS~~GGG~~VAADIGAGLADALTAPLDHK
DKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQAERTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFIRQIEV
DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMOVAKRQFRIGDIVGEHTSFGK
LPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPD
EKHHAVISGSVLYNQAAKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

В предпочтительном воплощении слитый полипептид по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В альтернативном воплощении слитый полипептид по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

После введения животному-хозяину, предпочтительно млекопитающему и более предпочтительно человеку, слитый полипептид по изобретению может вызывать выработку антител, которые способны распознавать менингококковые полипептиды fHbp дикого типа, в частности полипептиды с последовательностями SEQ ID NO: 31, 32, 10 и/или 13. В идеальном варианте такие антитела являются бактерицидными (см. ниже).

Как описано выше, в предпочтительном воплощении слитый полипептид fHbp по изобретению имеет аминокислотную последовательность формулы NH₂-A-[-X-L]₃-B-COOH, где каждый X представляет собой различный вариант последовательности fHbp; А представляет собой возможную N-концевую аминокислотную последовательность. В предпочтительном воплощении слитые полипептиды, описанные в данном документе, дополнительно содержат следующую N-концевую аминокислотную последова-

тельность, которая предпочтительна для обеспечения хорошей экспрессии слитого белка: MGPDSRLQRR (SEQ ID NO: 34).

Любой из описанных в данном документе слитых белков (например, SEQ ID NO: 18-22, 29 и 30) может быть модифицирован, чтобы включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 на N-конце слитого полипептида, т.е. аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 34 добавляется к N-концу компонента fHbp v2 слитого полипептида.

Бактерицидные ответы.

Предпочтительные v1.13, v1.15 и/или слитые пептиды по изобретению могут вызывать выработку антител, которые являются бактерицидными в отношении менингококков. Ответ в виде выработки бактерицидных антител удобно определять у мышей, и он служит индикатором эффективности вакцины (например, см. примечание 14 в документе Pizza et al. (2000), *Science*, 287:1816-1820; а также WO 2007/028408).

Полипептиды по первому воплощению изобретения предпочтительно могут вызывать ответ в виде выработки антител, которые являются бактерицидными в отношении штамма *N. meningitidis*, экспрессирующего последовательность v1.13 fHbp.

Предпочтительные полипептиды по первому воплощению изобретения могут вызывать у мышей выработку антител, которые в сывороточном бактерицидном тесте являются бактерицидными в отношении штамма *N. meningitidis*, экспрессирующего последовательность v1.13 fHbp.

Полипептиды по второму воплощению изобретения предпочтительно могут вызывать ответ в виде выработки антител, которые являются бактерицидными в отношении штамма *N. meningitidis*, экспрессирующего последовательность v1.15 fHbp.

Предпочтительные полипептиды по второму воплощению изобретения могут вызывать у мышей выработку антител, которые в сывороточном бактерицидном тесте являются бактерицидными в отношении штамма *N. meningitidis*, экспрессирующего последовательность v1.15 fHbp.

Например, иммуногенная композиция, содержащая указанные полипептиды, может обеспечивать бактерицидный титр сыворотки $\geq 1:4$ при исследовании с человеческим комплементом, как предложено Goldschneider [Goldschneider et al. (1969), *J. Exp. Med.* 129:1307-26, Santos et al. (2001), *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8:616-23, и Frasci et al. (2009), *Vaccine*, 27S:B112-6] и/или обеспечивать бактерицидный титр сыворотки $\geq 1:128$ при использовании кроличьего комплемента.

Полипептиды.

Полипептиды по изобретению могут быть получены различными способами, например при помощи химического синтеза (по меньшей мере, частично), при помощи разрезания более длинных полипептидов протеазами, при помощи трансляции РНК, при помощи очистки из культуры клеток (например, при рекомбинантной экспрессии или из культуры *N. meningitidis*) и т.д. Гетерологичная экспрессия в хозяине *E. coli* является предпочтительным способом экспрессии.

Полипептиды по изобретению в идеальном варианте имеют длину по меньшей мере 100 аминокислот, например, 150 аминокислот, 175 аминокислот, 200 аминокислот, 225 аминокислот или более. Они включают последовательность мутантного fHbp v1, v2 и/или v3, и последовательность мутантного fHbp v1, v2 и/или v3, аналогично, должна быть длиной по меньшей мере 100 аминокислот, например, 150 аминокислот, 175 аминокислот, 200 аминокислот, 225 аминокислот или более.

В природе fHbp является липопротеином *N. meningitidis*. Также было обнаружено его липидирование при экспрессии в *E. coli* с его нативной лидерной последовательностью или с гетерологичными лидерными последовательностями. Полипептиды по изобретению могут иметь N-концевой остаток цистеина, который может быть липидирован, например содержать пальмитоильную группу, как правило, образуя трипальмитоил-S-глицерил-цистеин. В других воплощениях полипептиды не являются липидированными.

Полипептиды предпочтительно получают по существу в чистой или по существу выделенной форме (т.е. по существу свободными от других полипептидов нейссерии или клетки-хозяина). Как правило, полипептиды находятся в неестественном окружении, например, они отделены от их естественного окружения. В некоторых воплощениях полипептиды находятся в композиции, обогащенной полипептидом по сравнению с исходным материалом. Так, предложен очищенный полипептид, где очистка означает, что полипептид находится в составе композиции, которая по существу свободна от других экспрессированных полипептидов, где "по существу свободна" означает, что более чем 50% (например, ≥ 75 , ≥ 80 , ≥ 90 , ≥ 95 или $\geq 99\%$) всех полипептидов в составе композиции являются полипептидом по изобретению.

Полипептиды могут быть в различной форме (например, нативной, слитой, гликозилированной, негликозилированной, липидированной, с дисульфидными мостиками и т.д.).

Если полипептид по изобретению получают при помощи трансляции в биологическом хозяине, необходим стартовый кодон, который обеспечит N-концевой метионин у большинства хозяев. Так, полипептид по изобретению будет, по меньшей мере на стадии формирования, включать остаток метионина, расположенный в 5' направлении от указанной последовательности SEQ ID NO.

Расщепление формирующейся последовательности означает, что аминокислотная последователь-

ность мутантного fHbp v1, v2 или v3 может сама обеспечивать N-конец полипептида. Однако, в других воплощениях полипептид по изобретению может включать N-концевую последовательность, расположенную в 5' направлении от аминокислотной последовательности fHbp v1, v2 или v3. В некоторых воплощениях полипептид имеет на N-конце один метионин, непосредственно за которым расположена аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1, v2 или v3; в других воплощениях может применяться более длинная расположенная в 5' направлении последовательность. Такая расположенная в 5' направлении последовательность может быть короткой (т.е. 40 аминокислот или менее, т.е. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают лидерные последовательности для направления транспорта белков или короткие пептидные последовательности, которые облегчают клонирование или выделение (например, гистидиновые метки, т.е. His_n, где n=4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более). Специалистам в области техники будут очевидны другие подходящие N-концевые аминокислотные последовательности.

Полипептид по изобретению может также включать аминокислоты, расположенные в 3' направлении от аминокислотной последовательности мутантного fHbp v1, v2 или v3. Такие C-концевые удлинения могут быть короткими (т.е. 40 аминокислот или менее, т.е. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают последовательности для направления транспорта белков, короткие пептидные последовательности, которые облегчают клонирование или выделение (например, содержащие гистидиновые метки, т.е. His_n, где n=4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) или последовательности, которые улучшают стабильность полипептида. Специалистам в области техники будут очевидны другие подходящие C-концевые аминокислотные последовательности.

В некоторых воплощениях изобретение не охватывает полипептиды, которые включают гистидиновую метку (ср. Johnson et al. (2012), PLoS Pathogen 8:e1002981, и Rajon et al. (2012), Infect. Immun. 80:2667-77) и, в частности, гексагистидиновую метку на C-конце.

Термин "полипептид" относится к аминокислотным полимерам любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и прерываться неаминокислотами. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным или искусственным образом; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или любой другой манипуляцией или модификацией, например, такой как конъюгирование с компонентом-меткой. Определение также охватывает, например, полипептиды, содержащие один или более чем один аналог аминокислот (включая, например, аминокислоты, не встречающиеся в природе, и т.д.), а также другие модификации, известные в области техники. Полипептиды могут быть одноцепочечными или состоять из нескольких ассоциированных цепей.

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

Полипептиды по изобретению могут содержать детектируемую метку, например, радиоактивную метку, флуоресцентную метку или биотиновую метку. Это особенно полезно в методах иммунологического анализа.

Полипептиды по изобретению обычно состоят из искусственной аминокислотной последовательности, а именно, последовательности, которая отсутствует в менингококках природного происхождения.

Аффинность к фактору H можно количественно оценить при помощи поверхностного плазмонного резонанса (например, как описано Schneider et al. (2009), Nature, 458:890-5) с иммобилизованным человеческим fH. Предпочтительны мутации, приводящие к уменьшению аффинности (например, увеличение константы диссоциации K_D) по меньшей мере в 10 раз и в идеальном варианте по меньшей мере в 100 раз (по сравнению с таким же пептидом, но без мутации, при проведении эксперимента в тех же самых условиях).

Нуклеиновые кислоты.

В четвертом аспекте изобретения предложена плазида или иная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный полипептид fHbp v1.13, мутантный полипептид fHbp v1.15 или слитый полипептид, определенные выше.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть получены различными способами, например при помощи химического синтеза (например, фосфорамидитного синтеза ДНК) целиком или частично, при помощи разрезания более длинных нуклеиновых кислот нуклеазами (например, рестрикционных ферментов), при помощи объединения более коротких нуклеиновых кислот или нуклеотидов (например, с применением лигаз или полимераз), из геномных библиотек или библиотек кДНК и т.д.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть в различной форме, например одноцепочечные, двухцепочечные, векторы, праймеры, зонды, меченые, немеченные и т.д.

Предпочтительные нуклеиновые кислоты по изобретению находятся в выделенной или по существу выделенной форме.

Термин "нуклеиновая кислота" охватывает ДНК и РНК, а также их аналоги, такие, которые содержат модифицированные остовы, а также пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) и т.д.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть мечеными, например, радиоактивной или флуоресцентной меткой.

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

Клетки-хозяева.

В пятом аспекте изобретения предложена клетка-хозяин, трансформированная плазмидой, содержащей нуклеотидные последовательности по изобретению, описанные выше.

Клетка-хозяин по изобретению предпочтительно представляет собой бактерию, которая экспрессирует полипептид по изобретению. Бактерия может, например, представлять собой менингококк или *E. coli*. Бактерия может конститутивно экспрессировать полипептид, но в некоторых воплощениях экспрессия может быть под контролем индуцибельного промотора. Бактерия может сверхэкспрессировать полипептид (ср. WO 2006/081259). В идеальном варианте экспрессия полипептида не подвержена фазовой вариации.

Клетка может представлять собой бактерию менингококк, такую как бактерия менингококк, имеющая пониженную экспрессию или нокаут *mltA*, а также возможно имеющая пониженную экспрессию или нокаут: (i) по меньшей мере одного гена, задействованного в придании токсичности части LPS, представляющей собой липид A, в частности *lpx11*; и/или (ii) по меньшей мере одного гена, задействованного в синтезе или экспортировании капсулярного полисахарида, в частности *synX* и/или *ctrA*.

Везикулы.

В шестом аспекте изобретения предложена везикула наружной мембраны, полученная из клетки-хозяина по изобретению, в частности из менингококковой клетки-хозяина.

Везикулы, полученные из клетки-хозяина по изобретению, предпочтительно включают полипептид по изобретению, который должен находиться в иммуннодоступной форме в везикулах, т.е. антитело, которое может связываться с очищенным полипептидом по изобретению, должно также быть способным связываться с полипептидом, находящимся в везикулах.

Такие мембранные везикулы включают любые протеолипосомные везикулы, полученные при разрушении или шелушении наружной мембраны менингококка, с образованием из них везикул, которые включают белковые компоненты наружной мембраны. Таким образом, термин охватывает везикулы наружной мембраны (OMV; иногда обозначаемые "пузырьками"), микровезикулы (MV [WO 02/09643]) и "нативные OMV" ("NOMV" [Katial et al. (2002), *Infect. Immun.* 70:702-707]).

MV и NOMV представляют собой мембранные везикулы естественного происхождения, которые образуются спонтанно при росте бактерий и высвобождаются в культуральную среду. MV могут быть получены при культивировании нейссерий в жидкой культуральной среде, отделении целых клеток от более мелких MV в жидкой культуральной среде (например, путем фильтрации или центрифугирования при низкой скорости для осаждения только клеток, но не более мелких везикул) и дальнейшего сбора MV из обедненной клетками среды (например, путем фильтрации, дифференциальной преципитации или агрегации MV, центрифугирования при высокой скорости для осаждения MV). Штаммы для применения в получении MV, как правило, можно выбирать на основании количества MV, полученных в культуре, например, US 6180111 и WO 01/34642 описывают *Neisseria* с высокой продукцией MV.

OMV получают из бактерий искусственным способом, и их можно получать посредством обработки детергентами (например, дезоксихолатом) или способами без детергентов (например, см. WO 2004/019977). Методики получения OMV включают обработку бактерий детергентом на основе солей желчных кислот (например, солей литохолевой кислоты, хенодезоксихолевой кислоты, урсодезоксихолевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, холевой кислоты, урсохолевой кислоты и т.д., с дезоксихолатом натрия [см. EP 0011243 и Fredriksen et al. (1991), *NIPH Ann.* 14(2):67-80], которая предпочтительна для обработки *Neisseria*) при значениях pH достаточно высоких, чтобы не вызвать преципитацию детергента [WO 01/91788]. Другие методики можно осуществлять по существу в отсутствие детергента [WO 2004/019977] с применением таких методик, как воздействие ультразвука, гомогенизация, микрофлюидизация, кавитация, осмотический шок, измельчение, френч-пресс, блендирование и т.д. Способы без применения или с применением малых количеств детергента могут сохранять полезные антигены, такие как *NspA* и *iHbp*. Так, в способе можно применять буфер для экстрагирования OMV приблизительно с 0,5% дезоксихолата или менее, например, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,1%, <0,05% или 0.

Эффективный процесс для получения OMV описан в WO 2005/004908 и включает ультрафильтрацию первичных OMV, вместо высокоскоростного центрифугирования. Процесс может включать стадию ультрацентрифугирования после проведения ультрафильтрации. OMV также можно очищать с применением процесса двухстадийной гель-фильтрации, описанного в WO 2011/036562.

Везикулы для применения по изобретению могут быть получены из любого штамма менингококка. Везикулы обычно будут происходить из штамма серогруппы B, но возможно их получать из других серогрупп, нежели B, таких как A, C, W135 или Y (например, WO 01/91788 описывает процесс для серо-

группы А). Штамм может быть любого серотипа (например, 1, 2а, 2b, 4, 14, 15, 16 и т.д.), любого серо-подтипа и любого иммунотипа (например, L1; L2; L3; L3,3,7; L10 и т.д.). Менингококки могут быть любой подходящей линией, включая гиперинвазивные и гипервирулентные линии, например любой из следующих семи гипервирулентных линий: подгруппы I; подгруппы III; подгруппы IV-1; комплекса ET-5; комплекса ET-37; кластера А4; линии 3.

Помимо кодирования полипептида по изобретению бактерии по изобретению могут иметь одну или более чем одну из следующих модификаций. Например, они могут иметь модифицированный ген *fur* [WO 98/56901]. Может быть повышена экспрессия *nspA* при одновременном нокауте *rogA* и *cps*. Дополнительные мутанты *N.meningitidis* с нокаутом для получения OMV описаны, например, в WO 2004/014417. Claassen et al. (1996), 14(10):1001-8 описывает получение везикул из штаммов, модифицированных для экспрессии шести различных подтипов *PorA*. Можно также применять мутантные *Neisseria* с низкими уровнями эндотоксина, что достигается посредством нокаута ферментов, задействованных в биосинтезе LPS. В изобретении также можно применять мутантные *Neisseria*, модифицированные для уменьшения или выключения экспрессии по меньшей мере одного гена, задействованного в придании токсичности части LPS, представляющей собой липид А, в частности, гена *lpx11* [Fisseha et al. (2005), Infect. Immun. 73:4070-80]. Аналогично, в изобретении также можно применять мутантные *Neisseria*, модифицированные для уменьшения или выключения экспрессии по меньшей мере одного гена, задействованного в синтезе или экспортировании капсулярного полисахарида, в частности генов *synX* и/или *ctrA*. Все эти или другие мутанты могут применяться в изобретении.

Таким образом, штамм, применяющийся по изобретению, в некоторых воплощениях может экспрессировать более одного подтипа *PorA*. Ранее были сконструированы 6-валентные и 9-валентные штаммы с *PorA*. Штамм может экспрессировать *PorA* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 подтипов: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1 и/или P1.18-1,3,6. В других воплощениях штамм может иметь пониженную экспрессию *PorA*, например, когда количество *PorA* снижено по меньшей мере на 20% (например, ≥ 30 , $\geq 4\%$, ≥ 50 , ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 , $\geq 95\%$ и т.д.) по сравнению с уровнями у штаммов дикого типа (например, по сравнению со штаммом H44/76) или даже произведен его нокаут.

В некоторых воплощениях штамм может сверхэкспрессировать некоторые белки (по сравнению с соответствующим штаммом дикого типа). Например, штаммы могут сверхэкспрессировать *NspA*, белок 287 [WO 01/52885], *fHbp* [WO 2006/081259] (включая *fHbp* по изобретению), *TbpA* и/или *TbpB* [WO 00/25811], *Cu,Zn-супероксиддисмутаза*, *HmbR* и т.д.

Ген, кодирующий полипептид по изобретению, может быть интегрирован в бактериальную хромосому или может находиться в эписомной форме, например, в составе плазмиды.

Предпочтительно для получения везикул менингококка может быть генетически модифицирован, с таким расчетом, чтобы фазовая вариация экспрессии полипептида отсутствовала. Способы уменьшения или устранения фазовой вариации экспрессии генов у менингококка описаны в WO 2004/015099. Например, ген может быть помещен под контроль конститутивного или индуцибельного промотора, либо мотив ДНК, который отвечает за его фазовую вариацию, может быть удален или замещен.

В некоторых воплощениях штамм может включать одну или более чем одну мутацию, обеспечивающую нокаут и/или сверхэкспрессию, изложенную в документах WO 02/09746, WO 01/09350, WO 02/062378 и WO 2004/014417. Например, согласно инструкциям и номенклатуре, представленных в этих четырех документах, полезные гены для снижения экспрессии и/или нокаута, включают:

(a) *Cps*, *CtrA*, *CtrB*, *CtrC*, *CtrD*, *FrpB*,

GalE, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA*

и/или *TbpB*; (b) *CtrA*, *CtrB*, *CtrC*, *CtrD*, *FrpB*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*,

Opc, *PhoP*, *PilC*, *PmrE*, *PmrF*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* и/или *TbpB*; (c) *ExbB*, *ExbD*,

gmpM, *CtrA*, *CtrB*, *CtrD*, *GalE*, *LbpA*, *LpbB*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*,

TbpA и/или *TbpB*; или (d) *CtrA*, *CtrB*, *CtrD*, *FrpB*, *OpA*, *OpC*, *PilC*, *PorB*, *SiaD*, *SynA*, *SynB*,

SynX и/или *SynC*.

Когда используют мутантный штамм, в некоторых воплощениях он может иметь одну, или более чем одну, или все из следующих характеристик: (i) снижение экспрессии или нокаут *LgtB* и/или *GalE* для укорочения LOS менингококка; (ii) увеличение экспрессии *TbpA*; (iii) увеличение экспрессии *NhhA*; (iv) увеличение экспрессии *Otr85*; (v) увеличение экспрессии *LbpA*; (vi) увеличение экспрессии *NspA*; (vii) нокаут *PorA*; (viii) снижение экспрессии или нокаут *FrpB*; (ix) снижение экспрессии или нокаут *Opa*; (x) снижение экспрессии или нокаут *Opc*; (xi) делецию комплекса генов *cps*. Укороченный LOS может быть таким, который не включает метку сиалил-лакто-N-неотетразы, например, он может представлять собой LOS с дефицитом галактозы. LOS может не иметь α цепи.

В зависимости от штамма менингококка, использованного для получения везикул, они могут включать или не включать нативный антиген *fHbp* штамма (WO 2004/046177).

В одном предпочтительном воплощении менингококка не экспрессирует функциональный белок *MltA*. Как обсуждалось в WO 2006/046143 и Adu-Bobie et al. (2004), Infect. Immun. 72:1914-19, нокаут

MltA (мембраносвязанной литической трансглюкозилазы, также известной как GNA33) у менингококка позволяет получить бактерии, которые спонтанно высвобождают большие количества мембранных везикул в культуральную среду, из которой их можно легко выделить. Например, везикулы можно выделить при помощи процесса двухстадийной гель-фильтрации согласно WO 2011/036562, включающего: (i) первую стадию фильтрации, на которой везикулы отделяют от бактерий на основании различий в их размере, при этом везикулы проходят в фильтрат и (ii) второй стадии фильтрации, на которой везикулы остаются в ретентате. Мутацию MltA (снижение экспрессии или нокаут) применяли в вакцинах "GMMA" [Koeberling et al. (2014), *Vaccine*, 32:2688-95], и ее можно легко комбинировать с дополнительным снижением экспрессии или нокаутом, в частности, по меньшей мере одного гена, задействованного в придании токсичности части LPS, представляющей собой липид A, в частности Ipx11, и/или по меньшей мере одного гена, задействованного в синтезе или экспортировании капсулярного полисахарида, в частности, генов *synX* и/или *ctrA*. GMMA (обобщенные модули для мембранных антигенов) представляют собой генетически обезвреженные OMV, которые получены из штаммов менингококка, которые были генетически модифицированы для высвобождения GMMA с пониженной реактогенностью и повышенной иммуногенностью. При исследовании в тесте активации моноцитов (MAT) GMMA индуцируют меньше провоспалительных цитокинов, чем OMV.

Предпочтительный штамм менингококка для создания "GMMA" вакцины с применением указанного подхода экспрессирует мутантный fHbp v2 и/или мутантный fHbp v3 по изобретению, и экспрессия может находиться под контролем сильных промоторов. Везикулы, высвобождающиеся указанным штаммом, включают мутантные белки fHbp v2 и/или v3 в иммуногенной форме, и в ответ на введение везикул могут вырабатываться бактерицидные антитела, как обсуждалось Koeberling et al. (2014), *Vaccine*, 32:2688-95. Штамм может также экспрессировать fHbp v1 или вместо этого fHbp v1 может быть представлен в виде отдельного рекомбинантного белка в растворимой форме (и fHbp v1 может быть последовательностью дикого типа или мутантной последовательностью, например, мутированной для нарушения его способности связываться с fH, как обсуждалось выше). В изобретении предложены такие штаммы, а также предложены везикулы, которые данные штаммы высвобождают, например, выделенные из культуральной среды после выращивания штаммов. Предпочтительный мутант v2 для экспрессии в этих штаммах имеет мутацию S32 и/или L123, как обсуждалось в данном документе, а предпочтительный мутант v3 для экспрессии в этих штаммах имеет мутацию S32 и/или L126, как обсуждалось в данном документе. Таким образом, везикулы, полученные из менингококков, экспрессирующих такие последовательности мутантных fHbp v2 и v3, являются наиболее предпочтительными иммуногенами для применения в вакцинах по изобретению.

Эффективные промоторы для применения в таких штаммах включают промоторы, описанные в WO 2013/033398 и WO 2013/113917. Например, промотор может представлять собой (а) промотор из гена порина, предпочтительно *porA* или *porB*, в частности из *N.meningitidis*; или (б) промотор гена rRNA (такой как ген 16S rRNA), в частности из *N.meningitidis*. Когда применяют промотор порина менингококка, предпочтительно он происходит из *porA*, и, еще более конкретно, -10 область из промотора гена *porA* менингококка, и/или -35 область промотора гена *porA* менингококка (предпочтительно, где -10 область и -35 область разделены промежуточной последовательностью из 12-20 нуклеотидов и где промежуточная последовательность либо не содержит последовательность поли-G, либо включает последовательность поли-G, имеющую не более восьми последовательных нуклеотидов G). Когда применяют промотор гена rRNA, в частности, он может содержать (i) -10 область промотора гена rRNA менингококка и/или (ii) -35 область промотора гена rRNA менингококка. Также можно применять гибрид из (а) и (б), например, чтобы он имел -10 область из промотора *porA* и -35 область из промотора rRNA (которая может быть консенсусной -35 областью). Таким образом, эффективный промотор может представлять собой промотор, который включает либо (i) -10 область из гена rRNA (в частности, менингококкового) и -35 область из гена *porA* (в частности, менингококкового) или (ii) -10 область из гена *porA* (в частности, менингококкового) и -35 область из гена rRNA (в частности, менингококкового).

Если в везикуле присутствует LOS, возможно обрабатывать везикулу таким образом, чтобы связать ее LOS и белковые компоненты ("внутрипузырьковая" конъюгация [WO 2004/014417]).

Иммуногенные композиции.

Полипептиды по изобретению могут применяться в качестве активных ингредиентов иммуногенных композиций, поэтому в седьмом аспекте изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая мутантный полипептид fHbp v1.13 согласно первому аспекту изобретения, мутантный полипептид fHbp v1.15 согласно второму аспекту изобретения, слитый полипептид согласно третьему аспекту изобретения или везикулу наружной мембраны согласно шестому аспекту изобретения. Указанные иммуногенные композиции могут найти применение в иммунизации млекопитающего, предпочтительно человека против инфекции, вызванной *Neisseria meningitidis*.

В предпочтительном воплощении изобретения в дополнение к полипептидным антигенам по первому, второму или третьему аспектам изобретения иммуногенная композиция по изобретению дополнительно содержит один или более чем один антигенный компонент 4CMenB.

Как описано выше, продукт 4CMen (BEXSERO) содержит препарат OMV эпидемического штамма

менингококка группы В NZ98/254, В:4:P1.7b,4. Такие же OMV обнаруживаются в вакцине MeNZB и обозначаются в данном документе OMVnz. Кроме того, 44CMenB содержит пять менингококковых антигенов: NHBA (287; подвариант 1.2), fHbp (741; подвариант 1.1), NadA (961; подвариант 3.1), GNA1030 (953) и GNA2091 (936). Четыре из этих антигенов находятся в виде слитых белков (слитый белок NHBA-GNA1030 (287-953) и слитый белок GNA2091-fHbp (936-741)).

0,5 мл доза готового продукта 44CMenB составлена таким образом, что содержит 50 мкг каждого из NHBA-GNA1030, NadA и GNA2091-fHbp, адсорбированных на 1,5 мг алюминия гидроксида, служащего адьювантом, и 25 мкг OMV из штамма *N. meningitidis* NZ98/254. Кроме того, каждая 0,5 мл доза препарата содержит 3,125 мг хлорида натрия, 0,776 мг гистидина и 10 мг сахарозы.

В другом предпочтительном воплощении иммуногенная композиция по изобретению дополнительно содержит готовый вакцинный продукт 44CMenB, представленный на рынке под торговым наименованием BEXSERO.

В другом предпочтительном воплощении иммуногенная композиция по изобретению содержит слитый полипептид fHbp последовательности SEQ ID NO: 19 (fHbp 23S_1.13_E211A/S216R) и готовую композицию 44CMenB.

Менингококки серогрупп А, С, W135 и Y.

Композиции по данному изобретению могут также включать антигены капсулярных сахаридов менингококков одной или более чем одной из серогрупп Y, W135, С и А, где антигены конъюгированы с белком(ами)-носителем(ями) и/или являются олигосахаридами. Капсулярные сахариды можно применять в форме олигосахаридов. Их удобно получать посредством фрагментации очищенного капсулярного полисахарида (например, посредством гидролиза), за которым обычно следует выделение фрагментов необходимого размера.

Современные вакцины серогруппы С [Costantino et al.] (1992), Vaccine, 10:691-698, Jones (2001), Curr Opin Investig Drugs, 2:47-49], MENINGITEC и NEISVAC-C) включают конъюгированные сахариды. MENJUGATE и MENINGITEC имеют олигосахаридные антигены, конъюгированные с носителем CRM197, тогда как в NEISVAC-C применяется полноразмерный полисахарид (де-О-ацетилованный), конъюгированный с носителем, представляющим собой столбнячный анатоксин.

Все из вакцинных продуктов, представленных на рынке под торговыми наименованиями MENVEO, MENACTRA и NIMENRIX, содержат конъюгированные капсулярные полисахаридные антигены каждой из серогрупп Y, W135, С и А.

В MENVEO (также известной под непатентованным наименованием как вакцина менингококковая олигосахаридная (группы А, С, Y и W-135), конъюгированная с дифтерийным CRM197) каждый из антигенов А, С, W135 и Y конъюгирован с носителем CRM₁₉₇.

В MENACTRA (также известной под непатентованным наименованием как вакцина менингококковая полисахаридная (группы А, С, Y и W-135), конъюгированная с дифтерийным анатоксином) каждый из антигенов А, С, W135 и Y конъюгирован с носителем, представляющим собой дифтерийный анатоксин.

В NIMENRIX (также известной под непатентованным наименованием как вакцина конъюгированная менингококковая полисахаридная (группы А, С, Y и W-135), каждый из антигенов А, С, W135 и Y конъюгирован с носителем, представляющим собой столбнячный анатоксин.

В предпочтительном воплощении изобретения в дополнение к полипептидным антигенам по первому, второму или третьему аспектам изобретения иммуногенная композиция по изобретению дополнительно содержит один или более чем один конъюгированный капсулярный сахаридный антиген *N. meningitidis* серогрупп А, С, W135 и/или Y.

В предпочтительном воплощении изобретения в дополнение к полипептидным антигенам по первому, второму или третьему аспектам изобретения иммуногенная композиция по изобретению дополнительно содержит готовый продукт 44CMenB наряду с одним или более чем одним конъюгированным капсулярным сахаридным антигеном *N. meningitidis* серогрупп А, С, W135 и/или Y.

В предпочтительном воплощении иммуногенная композиция по изобретению в дополнение к полипептидным антигенам по первому, второму или третьему аспектам изобретения содержит готовый продукт 44CMenB наряду с конъюгированными капсульными сахаридными антигенами *N. meningitidis* каждой из серогрупп А, С, W135 и/или Y, образуя пентавалентную иммуногенную композицию, содержащую антигены против каждого из серотипов менингококка А, В, С, W135 и Y.

В предпочтительных воплощениях композиция включает конъюгаты антигенов А, С, W135 и Y, которые присутствуют в MENVEO, конъюгаты антигенов А, С, W135 и Y, которые присутствуют в MENACTRA, или конъюгаты антигенов А, С, W135 и Y, которые присутствуют в NIMENRIX.

В другом предпочтительном воплощении иммуногенная композиция по изобретению содержит слитый полипептид fHbp последовательности SEQ ID NO: 19 (fHbp 23S_1.13_E211A/S216R), готовый продукт 44CMenB и конъюгаты антигенов А, С, W135 и Y, которые присутствуют в MENVEO.

В альтернативном варианте, иммуногенную композицию по изобретению, содержащую полипептидные антигены по первому, второму или третьему аспектам изобретения, можно вводить совместно с одним или более чем одним из BEXSERO и MENVEO, MENACTRA или NIMENRIX. Предпочтительно

иммуногенную композицию по изобретению вводят совместно с BEXSERO и MENVEO.

Используемый термин "вводят совместно" означает, что различные иммуногенные композиции/вакцины можно вводить либо раздельно, либо в виде комбинации.

Когда вакцины вводят раздельно, их обычно вводят в различные участки, например, одну вакцину в левое предплечье, а вторую вакцину в правое предплечье. Таким образом, две вакцины можно вводить контралатерально (например, в оба предплечья, или обе ноги, или в руку и ногу, расположенные по разные стороны) или ипсилатерально (например, в руку и ногу, расположенные по одну сторону). Хотя вакцины можно вводить раздельно, их вводят по существу в одно и то же время (например, во время той же врачебной консультации или визита к специалисту-медику или в центр вакцинации), например в течение 1 ч.

Однако, скорее выполняют введение в виде комбинации, нежели совместную иммунизацию с раздельным введением. Таким образом, при совместной иммунизации можно применять комбинированную вакцину, т.е. единую композицию, в которой смешаны различные иммуногены. Преимуществом комбинированных вакцин является выполнение меньшего количества инъекций субъекту, что может повысить комплаентность, что является преимуществом в клинической практике.

Применение иммуногенных композиций по изобретению

Иммуногенные композиции по изобретению подходят для применения в медицине, и в частности, могут применяться для иммунизации млекопитающего против инфекции и/или заболевания, вызванного *Neisseria meningitidis*, так что у реципиентов иммуногенной композиции вырабатывается иммунный ответ, который обеспечивает защиту от инфекции и/или от заболевания, вызванного бактериями *Neisseria meningitidis*.

В предпочтительном воплощении иммуногенные композиции по изобретению могут найти применение для иммунизации млекопитающего против инфекции или заболевания, вызванного менингококком В. Однако, в воплощениях изобретения, где антигены менингококка серогруппы В комбинируют с антигенами менингококка других серогрупп (например, антигенами А, С, W и/или Y), иммуногенные композиции могут найти применение для иммунизации млекопитающего против инфекции или заболевания, вызванного менингококком А, В, С, W и/или Y.

Таким образом, иммуногенные композиции по изобретению могут найти применение в способах профилактики для иммунизации субъектов от инфекции и/или заболевания, вызванного *Neisseria meningitidis*. Иммуногенные композиции также можно применять в способах лечения (т.е. для лечения инфекции, вызванной *Neisseria meningitidis*).

В изобретении также предложен способ выработки у млекопитающего иммунного ответа *in vivo* против инфекции, вызванной *Neisseria meningitidis*, включающий введение млекопитающему иммуногенной композиции по изобретению. В изобретении также предложены полипептиды по изобретению для применения в указанных способах.

Иммунный ответ предпочтительно является защитным и предпочтительно включает антитела и/или клеточно-опосредованный иммунитет. Предпочтительно иммунный ответ представляет собой ответ с выработкой бактерицидных антител. Способ может вызывать бустерный ответ. При выработке иммунного ответа *in vivo* млекопитающее может быть защищено против заболевания, вызванного нейссерией (в частности, менингококковой инфекцией).

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

В изобретении предложены полипептиды по изобретению для применения в качестве лекарственных средств (например, в качестве иммуногенных композиций или вакцин) или в качестве реагентов для диагностики. В изобретении также предложено применение нуклеиновых кислот или полипептидов для изготовления лекарственного средства для предупреждения нейссерияльной (например, менингококковой) инфекции у млекопитающего.

Иммунологические композиции по изобретению предпочтительно составлены как вакцинные продукты, которые подходят для терапевтического (т.е. для лечения инфекции) или профилактического (т.е. для предупреждения инфекции) применения. Как правило, вакцины являются профилактическими.

Предпочтительно млекопитающее является человеком. Человек может быть взрослым, подростком или ребенком (например, ребенком ясельного или грудного возраста). Вакцину, предназначенную для детей, также можно вводить взрослым, например, для оценки безопасности, дозировки, иммуногенности и т.д.

Применения и способы особенно эффективны для предупреждения/лечения заболеваний, включающих менингит (в частности, бактериальный, например, менингококковый менингит) и бактериемию, но не ограничивающихся ими. Например, они подходят для активной иммунизации индивидуумов против инвазивной менингококковой инфекции, вызванной *N. meningitidis* (например, серогруппы В).

Защиту от *N. meningitidis* можно оценивать эпидемиологически, например, в клиническом исследовании, однако удобно использовать не прямые методы для подтверждения того, что иммуногенная композиция вызывает у реципиентов ответ с выработкой бактерицидных сывороточных антител (SBA). При

исследовании SBA сыворотку реципиентов композиции инкубируют с бактериями-мишенями (в данном изобретении, *N. meningitidis*) в присутствии комплемента (предпочтительно человеческого комплемента, хотя вместо него часто используют кроличий комплемент) и оценивают цитолиз бактерий при различных разведениях сыворотки для определения активности SBA. Результаты исследования SBA, можно подкрепить, выполнив конкурентный тест SBA для дополнительного косвенного подтверждения иммуногенной активности антигена(ов), представляющего(их) интерес. В конкурентном тесте SBA сыворотку реципиентов иммуногенной композиции, содержащей антиген(ы), предварительно инкубируют с указанным(и) антигеном(ами) и затем инкубируют с бактериями-мишенями в присутствии человеческого комплемента. Затем оценивают цитолиз бактерий, который будет снижаться или отсутствовать, если в ходе фазы предварительной инкубации бактерицидные антитела в сыворотке реципиента связываются с антигенами, представляющими интерес, и, таким образом, становятся недоступными для связывания с поверхностным антигеном бактерий.

Композиция не обязательно должна защищать от каждого штамма *N. meningitidis*, или не обязательно должен быть защищен каждый реципиент композиции. Такая универсальная защита не является общепринятым стандартом в данной области техники. Скорее, обычно оценивают защиту против панели референтных лабораторных штаммов, зачастую выбираемых отдельно для каждой страны и, возможно, варьирующих с течением времени, и исследуют в популяции реципиентов.

Предпочтительные композиции по изобретению могут обеспечивать у пациента титр антител, который является превосходящим по показателю серопротекции в отношении каждого антигенного компонента у приемлемого процента людей. Антигены и связанные с ними титры антител, при превышении которых считают, что у хозяина произошла сероконверсия против патогена, хорошо известны, и такие титры опубликованы такими организациями, как ВОЗ. Предпочтительно более 80% статистически значимой выборки субъектов являются сероконвертированными более предпочтительно более 90%, еще более предпочтительно более 93% и наиболее предпочтительно 96-100%.

Иммуногенные композиции содержат иммунологически эффективное количество иммуногена, а при необходимости, и любого другого из иных указанных компонентов.

Под "иммунологически эффективным количеством" понимают, что введение данного количества индивидууму в виде однократной дозы или как составляющей части серии введения, эффективно для лечения или предупреждения.

Термин "предупреждение" означает, что прогрессирование заболевания замедляется и/или прекращается, или что заболевание не начинается. Например, иммунная система субъекта может быть примирована (например, посредством вакцинации) для запуска иммунного ответа и противостояния инфекции, таким образом, что заболевание не начинается. Таким образом, вакцинированный субъект может быть инфицирован, но способен лучше противостоять инфекции, чем контрольный субъект. Данное количество варьирует в зависимости от состояния здоровья и физического состояния индивидуума, подлежащего лечению, от возраста, таксономической группы индивидуума, подлежащего лечению (например, примата, не являющегося человеком, и т.д.), от способности иммунной системы индивидуума синтезировать антитела, от желаемой степени защиты, от состава вакцины, от оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других значимых факторов. Предполагается, что количество будет находиться в относительно широком диапазоне, который можно установить с помощью рутинных исследований. Композицию можно вводить в сочетании с другими иммунорегулирующими агентами.

Эффективность вакцины.

Иммуногенные композиции для применения по данному изобретению предпочтительно обеспечивают эффективность вакцин против по меньшей мере одного штамма *N. meningitidis* по меньшей мере 10%, например, ≥ 20 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 85 , ≥ 90 % или более.

Эффективность вакцин определяют по снижению относительного риска развития менингококкового заболевания у субъектов, которые получают композицию по изобретению, по сравнению с субъектами, которые не получают такую композицию (например, не являются иммунизированными или получают плацебо или отрицательный контроль). Таким образом, число случаев заболеваний, вызванных менингококком, в популяции, иммунизированной по изобретению, сравнивают с числом случаев заболевания в контрольной популяции, которая не была иммунизирована по изобретению, и получают относительный риск, а эффективность вакцины равна 100% минус данное число.

Эффективность вакцин определяют скорее для популяции, чем для индивидуума. Следовательно, это является полезным эпидемиологическим показателем, но не позволяет предсказать индивидуальную защиту. Например, отдельный субъект может подвергнуться воздействию очень большой дозы инфекционного агента или может иметь другие факторы риска, которые делают его более подверженным инфекции, но это не отразится на надежности или практической ценности меры эффективности. Размер популяции, которую иммунизируют по изобретению и в которой определяют эффективность вакцины, в идеальном варианте составляет по меньшей мере 100 и может быть больше, например, по меньшей мере 500 субъектов. Размер контрольной группы также должен быть по меньшей мере 100, например, по меньшей мере 500.

Введение.

Композиции по изобретению, как правило, вводят непосредственно пациенту. Непосредственное введение может осуществляться путем парентеральной инъекции (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно, в интерстициальное пространство ткани) или посредством ректального, перорального, вагинального, поверхностного, трансдермального, интраназального, глазного, ушного, легочного введения или иного нанесения на слизистую оболочку. Предпочтительно внутримышечное введение в бедро или предплечье. Инъекцию можно осуществлять при помощи иглы (например, иглы для подкожного введения), однако в альтернативном варианте можно осуществлять безыгольную инъекцию. Типичная внутримышечная доза составляет приблизительно 0,5 мл.

Нейссерияльные инфекции поражают различные участки организма, поэтому композиции по изобретению можно изготавливать в различных формах. Например, композиции можно изготавливать в виде инъекционных препаратов, как в виде жидких растворов, так и в виде суспензий. Также можно изготавливать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Можно изготавливать композиции для поверхностного нанесения, например, в виде мази, крема или порошка. Можно изготавливать композиции для перорального введения, например, в виде таблеток или капсул, или в виде сиропа (возможно, ароматизированного). Можно изготавливать композиции для введения в легкие, например, в виде ингаляции, с использованием тонкодисперсного порошка или спрея. Можно изготавливать композиции в виде суппозитория или пессария. Можно изготавливать композиции для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Наиболее предпочтительны композиции, подходящие для парентеральной инъекции.

Изобретение можно применять для индукции системного и/или мукозного иммунитета.

В данном описании "доза" композиции представляет собой объем композиции, подходящий для введения субъекту посредством однократной иммунизации. Человеческие вакцины обычно вводят в объеме дозы приблизительно 0,5 мл, хотя можно вводить и дробные дозы (например, детям). Объем дозы может дополнительно варьировать в зависимости от концентрации антигенов в составе композиции.

Кроме того, композиция может быть представлена в виде "многодозового" набора, т.е. в одном контейнере содержится количество композиции, достаточное для нескольких иммунизаций. Многодозовые варианты могут включать консервант или многодозовый контейнер может иметь асептическое приспособление для отбора отдельных доз композиции.

Введение может включать схему с однократным введением дозы, но обычно будет включать схему с многократными введениями доз. Предпочтительна схема по меньшей мере с тремя введениями доз. Подходящие интервалы между примиряющими дозами можно определять рутинными способами, например, составлять от 4 до 16 недель, например, 1 месяц или два месяца. Например, BEXSERO можно вводить в возрасте 2, 4 и 6 месяцев или 2, 3 и 4 месяцев, с возможным четвертым введением дозы в возрасте 12 месяцев.

Субъект, которого иммунизируют, является человеком, который может иметь любой возраст, например, 0-12 месяцев, 1-5 лет, 5-18 лет, 18-55 лет или свыше 55 лет. Предпочтительно субъект, которого иммунизируют, является подростком (например, в возрасте 12-18 лет) или взрослым (18 лет или старше).

Возможно, субъект является подростком или взрослым, в детстве иммунизированным против *N. meningitidis* (например, в возрасте до 12 лет) и получающим бустерную дозу иммуногенной композиции по изобретению.

Когда изобретение относится к "совместной иммунизации", различные иммуногенные композиции/вакцины можно вводить либо по-отдельности, либо в виде комбинации.

Когда вакцины вводят отдельно, их обычно вводят в различные участки, например, одну вакцину в левое предплечье, а вторую вакцину в правое предплечье.

Таким образом, две вакцины можно вводить контралатерально (например, в оба предплечья, или обе ноги, или в руку и ногу, расположенные по разные стороны) или ипсилатерально (например, в руку и ногу, расположенные по одну сторону). Хотя вакцины можно вводить отдельно, их вводят по существу в одно и то же время (например, во время той же врачебной консультации или визита к специалисту-медику или в центр вакцинации), например в течение 1 ч.

Однако скорее выполняют введение в виде комбинации, нежели совместную иммунизацию с отдельным введением. Таким образом, при совместной иммунизации можно применять комбинированную вакцину, т.е. единую композицию, в которой смешаны различные иммуногены. Преимуществом комбинированных вакцин является выполнение меньшего количества инъекций субъекту, что может повысить комплаентность, что является преимуществом в клинической практике.

Компоненты, не являющиеся антигенными.

Иммуногенная композиция по изобретению, как правило, будет включать фармацевтически приемлемый носитель, который может представлять собой любое вещество, которое само не вызывает выработку антител, вредных для пациента, получающего такой композиции, и которое при введении не демонстрирует неспецифической токсичности. Фармацевтически приемлемые носители могут включать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. В таких несущих средах также могут при-

существовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие вещества, буферизирующие вещества для поддержания pH и т.п. Подходящие носители подробно обсуждаются в документе Gennaro (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20- изд., ISBN: 0683306472.

Предпочтительно композиция является стерильной. Предпочтительно она является апиrogenной. Предпочтительно она забуферена, например, имеет pH от 6 до 8, как правило, приблизительно pH 7. Когда композиция содержит соль гидроксида алюминия, предпочтительно использовать гистидиновый буфер [WO 03/009869]. Композиции по изобретению могут быть изотоническими для человека.

Адьюванты, которые можно применять в композициях по изобретению, включают нерастворимые соли металлов, эмульсии масло-в-воде (например, MF59 или AS03, обе содержат сквален), сапонины, нетоксичные производные LPS (такие как монофосфорил липид А или 3-О-деацетилованный монофосфорил липид), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, обезвреженные бактериальные АДФ-рибозилирующие токсины, липосомы, имидазохинолоны или их смеси, но не ограничиваются перечисленным. Другие вещества, которые действуют как иммуностимулирующие агенты, описаны в главе 7 документа Vaccine Design. (1995), под ред. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.

Особенно предпочтительно применение адьювантов алюминия гидроксида и/или алюминия фосфата, и, как правило, полипептиды адсорбируют на эти соли. Указанные соли включают оксигидроксиды и гидроксифосфаты (например, см. главы 8 и 9 документа Vaccine Design. (1995), под ред. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum). Соли могут принимать любую подходящую форму (например, гелевую, кристаллическую, аморфную и т.д.).

Дополнительные антигенные компоненты.

Иммуногенные композиции по изобретению могут включать антигены для иммунизации против других заболеваний или инфекций. Например, композиция может включать один или более чем один из следующих антигенов:

сахаридный антиген из *Streptococcus pneumoniae* [например, Watson (2000), *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:331-332, Rubin (2000), *Pediatr. Clin. North Am.* 47:269-285 и Jedrzejewski (2001), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:187-207];

антиген вируса гепатита А, такой как инактивированный вирус [например, Bell (2000), *Pediatr. Infect. Dis J* 19:1187-1188, Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326];

антиген вируса гепатита В, такой как поверхностные и/или коровые антигены [например, Gerlich et al. (1990), *Vaccine*, 8 Suppl: S3-68 & 79-80];

дифтерийный антиген, такой как дифтерийный анатоксин [например, глава 3 документа *Vaccines* (1988), под ред. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0] e.g. the CRM197 mutant [e.g. Del Giudice et al. (1998), *Molecular Aspects of Medicine*, 19:1-70];

столбнячный антиген, такой как столбнячный анатоксин (например, глава 4 документа *Vaccines* (1988), под ред. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0);

антиген *Bordetella pertussis*, такой как голотоксин возбудителя коклюша (PT) и филаментный гемагглютинин (FHA) *B. pertussis*, возможно также в комбинации с пертактином и/или агглютиногенами 2 и 3 (например, Gustafsson et al. (1996), *N. Engl. J. Med.* 334:349-355, и Rappuoli et al. (1991), *TIBTECH.* 9:232-238);

сахаридный антиген из *Haemophilus influenzae B* [например, Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263];

антигены возбудителя полиомиелита [например, Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308 и Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126], такие как инактивированный вирус полиомиелита;

антигены возбудителей кори, свинки и/или краснухи (например, главы 9, 10 и 11 документа *Vaccines* (1988) под ред. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0);

антигены возбудителя гриппа (например, глава 19 документа *Vaccines* (1988), под ред. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0), такие как поверхностные белки гемагглютинин и/или нейраминидаза;

антиген *Moraxella catarrhalis* [например, McMichael (2000), *Vaccine* 19 Suppl 1: S101-107];

белковый антиген из *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы В) [например, Schuchat (1999), *Lancet*, 353 (9146):51-6, WO02/34771];

сахаридный антиген из *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы В);

антиген *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А) [например, WO 02/34771, Dale (1999), *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13:227-43, Ferretti et al. (2001), *PNAS USA*, 98: 4658-4663];

антиген *Staphylococcus aureus* [например, Kuroda et al. (2001), *Lancet*, 357(9264):1225-1240; см. также с. 1218-1219].

При необходимости можно осуществить детоксикацию токсичных белковых антигенов (например, обезвреживание токсина возбудителя коклюша химическими и/или генетическими способами [Rappuoli et al. (1991), *TIBTECH.* 9:232-238]).

Когда композиция включает дифтерийный антиген, предпочтительно также включение столбнячного антигена и коклюшного антигена. Аналогично, когда включен столбнячный антиген, предпочтительно также включение дифтерийного и коклюшного антигенов. Аналогично, когда включен коклюшный анти-

ген, предпочтительно также включение дифтерийного и столбнячного антигенов. Таким образом, предпочтительны комбинации дифтерийного, столбнячного и коклюшного антигенов.

Сахаридные антигены предпочтительно находятся в форме конъюгатов. В целом, конъюгирование усиливает иммуногенность сахаридов, поскольку превращает их из Т-независимых антигенов в Т-зависимые антигены, таким образом делая возможным примирование для иммунологической памяти. Конъюгация особенно эффективна для вакцин, используемых в педиатрии, и является хорошо известной методикой.

Типичные белки-носители представляют собой бактериальные токсины, такие как дифтерийный или столбнячный токсины или анатоксины или их мутантные формы. Мутант дифтерийного токсина CRM197 [Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)] эффективен и является носителем в вакцине против *Streptococcus pneumoniae*, продающейся под торговым наименованием PREVNAR. Другие подходящие белки-носители включают белковый комплекс наружной мембраны *N. meningitidis* [EP-A-0372501], синтетические пептиды [EP-A-0378881, EP-A-0427347], белки теплового шока [WO 93/17712, WO 94/03208], белки вируса коклюша [WO 98/58668, EP-A-0471177], цитокины [WO 91/01146], лимфокины [WO 91/01146], гормоны [WO 91/01146], факторы роста [WO 91/01146], искусственные белки, содержащие множественные человеческие CD4⁺ Т-клеточные эпитопы различных антигенов патогенного происхождения [Falugi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31:3816-3824], такие как N19 [Baraldo et al. (2004), Infect. Immun. 72(8):4884-7], белок D из *H. influenzae* [EP-A-0594610, Ruan et al. (1990), J. Immunol. 145:3379-3384], пневмолизин [Kuo et al. (1995), Infect. Immun. 63:2706-13] или его нетоксичные производные [Michon et al. (1998), Vaccine. 16:1732-41], поверхностный белок PspA пневмококка [WO 02/091998], белки, захватывающие железо [WO 01/72337], токсин А или В из *C. difficile* [WO 00/61761], рекомбинантный экзобелок А из *P. aeruginosa* (rEPA) [WO 00/33882] и т.д.

Можно применять любую подходящую реакцию конъюгации, при необходимости, с любым подходящим линкером.

Перед конъюгацией обычно осуществляют активацию или функционализацию сахараида. Активация может включать, например, цианилирующие реагенты, такие как CDAP (например, 1-циано-4-диметиламинопиридинтетрафторборат [Lees et al. (1996), Vaccine, 14:190-198, WO 95/08348]). В других подходящих способах используют карбодимиды, гидразиды, активные эфиры, норборан, р-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S-NHS, EDC, TSTU и т.д.

Присоединение через линкерную группу можно осуществлять, используя любой известный способ, например, способы, описанные в US 4882317 и US 4695624. Другие типы присоединений включают восстановительное аминирование полисахарида, присоединение образованной аминогруппы к одному концу адипиновой кислоты, являющейся линкерной группой, а затем присоединение белка к другому концу адипиновой кислоты, являющейся линкерной группой [Porto et al. (1985), Mol. Immunol. 22:907-919, EP 0208375]. Другие линкеры включают В-пропионамидо [WO 00/10599], нитрофенил-этиламин [Gevert et al. Med. Microbiol. Immunol, 165:171-288 (1979)], галогенацилгалиды [US 4057685], гликозидные связи [US 4673574; US 4761283; US 4808700], 6-аминокапроновую кислоту [US 4459286], ADH [US 4965338], C₄-C₁₂ группировки [US 4663160] и т.д. Альтернативной применению линкера является непосредственное связывание. Непосредственное связывание с белком может включать окисление полисахарида с последующим восстановительным аминированием, как описано, например, в US 4761283 и US 4356170.

Предпочтительным является процесс, включающий введение аминогрупп в сахарид (например, посредством замещения концевых =O групп на -NH₂) с последующей дериватизацией адипиновым диэфиром (например, N-гидроксисукцинимидным диэфиром адипиновой кислоты) и реакцией с белком-носителем. В другой предпочтительной реакции применяют активацию CDAP с использованием носителя белка D, например, для MenA или MenC.

Каждый антиген в композиции обычно находится в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл. В целом, концентрация любого заданного антигена будет достаточна для индукции иммунного ответа против данного антигена.

Иммуногенные композиции по изобретению могут применяться терапевтически (т.е. лечить существующую инфекцию) или профилактически (т.е. предупреждать инфекцию в будущем).

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

Общая информация.

Термин "содержащий" охватывает термины "включающий" и "состоящий из", например композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может включать нечто дополнительное, например X+Y. Упоминание "содержащий" (или "содержит" и т.д.) можно заменить упоминанием "состоящий из" (или "состоит из" и т.д.). Термин "по существу состоящий из" ограничивает объем заявленного конкретными материалами или стадиями "и теми, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики" по изобретению.

Применительно к цифровому значению x возможно использование термина "приблизительно", который означает, например, x±10%.

Термин "по существу" не исключает значения "полностью", например композиция, которая "по существу свободна" от Y, может быть полностью свободна от Y. Термином "по существу" можно пренебречь в определении изобретения, где это необходимо.

Когда изобретение касается "эпитопа", данный эпитоп может представлять собой В-клеточный эпитоп и/или Т-клеточный эпитоп, но обычно является В-клеточным эпитопом. Такие эпитопы можно обнаружить экспериментальным путем (например, с применением PEPSCAN (см., например, Geysen et al. (1984), PNAS USA, 81:3998-4002 и Carter (1994), Methods Mol. Biol. 36:207-23) или аналогичных способов) или их можно предсказать (например, с помощью антигенного индекса Jameson-Wolf (Jameson, B. A. et al. 1988, CABIOS, 4(1):181-186), подходов на основе матриц (Raddrizzani & Hammer (2000), Brief Bioinform. 1(2):179-89), MAPITOPE (Bublil et al. (2007), Proteins, 68(1):294-304), TERITOPE (De Lalla et al. (1999), J. Immunol. 163:1725-29 и Kwok et al. (2001), Trends Immunol. 22:583-88), нейронных сетей (Brusic et al. (1998), Bioinformatics, 14(2):121-30), OptiMer & EpiMer (Meister et al. (1995), Vaccine, 13(6):581-91 и Roberts et al. (1996), AIDS Res. Hum. Retroviruses, 12(7):593-610), ADEPT (Maksyutov & Zagrebelnaya (1993), Comput. Appl. Biosci. 9(3):291-7), Т-сайтов (Feller & de la Cruz (1991), Nature, 349(6311):720-1), гидрофильности (Hopp (1993), Peptide Research, 6:183-190) или антигенного индекса (Welling et al. (1985), FEBS Lett. 188:215-218)). Эпитопы являются частью антигена, которые распознаются и связываются с антигенсвязывающими сайтами антител или Т-клеточных рецепторов, и также могут обозначаться "антигенными детерминантами".

В данном описании упоминание "процента идентичности последовательностей" между искомой аминокислотной последовательностью и найденной схожей аминокислотной последовательностью понимают как обозначающие значение идентичности, которое рассчитывают с применением подходящего алгоритма или программного обеспечения для выполнения попарного выравнивания последовательностей, известных в области техники.

Искомая аминокислотная последовательность может быть описана аминокислотной последовательностью, охарактеризованной в одном или нескольких пунктах приведенной формулы изобретения. Искомая последовательность может быть на 100% идентична найденной схожей последовательности или она может включать некоторое целое число аминокислотных замен (например, точечных мутаций, замен, делеций, вставок и т.д.) по сравнению с найденной схожей аминокислотной последовательностью, так что % идентичности будет менее 100%. Например, искомая последовательность может быть по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична найденной схожей последовательности.

Предпочтительные инструменты выравнивания, используемые для выравнивания и расчета процента (%) идентичности последовательностей, представляют собой инструменты локального выравнивания, такие как алгоритмы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, основной инструмент поиска локального выравнивания). Программы для осуществления анализа BLAST предоставляются в открытый доступ Национальным центром биотехнологической информации (www.ncbi.nlm.nih.gov). Выравнивание можно осуществлять с помощью алгоритма поиска гомологии Смита-Ватермана, с использованием поиска аффинных гэпов со штрафом за открытие гэпа 12, штрафом за продолжение гэпа 2, и матрицы BLOSUM, 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Ватермана описан Smith & Waterman (1981), Adv. Appl. Math. 2:482-489. Другими предпочтительными инструментами выравнивания являются Water (EMBOSS) и Marcher (EMBOSS). В альтернативном варианте, предпочтительные инструменты выравнивания, используемые для выравнивания и расчета процента (%) идентичности последовательностей, представляют собой инструменты выравнивания, обеспечивающие наилучшее соответствие, такие как GENEPAST, также известный как алгоритм KERR.

Для расчета процента идентичности можно сравнить искомую и найденную схожую последовательность и выровнять с максимальным соответствием в обозначенной области (например, области длиной по меньшей мере 40, 45, 50, 55, 60, 65 или более аминокислот и, которая может доходить до всей длины найденной схожей аминокислотной последовательности). Указанная обозначенная область должна включать область искомой последовательности, содержащую любую конкретную точечную мутацию аминокислотной последовательности. В альтернативном варианте, процент идентичности последовательностей можно рассчитывать по "всей длине" искомой последовательности. Любые N-концевые или C-концевые аминокислотные участки, которые могут присутствовать в искомой последовательности, такие как сигнальные пептиды или лидерный пептид или C-концевые или N-концевые метки, следует исключать из выравнивания.

Термин "фрагмент" применительно к полипептидной последовательности означает, что полипептид представляет собой отрезок полноразмерного белка. В данном описании фрагмент мутантного полипептида также содержит мутацию(и). Фрагменты могут обладать качественной биологической активностью наряду с полноразмерным белком, например "иммуногенный фрагмент" содержит или кодирует один или более чем один эпитоп, такие как иммунодоминантные эпитопы, что обеспечивает выработку такого же или сопоставимого иммунного ответа на фрагмент, как и на полноразмерную последовательность. Фрагменты полипептидов обычно имеют делецию аминокислотной (N-) концевой части и/или карбокси- (C-) концевой части по сравнению с нативным белком, но оставшаяся часть аминокислотной последовательности фрагмента идентична аминокислотной последовательности нативного белка. Фрагменты полипептидов

могут содержать, например: приблизительно 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 24, 26, 28, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262 следующих друг за другом аминокислот референтной полипептидной последовательности, включая все промежуточные целые значения, например от 50 до 260, от 50 до 255, от 50 до 250, от 50 до 200, от 50 до 150 следующих друг за другом аминокислот референтной полипептидной последовательности. Термин "фрагмент" полностью исключает полноразмерные полипептиды fHbr и его зрелые липопротеины.

В классификации менингококков после серогруппы указывают серотип, сероподтип и затем иммунотип, и в стандартной номенклатуре перечисляются серогруппа, серотип, сероподтип и иммунотип, разделенные двоеточием, например В:4:P1.15:L3,7,9. Внутри серогруппы В некоторые линии вызывают заболевание часто (гиперинвазивные), некоторые линии вызывают более тяжелые формы заболевания по сравнению с другими (гипервирулентные), а другие и вовсе вызывают заболевание редко. Общеизвестно семь гипервирулентных линий, а именно подгруппы I, III и IV-1, комплекс ET-5, комплекс ET-37, кластер А4 и линия 3. Их охарактеризовали при помощи мультимолекулярного электрофореза ферментов (MLEE), однако для классификации менингококков также применяли мультимолекулярное типирование последовательности (MLST). Четыре основных гипервирулентных кластера - это комплексы ST32, ST44, ST8 и ST11.

Упоминание "увеличенной стабильности", или "более высокой стабильности", или "повышенной стабильности" в данном документе означает, что мутантные полипептиды, изложенные в данном документе, обладают более высокой термостабильностью (в ккал/моль) по сравнению с немутированным полипептидом (дикого типа) в таких же условиях эксперимента. Увеличение стабильности можно оценивать при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), например, как обсуждается в документах Bruylants et al. (Differential Scanning Calorimetry in Life Sciences: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design, 2005, Curr. Med. Chem. 12:2011-2020) и Calorimetry Sciences Corporation's "Characterizing Protein stability by DSC" (Life Sciences Application Note, Doc. No. 20211021306, February 2006) или при помощи дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Повышение стабильности можно охарактеризовать как повышение температуры фазового перехода (T_m) по меньшей мере на 5°C при оценке методом DSC или DSF. См., например, Thomas et al., Effect of single-point mutations on the stability and immunogenicity of a recombinant ricin A chain subunit vaccine antigen, 2013 Hum. Vaccin. Immunother. 9(4):744-752.

Следует понимать, что описание изобретения приведено выше исключительно для примера и возможны любые модификации, при условии, что они остаются в границах и в духе изобретения.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 [v1.13 зрелый полипептид из штамма M982]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTY
GNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGKLITLESQEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
SEDSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTITIDFAAK
QGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEV
AGSAEVETANGIHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 2 [v1.13 AG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNT
TGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGKLITLESQEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMO
VAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTITIDFAAKQGHGKIE

HLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVE
TANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 3 [v1.13 ΔG (E211A/E232A)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSL
TGKLNKNDKVSRLFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKM
VAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIE
HLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAAVE
TANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 4 [v1.13 ΔG (E211A/S216R)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSL
TGKLNKNDKVSRLFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKM
VAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIE
HLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVE
TANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 5 [v1.15 зрелый полипептид из штамма NM452]

CSSGGGGSGGGVVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGA
RFTKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQ
EQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYT
IDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGG
QAQEVAGSAEVEETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 6 [v1.15 ΔG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSL
NTGKLNKNDKISRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKM
VAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIE
HLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVE
TANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 7 [v1.15 ΔG (S219R)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSL
NTGKLNKNDKISRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEVQVQDSEHSGKM
VAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIE
HLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVE
TANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 8 [v1.15 ΔG (E214A/S219R)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSL
NTGKLNKNDKISRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEVQVQDSEHSGKM
VAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIE
HLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEV
ETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 9 [v1.15 ΔG (E214A/E235A)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSL
NTGKLNKNDKISRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEVQVQDSEHSGKM
VAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIE
HLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAAVE
TANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 10 [v2 дикий тип из штамма 2996]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQIY
KQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEK
GTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 11 [v2 зрелый полипептид]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLNKDKVSRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNP
KIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGH

GKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGS
ATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 12 [v2 AG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLOSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNT
GKLNKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQ
RSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
PEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE
KVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 13 [v3 дикий тип из штамма M1239]

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLT
LEDSIPQNGTLTSLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLA
SGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYH
GKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDT
RYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 14 [v3 зрелый]

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGA
EKTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQI
EKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDF
TKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDR
AQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 15 [v3 AG]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAEKTFKAGDKDNSL
NTGKLNKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSL
INQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHL
KTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 16 [v2 AG S32V/L123R]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSVGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 17 [v3 AG S32V/L126R]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTTLAQAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSVGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 18 [(23S_1.13_E211A/E232A)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSVGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTTLAQAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSVGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGKLTLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAAVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 19 [23S_1.13_E211A/S216R]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDK VSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLIN QRSFRV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHL KTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG EKVHEIGIAGKQGS~~GGGG~~VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTTL SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRV SGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS~~GGGG~~VAADIGAGLADALTAPLDHK DKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKISRDFIRQIEVD GKLTLESGEFQVYKQSHSALTALQTEVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEK RHAVISGSVLYNQDAKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 20 [23S_1.15_S219R]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDK VSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLIN QRSFRV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHL KTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG EKVHEIGIAGKQGS~~GGGG~~VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTTL SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRV SGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS~~GGGG~~VAADIGAGLADALTAPLDHK DKGLKSLTLEDNISQNGTLTTLAQAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 21 [23S_1.15_E214A/S219R]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDK VSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLIN

QRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHL
 KTPEQVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
 EKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTL
 SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSH
 AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG
 RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH
 LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHK
 DKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKISRFDVQKIEV
 DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEVQDSEHSGKMAKRQFRIGDIVGEHTSFGK
 LPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPD
 EKHHAVISGSVLYNQAAKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 22 [23S_1.15_ E214A/E235A]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSL
 TGKLNKDVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAAVVALQIEKINNPDKIDSLIN
 QRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHL
 KTPEQVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIG
 EKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTL
 SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSH
 AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG
 RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH
 LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHK
 DKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKISRFDVQKIEV
 DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEVQDSEHSGKMAKRQFRIGDIVGEHTSFGK
 LPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPD
 EKHHAVISGSVLYNQAAKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAAVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 23 [v1.1 ΔG + His метка]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSL
 TGKLNKDVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEVQDSEHSGKMA
 AKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRAATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQNGKIEH
 LKSPELGLAAQLNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA

GSAEVKTVNGIRHLEHHHHHH

SEQ ID NO: 24 [v1.13 ΔG + His метка]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQFIRQIEVDGKLITLESQEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMAKRVQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVE
TANGIHHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 25 [v1.13 ΔG (E211A)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQFIRQIEVDGKLITLESQEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMAKRVQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVE
TANGIHHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 26 [v1.13 ΔG (S216R)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQFIRQIEVDGKLITLESQEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMAKRVQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYRLGIFGGQAQEVAGSAEVE
TANGIHHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 27 [v1.15 ΔG + His метка]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDQFIRQIEVDGQLITLESQEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMAKRVQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVE
TANGIRHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 28 [v1.15 ΔG (E214A) + His метка]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSL

NTGKLNKNDKISRFDVFIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKM
 VAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIE
 HLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVE
 TANGIRHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 29 [слитый полипептид fHbp 231 дикий тип]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNT
 GKLNKNDKVSFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRS
 FLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP
 QNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKV
 HEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTSLAQ
 GAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRFDVFQKIEVDGQTITLASSEGFQIYKQNHSAVV
 ALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLH
 YSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLAL
 FGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGL
 QSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGSLNTGKLNKNDKVSFDFIRQIEVDGQLITL
 ESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRA
 TYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAAIKPDGKRHAVISG
 SVLYNQAEKGSYSLGIFGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 30 [слитый полипептид fHbp 231S]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNT
 TGKLNKNDKVSFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQ
 RSFRVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLK
 TPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE
 KVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTSL
 AQAQAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRFDVFQKIEVDGQTITLASSEGFQIYKQNHSA
 VVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNR
 LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHL
 ALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDK
 GLQSLTLDQSVSKNEKLLAAQGAEKTYGNGSLNTGKLNKNDKVSFDFIRQIEVDGQLI
 TLESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRA

ATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAAIKPDGKRHAVIS
GSLVYNQAEKGSYSLGIFGKAQEVAAGSAEVTVNGI RHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 31 [v1.13 полноразмерная последовательность дикого типа]

MNRTAFCCFLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSV
RKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVY
KQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFG
SDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSLVYNQD
EKGSYSLGIFGGQAQEVAAGSAEVETANGIHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 32 [v1.15 полноразмерная последовательность дикого типа]

MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLT
LEDSISQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRDFIRQIEVDGQLITLES
GEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSKGMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMA
TYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISG
SVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 33 [зрелый fHbp v1.1]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTY
GNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQIQDSE
HSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQ
GNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSLVYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVA
GSAEVTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 34 [возможная N-концевая аминокислотная последовательность]

MGPDSDRLLQRR

Варианты осуществления изобретения

Далее изобретение будет описано более подробно на примерах, которые не являются исчерпывающими.

Примеры

Пример 1. Исследование стабильности стабилизированного слитого fHbp 231, содержащего мутанты варианта 1.13.

Как обсуждалось выше, дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) дает информацию о температурной стабильности и укладке доменов белков и описана в литературе, например, Johnson (2013), Arch. Biochem. Biophys. 531:100-9 и Bruylants et al., Current Medicinal Chemistry, 2005; 12:2011-20. DSC ранее применяли для оценки стабильности fHbp v2 (Johnson et al., PLoS Pathogen, 2012; 8:e1002981). Подходящие условия для оценки стабильности при помощи DSC могут заключаться в использовании 20 мкМ полипептида в буферном растворе (например, 25 мМ Tris) с pH между 6 и 8 (например, 7-7,5) с 100-200 мМ NaCl (например, 150 мМ).

Авторы данного изобретения использовали данную методику для исследования влияния мутаций подвариантов варианта 1 fHbp на стабильность слитого белка 231S.

Стабилизированный слитый белок fHbp 231 (обозначенный "231S"), использованный в данном примере, включает последовательности варианта 2 и варианта 3, содержащие стабилизирующие мутации. В частности, компонент v2 слитого белка 231S имеет последовательность SEQ ID NO: 16, содержащую обе мутации S32V и L123R. Компонент v3 слитого белка 231S имеет последовательность SEQ ID NO: 17, содержащую обе мутации S32V и L126R. Авторы изобретения исследовали влияние вариаций компонента v1 слитого 231S на стабильность.

Каждый из вариантов полипептида fHbp содержит N-концевой и C-концевой домен, которые можно отчетливо различить на термограммах DSC в виде двух самостоятельных переходов (пиков). Тогда как значения T_m , соответствующие переходам C-концевых доменов большинства вариантов fHbp, находятся вблизи 90°C, у N-концевых доменов они широко варьируют между различными вариантами fHbp, при этом наиболее низкие значения наблюдаются у варианта 2.1 дикого типа (42°C), а наиболее высокие - у варианта 1.1 (70°C).

На фиг. 2 показаны четыре различные термограммы, на которых сравниваются данные DSC, где вариант 1, являющийся компонентом слитого fHbp 231S, представляет собой:

fHbp v1.1 или fHbp v1.13 или (A) fHbp v.1.13 E211A (фиг. 2A);

fHbpv1.1 или fHbp v1.13 или (B) fHbp v1.13 S216R (фиг. 2B);

fHbp v1.1 или fHbp v1.13 или fHbp v.1.13 E211A/E232A (фиг. 2C) и fHbp v1.1 или fHbp v1.13 или fHbp v.1.13 E211A/S216R (фиг. 2D).

На основании каждой из этих четырех термограмм можно заключить, что (i) единицы fHbp в слитых конструкциях свернуты надлежащим образом и ii) что мутации v1 эффективны для стабилизации слитых конструкций, приводя к увеличению температур перехода для С-концевых доменов по сравнению со слитыми конструкциями, содержащими последовательности v1 дикого типа.

Пример 2. Связывание мутантов одного варианта fHbp с hfH.

Создали следующие полипептиды, приведенные в табл. 1 (с добавлением С-концевых меток His₆ в тех случаях, когда они не были частью референтной последовательности) для исследования влияния мутаций с заменой на способность подвариантов 1.13 и 1.15 варианта 1 fHbp снижать связывание с человеческим фактором H (hfH).

Белок	SEQ ID #	Очистка	Чистота % (эксклюзивная СВЭЖХ)
fHbp v1.1	23	MATS3	98
fHbp v1.13	24	MenB 664	95
fHbp V 1.13 E211A	25	MenB 672	98
fHbp V 1.13 S216R	26	MenB 673	98
fHbp V1.13 E211A/E232A	3	MenB 687	92
fHbp V1.13 E211A/S216R	4	MenB 686	91
fHbp v1.15	27	MenB 669	82
fHbp v1.15 E214A	28	MenB 679	85
fHbp v1.15 E214A/E235A	9	MenB 680	86
fHbp v1.15 E214A/S219R	8	MenB 682	82
fHbp v1.15 S219R	7	MenB 683	83

Авторы изобретения исследовали связывание мутантов одного варианта hfH методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), который представляет собой методику, позволяющую подробно и количественно охарактеризовать белок-белковые взаимодействия и определить их равновесные и кинетические параметры (как описано, например, Karlsson et al. (1994), *Methods*, 6:99-110).

Способ связывания на основе SPR включает иммобилизацию лиганда на поверхности сенсор-чипа. Представляющий интерес лиганд иммобилизуют на поверхности сенсор-чипа при помощи строго определенных химических реакций, что позволяет пропускать по его поверхности растворы с различными концентрациями аналита и характеризовать их взаимодействия с иммобилизованным лигандом. Сигнал SPR обусловлен изменениями индекса преломления на поверхности золотого сенсор-чипа.

При отслеживании изменений сигнала SPR во времени получают сенсограмму, график зависимости связывания (в единицах RU) от времени, что позволяет визуализировать и оценивать разные стадии события связывания.

При инъектировании аналита ответ нарастает вследствие образования комплексов аналит-лиганд на поверхности, и на сенсограмме преобладает фаза ассоциации. После инъектирования достигается стационарное состояние, при котором связывающиеся и диссоциирующие молекулы находятся в равновесии. После окончания инъектирования аналита происходит снижение ответа вследствие диссоциации комплексов, что характеризует фазу диссоциации. Аппроксимация данных сенсограммы с использованием соответствующей модели кинетики связывания позволяет рассчитать кинетические параметры, такие как константы степени ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также аффинность связывания при исследуемом взаимодействии.

Авторы изобретения проводили эксперименты в следующих условиях:

Чип: CM-5 с иммобилизацией по аминокетам доменов 6-7 фактора H, 10 мкг/мл в ацетатном буфере с pH 4,0 до уровня ~400 RU, и иммобилизацией по аминокетам человеческого фактора H (Merck Millipore), 20 мкг/мл в ацетатном буфере с pH 4,0 до уровня ~ 2500 RU.

Проточный буфер: 1×HBS-P.

Исследуемые антигены: приведены в табл. 1.

Антигены наносили в постоянной концентрации 250 нМ.

Время взаимодействия: 120 с, скорость тока: 30 мкл/мин.

Время диссоциации: 120 с.

Буфер для регенерации: 100 мМ глицин-HCl, 3М NaCl, pH 2,0.

Данные, приведенные на фиг. 3A-D, позволяют сравнить связывание доменов 6-7 фактора H (hfH) с fHbp v1.1 (антиген fHbp, присутствующий в BEXSERO®), fHbp v1.13 (дикий тип) и fHbp v1.13 E211A (фиг. 3A); fHbp v1.13 S216R (фиг. 3B); fHbp v1.13 E211A/E232A (фиг. 3C) и fHbp v1.13 E211A/S216R (фиг. 3D).

Было показано, что фрагмент hfH, содержащий только домены 6-7, достаточен для имитации взаимодействия fHbp-hfH (Schneider et al. (2009), Nature, 458:890-893), таким образом, получена упрощенная модельная система для оценки аффинности мутантов и конструкций fHbp к hfH.

Тогда как одиночные мутанты fHbp v1.13 демонстрируют пониженное связывание с hfH по сравнению с v1.1 и v1.13 дикого типа (см. фиг. 3A и B), двойные мутанты v1.13 E211A/E232A и v1.13 E211A/S216R демонстрируют значительное снижение связывающей активности (см. фиг. 3C и D).

Данные, приведенные на фиг. 4A-D, позволяют сравнить связывание полноразмерного белка фактора H с fHbp v1.1, fHbp v1.13 (дикий тип) и fHbp v1.13 E211A (фиг. 4A); fHbp v1.13 S216R (фиг. 4B); fHbp v1.13 E211A/E232A (фиг. 4C) и fHbp v1.13 E211A/S216R (фиг. 4D).

Тогда как одиночные мутанты fHbp v1.13 демонстрируют пониженное связывание с hfH по сравнению с v1.1 и v1.13 дикого типа (см. фиг. 4A и B), двойные мутанты v1.13 E211A/E232A и v1.13 E211A/S216R демонстрируют значительное снижение связывающей активности (см. фиг. 4C и D).

Данные, приведенные на фиг. 5A-D, позволяют сравнить связывание доменов 6-7 фактора H с fHbp v1.1, fHbp v1.15 (дикий тип) и fHbp v1.15 E214A (фиг. 5A), fHbp v1.15 S219R (фиг. 5B), fHbp v1.15 E214A/E235A (фиг. 5C) и fHbp v1.15 E214A/S219R (фиг. 5D).

Тогда как одиночные мутанты fHbp v1.15 демонстрируют пониженное связывание с hfH по сравнению с v1.1 и v1.15 дикого типа (см. фиг. 5A и B), двойные мутанты v1.15 E214A/E235A и v1.15 E214A/S219R демонстрируют отсутствие существенного связывания с субдоменами fH6-7 фактора H (см. фиг. 5C и D).

Данные, приведенные на фиг. 6A-D, позволяют сравнить связывание полноразмерного белка фактора H с fHbp v1.1, fHbp v1.15 (дикий тип) и fHbp v1.15 E214A (фиг. 6A), fHbp v1.15 S219R (фиг. 6B), fHbp v1.15 E214A/E235A (фиг. 6C) и fHbp v1.15 E214A/S219R (фиг. 6D).

Тогда как одиночный мутант fHbp v1.15 E214A демонстрирует пониженное связывание с hfH по сравнению с v1.1 и v1.15 дикого типа (см. фиг. 6A), одиночный мутант v1.15 S219R и двойной мутант v1.15 E214A/E235A по существу не связываются с полноразмерным белком hfH (см. фиг. 6B и C).

Двойной мутант v1.15 E214A/S219R демонстрирует некоторую остаточную связывающую активность с полноразмерным белком hfH (см. фиг. 6D).

Таким образом, в итоге наиболее перспективными кандидатами для уменьшения или устранения связывания с hfH являются мутанты fHbp v1.13 E211A/E232A, v1.13 E211A/S216R, v1.15 S219R и v1.15 E214A/E235A.

Пример 3. Связывание мутантов слитого fHbp 23(S) 1.13 и 23(S) 1.15 с hfH.

Создали следующие слитые полипептиды (табл. 2) (с добавлением С-концевых меток His₆, в тех случаях, когда они не являлись частью референтной последовательности) для исследования влияния мутаций компонентов var1 слитых белков fHbp 231 на способность слитого белка связываться с человеческим фактором H (hfH).

Таблица 2

Белок	SEQ ID #	Очистка	Чистота % (эксклюзивная СВЭЖХ)
fHbp 231wt	29	MENB593	85
fHbp 231S	30	MENB665	92
fHbp 23S_1.13_E211A/S216R	19	MENB689	93
fHbp-23S_1.15 E214A/E235A	22	MENB702	91
fHbp- 23S_1.13_E211A/E232A	18	MENB703	90

Авторы изобретения исследовали связывание мутантов слитого fHbp 23(S)1.13 и 23(S)1.15 с hfH при помощи SPR, как описано в примере 2.

Слитый белок fHbp 231S (SEQ ID NO: 30), использованный в данном примере, включает последовательности варианта 2 и варианта 3, содержащие стабилизирующие мутации S32V/L123R и S32V/L126R, соответственно, подробно описанные выше. В частности, компонент v2 слитого белка 213S имеет после-

довательность SEQ ID NO: 16, а компонент v3 слитого белка 213S имеет последовательность SEQ ID NO: 17. Компонент v1.1 слитого fHbp 231S включает точечную мутацию (R→S), препятствующую связыванию с hfH, которая выделена жирным шрифтом в SEQ ID NO: 30 выше и соответствует мутации R41S, описанной в WO 2011/126863.

Слитый fHbp 231 дикого типа (SEQ ID NO: 29), использованный в данном примере, соответствует слитому белку с последовательностью SEQ ID NO: 30, но без внедрения стабилизирующих мутаций в v2 и v3 и без препятствующей связыванию мутации в v1.1.

Слитый fHbp 23S_1.13E211A/S216R (SEQ ID NO: 19) соответствует слитому белку с последовательностью SEQ ID NO: 30, однако компонент v1 слитого белка представляет собой несвязывающийся мутант v1.13 E211A/S216R по данному изобретению.

Слитый fHbp 23S_1.15 E214A/E235A (SEQ ID NO: 22) соответствует слитому белку с последовательностью SEQ ID NO: 30, однако компонент v1 слитого белка представляет собой несвязывающийся мутант v1.15 E214A/E235A по данному изобретению.

Слитый fHbp-23S_1.13E211A/E232A (SEQ ID NO: 18) соответствует слитому белку с последовательностью SEQ ID NO: 30, однако компонент v1 слитого белка представляет собой несвязывающийся мутант v1.13 E211A/S216R по данному изобретению.

Слитые белки 231 дикого типа (SEQ ID NO: 29) и fHbp 231S (SEQ ID NO: 30) служат в данном эксперименте контролями.

Сенсограммы, приведенные на фиг. 7А, В), позволяют сравнить связывание доменов 6-7 фактора Н с fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и fHbp 23S_1.13E211A/S216R (фиг. 7А), а также fHbp 23S_1.13E211A/E232A (фиг. 7В).

Сенсограммы, приведенные на фиг. 8, позволяют сравнить связывание доменов 6-7 фактора Н с fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и fHbp 23S_1.15 E214A/E235A.

Было показано, что фрагмент hfH, содержащий только домены 6-7, достаточен для имитации взаимодействия fHbp - hfH (Schneider et al. (2009), Nature, 458:890-893), таким образом, получена упрощенная модельная система для оценки аффинности мутантов и конструкций fHbp к hfH.

Из фиг. 7 и 8 явственно следует, что все три мутанта v1.13/1.15 демонстрируют сильное снижение связывающей активности с доменами 6-7 фактора Н. По сравнению со слитым 2fHbp 31S связывающая активность, демонстрируемая мутантными слитыми белками v1.13 и v1.15, отчетливо снижена.

Сенсограммы, приведенные на фиг. 9А, В), позволяют сравнить связывание полноразмерного белка фактора Н с fHbp 231 дикого типа, fHbp 231S и fHbp 23S_1.13E211A/S216R (фиг. 9А), а также fHbp 23S_1.13E211A/E232A (фиг. 9В).

Сенсограммы, приведенные на фиг. 10, позволяют сравнить связывание полноразмерного белка фактора Н с fHbp 231 дикого типа, fHbp 23S и fHbp 23S_1.15 E214A/E235A.

Эти данные свидетельствуют, что все три исследованных мутанта v1.13/1.15 демонстрируют выраженное снижение связывающей активности с полноразмерным фактором Н по сравнению со слитым fHbp 231S.

Пример 4. Исследование иммуногенности, вызываемой слитыми белками fHbp по изобретению в отношении штаммов менингококка, экспрессирующих множество различных подвариантов fHbp v1 (v1.x).

Основная задача:

Исследовать иммуногенность, вызванную слитыми белками 231.13, содержащими мутации, которые снижают или устраняют связывание hfH, в отношении штаммов менингококка, экспрессирующих fHbp в виде множества различных подвариантов fHbp v1, в сравнении с существующими антигенами/слитыми белками fHbp и лицензированной вакциной 44CMenB. Иммуногенность определяли по бактерицидной активности сыворотки в присутствии кроличьего компонента (rSBA) и бактерицидной активности сыворотки в присутствии человеческого компонента (hSBA) в отношении следующих подвариантов штамма fHbp v1 (v1.x): v1.1, v1.10, v1.13, v1.14 и v1.15.

Задачей данных экспериментов является оценка, демонстрируют ли слитые белки fHbp по данному изобретению сопоставимую (не уступающую) иммуногенность в отношении панели штаммов, экспрессирующих fHbp v1.x, при сравнении с существующими композициями антигенов/слитых белков и лицензированной вакциной 44CMenB.

Схема иммунизации:

Семь групп по 10 мышей (самки CD1 в возрасте 6-8 недель) получали три отдельные дозы по 200 мкл одной из семи различных антигенных композиций, как подробно представлено в табл. 3.

Мышей иммунизировали внутрибрюшинно (в/б) в 1, 22 и 36 дни.

У мышей брали кровь в 0, 35 и 50 дни.

Таблица 3

Группа	Число животных	Воздействие			
		Антиген	Доза антигена	Доза адьюванта	Объем и способ инъекции
1	10	231.13_E21 1A/S216R (SEQ ID NO: 19)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
2	10	231.13_E21 1A/E211A/E 232A (SEQ ID NO: 18)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
3	10	231.13 (SEQ ID NO: 29)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
4	10	231.1S (SEQ ID NO: 30)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
5	10	fHbp v1.1 (SEQ ID NO: 33)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
6	10	936-741*	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
7	10	BEXSERO-подобный* *	20 мкг антигена + 10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ

*936-741 представляет собой слитый GNA2091-fHbp, включенный в вакцину 44CMenB.

**BEXSERO-подобный означает готовый продукт BEXSERO, но обязательно из партии, одобренной для выпуска.

Конечная точка:

Выработка суммарных IgG против fHbp через две недели после третьей иммунизации.

Исследование пулированной сыворотки в тестах rSBA и hSBA с применением панели штаммов *Neisseria meningitidis*, экспрессирующих fHbp v1.1, v1.10, v1.13, v1.14 и v1.15.

Результаты:

На фиг. 11A показаны бактерицидные титры сыворотки, измеренные в присутствии кроличьего компонента (rSBA) в отношении каждой из 7 композиций антигенов в исследовании на различных штаммах менингококка, экспрессирующих fHbp v1.x. При отображении результатов SBA каждая точка представляет бактерицидный титр сыворотки в отношении отдельного штамма, измеренный в пулированной сыворотке. На фиг. 11B показаны бактерицидные титры сыворотки, измеренные в присутствии человеческого компонента (hSBA) в отношении каждой из 7 композиций антигенов в исследовании против того же набора штаммов, экспрессирующих fHbp v1.x.

Результаты показывают, что слитые белки fHbp по изобретению (группы 1 и 2) демонстрируют сопоставимую (не уступающую) иммуногенность в отношении панели v1.x при сравнении с лицензированным продуктом BEXSERO и антигеном BEXSERO fHbp (936-741).

Любопытно, что данные результаты также указывают, что слитые белки fHbp по изобретению (группы 1 и 2) являются более иммуногенными, чем существующие слитые белки, известные в области техники (в частности, слитый 231.1S (в данном документе SEQ ID NO: 30)), в отношении панели штаммов v1.x, как в определении с применением rSBA, так и с hSBA.

Пример 5. Исследование иммуногенности, вызываемой слитыми белками fHbp по изобретению, в отношении штаммов менингококка, экспрессирующих fHbp v2/v3.

Основная задача:

Исследовать иммуногенность, вызываемую слитыми белками 231.13, содержащими мутации, которые снижают или устраняют связывание с hfH, в отношении штаммов менингококка, экспрессирующих

fHbp v2 или v3, в сравнении с существующими антигенами/слитыми белками fHbp и лицензированной вакциной 44CMenB. Задачей данных экспериментов была оценка, позволит ли включение трех различных мутированных вариантов fHbp расширить перекрывание штаммов по сравнению с существующими композициями антигенов.

Иммуногенность определяли по бактерицидной активности сыворотки в присутствии кроличьего комплемента (rSBA) и бактерицидной активности сыворотки в присутствии человеческого комплемента (hSBA) в отношении следующих штаммов fHbp v2 и v3: v2.16, v3.31 и v3.42.

Схема иммунизации:

Семь групп по 10 мышей (самки CD1 в возрасте 6-8 недель) получали три отдельные дозы по 200 мкл одной из семи различных антигенных композиций, как подробно представлено в табл. 4 ниже.

Мышей иммунизировали внутрибрюшинно (в/б) в 1, 22 и 36 дни.

У мышей брали кровь в 0, 35 и 50 дни.

Таблица 4

Группа	Число животных	Воздействие			
		Антиген	Доза антигена	Доза адьюванта	Объем и способ инъекции
1	10	231.13_E21 1A/S216R (SEQ ID NO: 19)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
2	10	231.13_E21 1A/E211A/E 232A (SEQ ID NO: 18)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
3	10	231.13 (SEQ ID NO:29)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
4	10	231.1S (SEQ ID NO:30)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
5	10	fHbp v1.1 (SEQ ID NO: 33)	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
6	10	936-741*	20 мкг антигена	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ
7	10	BEXSERO-подобный**	20 мкг антигена + 10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВБ

*93 6-741 представляет собой слитый GNA2091-fHbp, включенный в вакцину 44CMenB.

**BEXSERO-подобный означает готовый продукт BEXSERO, но обязательно из партии, одобренной для выпуска.

Конечная точка:

Выработка суммарных IgG против fHbp через две недели после третьей иммунизации.

Исследование пулированной сыворотки в тестах rSBA и hSBA против панели штаммов *Neisseria meningitidis*, экспрессирующих fHbp в варианте 2 или варианте 3.

Результаты:

На фиг. 12A показаны бактерицидные титры сыворотки, измеренные в присутствии кроличьего комплемента (rSBA) в отношении каждой из 7 композиций антигенов в исследовании на различных штаммах менингококка, экспрессирующих fHbp v2 или v3. При отображении результатов SBA каждая точка представляет бактерицидный титр сыворотки в отношении отдельного штамма, измеренный в пулированной сыворотке. На фиг. 12B показаны бактерицидные титры сыворотки, измеренные в присутствии человеческого комплемента (hSBA) в отношении каждой из 7 композиций антигена в исследовании против того же набора штаммов, экспрессирующих fHbp v2 или v3.

Результаты показывают, что слитые белки, содержащие все три варианта fHbp, приводят к гораздо более высоким титрам в тестах с rSBA и hSBA по сравнению с fHbp v1.1 в отдельности, со слитым бел-

ком 936-741, включенным в BEXSERO, или фактически с самим продуктом BEXSERO. Это свидетельствует о существенном улучшении иммунного ответа против штаммов, экспрессирующих fHbp v2 или v3, по сравнению с существующей вакциной или компонентами вакцины.

Пример 6. Оценка дополнительных преимуществ включения несвязывающихся мутантов fHbp231.x по изобретению в существующую вакцину 44CMenB.

Основная задача:

а) Оценить перекрытие штаммов (определяемое как титры ≥ 64 в тесте hSBA) композицией 44CMenB+слитый белок fHbp231.13_E211A/S216R по изобретению в сравнении с существующей вакциной 44CMenB на двух различных моделях на животных (мыши и кролики) через две недели после третьей дозы, при измерении титров в отношении 20 штаммов fHbp вариантов 2 и 3 выбранной серогруппы B *Neisseria meningitidis* в тесте hSBA.

б) Оценить перекрытие штаммов (определяемое как титры ≥ 64 в тесте hSBA) композицией 44CMenB+слитый белок fHbp231.13_E211A/S216R по изобретению в сравнении с существующей вакциной 44CMenB на двух различных моделях на животных (мыши и кролики) через две недели после третьей дозы, при измерении титров в отношении 30 штаммов fHbp вариантов 1.x выбранной серогруппы B *Neisseria meningitidis* в тесте hSBA.

в) Оценить перекрытие штаммов композицией 44CMenB+слитый белок fHbp231.13_E211A/S216R по изобретению (для доказательства, что она не уступает) при сравнении с существующей вакциной 44CMenB на двух различных моделях на животных (мыши и кролики) через две недели после третьей дозы, при измерении титров в отношении 11 вариантов серогруппы B *Neisseria meningitidis*, включая референтные штаммы 44CMenB и штаммы, несущие варианты 1.1 и 1.4 fHbp, перекрываемые 44CMenB, в тесте hSBA.

Конечная точка: титры собранной через две недели после третьей инъекции пулированной сыворотки в тесте hSBA (один пул на группу).

Схема исследования на мышах.

Самки мышей линии CD1 в возрасте 4-6 недель получали три инъекции внутривенно (ВВ) по 200 мкл 44CMenB, адсорбированной на алюминия гидроксиде (Bexsero), или 44CMenB-адсорбированной на алюминия гидроксиде (BEXSERO) плюс различные слитые белки fHbp 231 (как показано в табл. 5) в 1, 22 и 36 дни. Образцы крови брали перед 1-й инъекцией (день 0) и последний забор крови осуществляли через две недели после третьей инъекции (день 49).

Таблица 5

Группа	Число животных	Вакцина	Воздействие			Схема иммунизации (дни)	Забор образцов (органы, объем крови) и дни
			Доза антигена	Доза адьюванта	Объем и способ инъекции		
1	10	4CMenB	20 мкг белка +10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВВ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
2	10	4CMenB+fHbp 231.13_wt	20 мкг белка +10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВВ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
3	10	4CMenB + fHbp 231.13_E211A / S16R	20 мкг белка +10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВВ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
4	10	4CMenB + fHbp 231.13_E211A / E232A	20 мкг белка +10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВВ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
5	10	4CMenB + fHbp 231S*	20 мкг белка +10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВВ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
6	10	4CMenB + fHbp 231.15_wt	20 мкг белка +10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВВ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
7	10	4CMenB + fHbp 231.15_E214A / E235A	20 мкг белка +10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВВ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49

8	10	4CMenB + fHbp 231S*	20 мкг белка + 10 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	200 мкл ВВ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
---	----	---------------------	---------------------------	--------------------------------	------------	---------	-------------------

*Слитый белок fHbp 231S включает стабилизирующие мутации в компонентах v2 и v3, в дополнение к точечной мутации (R→S) в компоненте v1.1, препятствующей связыванию с fH, показанной жирным шрифтом в SEQ ID NO: 30, которая соответствует мутации R41S, описанной в WO 2011/126863.

Схема исследования на кроликах.

Самки новозеландских кроликов в возрасте 9 недель получали три инъекции внутримышечно (ВМ) по 500 мкл 44CMenB, адсорбированной на алюминия гидроксиде (BEXSERO), или 44CMenB-адсорбированной на алюминия гидроксиде (BEXSERO) плюс различные слитые белки fHbp 231 (как показано в табл. 6) в 1, 21 и 35 дни. Последний забор крови осуществляли через две недели после третьей инъекции.

Таблица 6

Группа	Число животных	Вакцина	Воздействие			Схема иммунизации (дни)	Забор образцов (органы, объем крови) и дни
			Доза антигена	Доза адьюванта	Объем и способ инъекции		
1	3	4CMenB	50 + 100 мкг белка + 25 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	500 мкл ВМ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
2	3	4CMenB+fHbp 231.13_wt	50 + 100 мкг белка + 25 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	500 мкл ВМ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
3	3	4CMenB + fHbp 231.13_E211A / S16R	50 + 100 мкг белка + 25 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	500 мкл ВМ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
4	3	4CMenB + fHbp 231.15_wt	50 + 100 мкг белка + 25 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	500 мкл ВМ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
5	3	4CMenB + fHbp 231S*	250 + 100 мкг белка + 25 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	500 мкл ВМ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49
6	3	4CMenB + fHbp 231.15_E214A/ E235A	50 + 100 мкг белка + 25 мкг OMV	Al(OH) ₃ 3 мг/мл	500 мкл ВМ	1,22,36	Кровь в дни 0, 49

*Слитый белок fHbp 231S включает стабилизирующие мутации в компонентах v2 и v3, в дополнение к точечной мутации (R→S) в компоненте v1.1, препятствующей связыванию с fH, показанной жирным шрифтом в SEQ ID NO: 30, которая соответствует мутации R41S, описанной в WO 2011/126863.

Определение размера выборки.

Десять мышей и 3 кролика на группу являются минимальным количеством животных, которое позволяет получить достаточно пулированной сыворотки для проведения теста hSBA в отношении большой панели штаммов (приблизительно 73), с учетом 20% повторных тестов или дополнительных титрований.

Всего с применением hSBA протестировали 61 штамм, несущий fHbp вариантов 1, 2 и 3 выбранной серогруппы B *Neisseria meningitidis*.

Считываемые иммунологические параметры.

Функциональные антитела определяли по бактерицидной активности сыворотки с использованием человеческого компонента (hSBA) в отношении 61 штамма *N. meningitidis*, несущего fHbp варианта 1.x, варианта 2 или варианта 3, и панели референтных антигенных штаммов Bexsero.

SBA является единственным общепринятым коррелятом защиты против *N. meningitidis* у человека.

Результаты.

Гуморальные ответы: функциональные антитела, измеренные с применением rSBA.

Для измерения функциональных антител, вырабатываемых в ответ на различные композиции BEXSERO, способные инициировать комплемент-опосредованный цитоллиз штаммов *N. meningitidis*, исследовали пулированную сыворотку, собранную через две недели после третьей вакцинации, по бактерицидной активности сыворотки с применением сыворотки человека кролика в качестве источника комплемента (hSBA) в отношении панели из приблизительно 60 штаммов *N. meningitidis*.

Общее количество отобранных штаммов *Neisseria* разделили на три различные панели штаммов: fHbp вариантов 2 и 3, fHbp вариантов 1.x, а также референтные штаммы BEXSERO и штаммы fHbp вариантов 1.1 и 1.4.

Чтобы продемонстрировать дополнительные преимущества композиции, содержащей слитый белок fHbp231.13_E211A/S216R по изобретению, относительно BEXSERO, отобрали 50 штаммов: 20 штаммов, несущих fHbp варианта 2 или варианта 3.

Отбор был основан на распределении частот встречаемости fHbp и включал штаммы, несущие fHbp v2.16, v2.19, v2.21, v2.24, v3.116, v3.31 и v3.42. 30 штаммов, несущих fHbp вариантов 1.x.

Отбор проводили таким образом, чтобы закрыть пробелы, существующие у BEXSERO, и проанализировать все генетическое разнообразие fHbp варианта 1, и включали штаммы, несущие fHbp v1.1, v1.4, v1.13, v1.15, v1.14, v1.10, v1.260, v1.510, v1.90, v1.275, v1.697, v1.226, v1.110, v1.249, v1.108, v1.227 и v1.215.

Чтобы продемонстрировать, что композиция, содержащая слитый белок fHbp231.13_E211A/S216R по изобретению, не уступает BEXSERO, отобрали 11 штаммов, включая референтные штаммы BEXSERO плюс дополнительные штаммы, которые, как известно, перекрываются BEXSERO (включая fHbp 1.1 и 1.4).

Исследование иммуногенности на мышах.

Для определения дополнительных преимуществ композиций, содержащих слитые белки fHbp по изобретению, относительно BEXSERO, сыворотку, полученную от вакцинированных мышей, исследовали в пулированном виде в присутствии человеческой плазмы как источника комплемента (hSBA) на 50 штаммах MenB, сгруппированных как штаммы варианта 1 (30 штаммов) и штаммы вариантов 2/3 (20 штаммов). Следует отметить, что отобрали 50 штаммов, которые не перекрываются BEXSERO и поэтому не совпадают по всем антигенам BEXSERO. Результаты показаны на фиг. 13A и B.

Как следует из фиг. 13A и B, композиции, содержащие слитые белки fHbp по изобретению, превосходят BEXSERO в отношении штаммов вариантов 2/3 и также превосходят BEXSERO в отношении панели штаммов вариантов 1.x.

Для различения перекрываемых и неперекрываемых штаммов выбрали новое пороговое значение 256 (в четыре раза превышающее первоначальное пороговое значение 64). Рассчитанные проценты перекрываемых штаммов представлены на фиг. 14A и B.

Результаты, приведенные на этих графиках, вновь демонстрируют, что композиции, содержащие слитые белки по изобретению, демонстрируют большее перекрывание в отношении панели штаммов вариантов 2 и 3 (фиг. 14A) по сравнению с BEXSERO в отдельности, а также большее перекрывание в отношении большинства штаммов вариантов 1.x (фиг. 14B) по сравнению с BEXSERO.

Наконец, не уступающие свойства композиции, содержащей слитые белки по изобретению, также оценивали в исследовании на мышах, тестируя мышиную антисыворотку на панели из 11 штаммов, включающей референтные штаммы BEXSERO и штаммы fHbp вариантов 1.1 и 1.4 (фиг. 15). Не уступающие свойства оценивали в тесте hSBA с применением пулированной сыворотки мышей к панели 11 штаммов MenB.

Результаты, приведенные на фиг. 15, подтверждают не только то, что все композиции, содержащие слитые белки по изобретению, не уступают BEXSERO, но также свидетельствуют об улучшенной иммуногенности в отношении большинства штаммов вследствие дополнительного вклада антител, направленных против дополнительных компонентов fHbp.

Не уступающие свойства композиций, содержащих слитый белок fHbp231.13_E211A/S216R по изобретению, по сравнению с BEXSERO также оценивали, тестируя сыворотку отдельных мышей с комплементом крольчат в качестве источника комплемента (rSBA) на панели 4 индикаторных штаммов BEXSERO (M14459 для fHbp варианта 1.1; NZ98/254 для PorA P1.4; M4407 для NHBA; 96217 для NadA), для подтверждения того, что специфическая иммуногенность антигенов BEXSERO сохраняется при добавлении нового слитого белка. Результаты показаны на фиг. 16A-D. На этих графиках "BEXSERO PLUS" относится к композиции BEXSERO + fHbp 231.13_E211A/S216R.

Исследование иммуногенности на кроликах.

Объединенные данные, полученные в тесте hSBA, для существующей композиции BEXSERO и композиций, содержащих слитые белки по изобретению, дополнительно представлены на фиг. 17A для штаммов типа var2/3 и на фиг. 17B для штаммов типа var.1.x. Пунктирная линия представляет порог отсечения для кроличьей сыворотки в тесте hSBA, равный 16.

Все композиции, содержащие слитые белки fHbp по данному изобретению, обеспечивают улучшенное перекрывание в отношении панели штаммов вариантов 2 и 3 по сравнению с BEXSERO в от-

дельности и приводят к более высоким титрам в отношении большинства штаммов вариантов 1.x в тесте hSBA по сравнению с BEXSERO в отдельности.

Как и в исследовании на мышах, описанном выше, для анализа данных, полученных у кроликов, в качестве нового порога отсечения выбирали значение 256 (в четыре раза превышающее первоначальное пороговое значение 64).

Проводили анализ перекрытия, сводные данные представлены на фиг. 18А (для штаммов вар2/3) и фиг. 18В (для штаммов вар.1.x). Эти результаты подтверждают, что композиции, содержащие слитые белки fHbp по данному изобретению, способны перекрывать больший процент штаммов вар2/3, чем BEXSERO в отдельности, и способны перекрывать больший процент штаммов v1.x, чем BEXSERO в отдельности и BEXSERO + слитый белок fHbp 231.1_R41S, известный из предшествующего уровня техники (обозначенный на фиг. 18 как 2-3-1S).

Наконец, то, что композиции, содержащие слитые белки fHbp по данному изобретению, не уступают BEXSERO, подтвердили в исследовании на кроликах, тестируя кроличью антисыворотку на панели из 11 штаммов, включая референтные штаммы BEXSERO и штаммы fHbp вар.1.1 и 1.4, как показано на фиг. 19.

Эти результаты подтверждают, что все композиции, содержащие слитые белки fHbp по данному изобретению, не уступают по своим свойствам.

Пример 7. Оценка иммуногенности мутанта 44CMenB+23(S)1.13 NB в сравнении с 44CMenB+23(S)1.13 дикого типа на модели трансгенных по hFN мышей

Схема иммунизации.

Две группы по 10 мышей (трансгенные мыши, экспрессирующие hFN) иммунизировали внутрибрюшинно (в.б.) одним из двух составов, А и В:

группа А = 4CMenB + fHbp 23(S)1.13 дикого типа;

группа В = 4CMenB + fHbp 23(S)1.13_E211A/S216R.

Одна мышь (неиммунизированная), служившая контролем, получала только фосфатно-солевой буфер (PBS).

Иммунизацию проводили введением трех доз в 1, 22 и 36 дни. Брали образцы крови перед иммунизацией и после третьей дозы. В каждой группе сыворотку, полученную до иммунизации, объединяли в пул.

Бактериальное заражение иммунизированных мышей.

Девять мышей из каждой группы подвергали заражению (две мыши погибли после взятия образцов и до бактериального заражения; одна мышь из группы А и одна из группы В). Мышей заражали в.б. с применением биолюминесцентного варианта штамма MC58 серогруппы В (10^7 КОЕ на мышь в 500 мкл физиологического раствора).

Результаты.

Визуализацию осуществляли в динамике через 30 мин и 6 ч после инфицирования, подсчитывали общее количество фотонов в секунду и выражали в виде общего числа фотонов в секунду на мышь и в виде отношения общего числа фотонов в секунду на мышь через 6 ч инфицирования к общему числу фотонов в секунду на мышь через 0,5 ч инфицирования (фиг. 20).

Подсчитывали общее количество испускаемых фотонов на мышь, которое показано на фиг. 21. В обеих группах сигналы существенно снижались по сравнению с неинфицированной мышью. У мышей группы В общее количество фотонов в секунду было меньше по сравнению с группой А, однако это различие не достигало уровня значимости ($p=0,2$) на фиг. 21А. Однако, при анализе данных, представленных в виде отношения сигналов через 6 ч/0,5 ч (фиг. 21В), различие было достоверным ($p=0,007$, критерий Манна-Уитни).

Заключение.

Как показывают фиг. 20 и 21, мыши в обеих группах, иммунизированные составами А и В, были защищены от заражения MC58, о чем свидетельствовала элиминация после инфицирования, отмечавшаяся у мышей обеих групп в момент времени 6 ч по сравнению с 0,5 ч. Напротив, неиммунизированные мыши были не способны к элиминации инфекционного агента через 6 ч после заражения. Однако, элиминация после заражения была более выражена у мышей группы В, иммунизированных 4CMenB+fHbp 23(S)1.13_E211A/S216R, по сравнению с мышами группы А, которых иммунизировали 4CMenB+fHbp 23(S)1.13 дикого типа.

Таким образом, эти данные, полученные *in vivo*, подтверждают улучшенную иммуногенность вакцинной композиции, содержащей мутированный не связывающийся с fN слитый белок по изобретению, по сравнению с эквивалентной композицией, содержащей слитый полипептид, который не включает в себя несвязывающийся двойной мутант полипептида v1.13 по изобретению.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутантный менингококковый полипептид fHbp v1.13, обладающий пониженной способностью связываться с человеческим фактором Н (hFN), содержащий аминокислотную последовательность,

имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2, где аминокислотная последовательность указанного мутантного менингококкового полипептида fHbp v1.13 содержит замены остатков E211A и S216R последовательности SEQ ID NO: 2.

2. Полипептид по п.1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

3. Слитый полипептид, содержащий менингококковые полипептиды fHbp v1, v2 и v3, где варианты последовательностей fHbp расположены в порядке v2-v3-v1 от N- к C-концу и где полипептид fHbp v1 представляет собой мутантный полипептид fHbp v1.13 по п.1 или 2.

4. Слитый полипептид по п.3, где:

(а) полипептид fHbp v2 представляет собой мутантный полипептид fHbp v2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности SEQ ID NO: 12, где аминокислотная последовательность fHbp v2 включает мутацию с заменой остатков S32 и L123 последовательности SEQ ID NO: 12 и где замены представляют собой S32V и L123R; и

(б) полипептид fHbp v3 представляет собой мутантный полипептид fHbp v3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности SEQ ID NO: 15, где аминокислотная последовательность fHbp v3 включает мутацию с заменой остатков S32 и L126 последовательности SEQ ID NO: 15 и где замены представляют собой S32V и L126R.

5. Слитый полипептид по п.4, где:

(а) полипептид fHbp v2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16 и/или

(б) полипептид fHbp v3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

6. Слитый полипептид по любому из пп.3-5, где последовательности v2 и v3 и последовательности v3 и v1 соединены глицин-сериновым линкером.

7. Слитый полипептид по п.6, где глицин-сериновый линкер представляет собой "GSGGGG".

8. Слитый полипептид по любому из пп.3-7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

9. Слитый полипептид по любому из пп.3-8, дополнительно содержащий N-концевую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

10. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный полипептид fHbp v1.13 по п.1 или 2.

11. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый полипептид по любому из пп.3-9.

12. Плазмида, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный полипептид fHbp v1.13 по п.1 или 2 или слитый полипептид по любому из пп.3-9.

13. Рекомбинантная клетка-хозяин, трансформированная плазмидой по п.12.

14. Иммуногенная композиция, содержащая мутантный полипептид fHbp v1.13 по п.1 или 2 или слитый полипептид по любому из пп.3-9.

15. Иммуногенная композиция по п.14, дополнительно содержащая одно или более чем одно из: менингококкового антигена NHBA, менингококкового антигена NadA, менингококкового антигена fHbp и везикул наружной мембраны менингококка (OMV).

16. Иммуногенная композиция по п.15, содержащая композицию 44CMenB.

17. Иммуногенная композиция по любому из пп.14-16, дополнительно содержащая конъюгированный капсулярный сахарид из *N. meningitidis* серогрупп A, C, W135 и/или Y.

18. Иммуногенная композиция по п.17, дополнительно содержащая конъюгированные капсулярные сахараиды из *N. meningitidis* каждой из серогрупп A, C, W135 и Y.

19. Способ выработки иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммуногенной композиции по любому из пп.14-18.

20. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.14-18 в медицине.

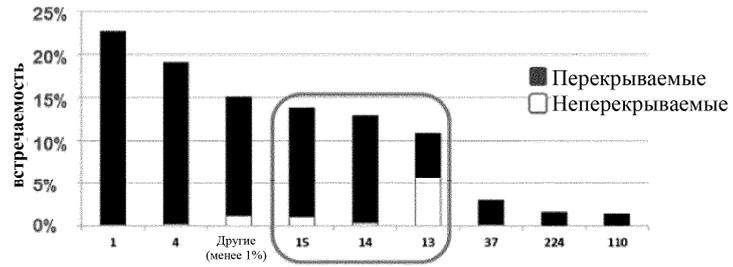
21. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.14-18 в качестве вакцины.

22. Иммуногенная композиция по любому из пп.14-18, где композиция предназначена для выработки иммунного ответа у млекопитающего.

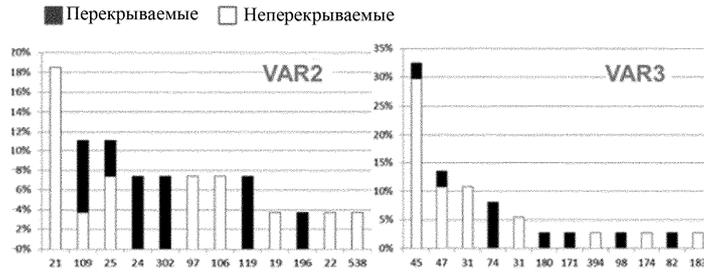
23. Иммуногенная композиция по любому из пп.14-18, где композиция предназначена для иммунизации млекопитающего против инфекции, вызываемой *N. meningitidis*.

24. Способ по п.19, где млекопитающее представляет собой человека.

25. Иммуногенная композиция по п.22 или 23, где млекопитающее представляет собой человека.



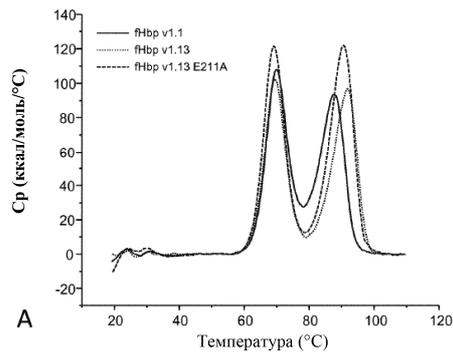
A



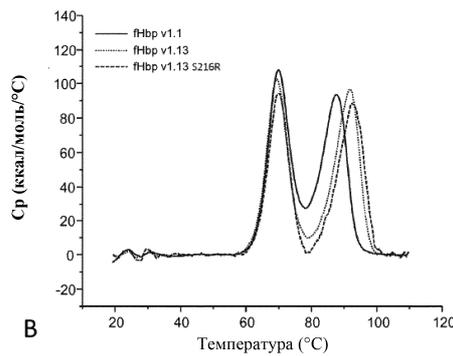
B

C

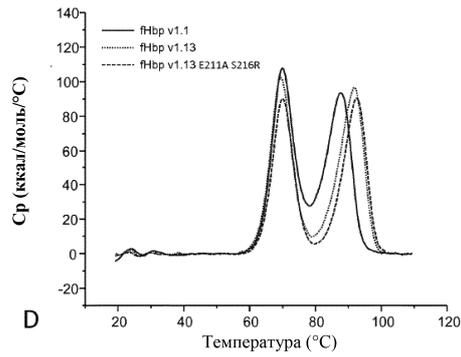
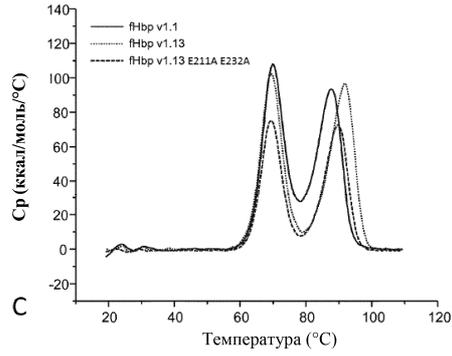
Фиг. 1



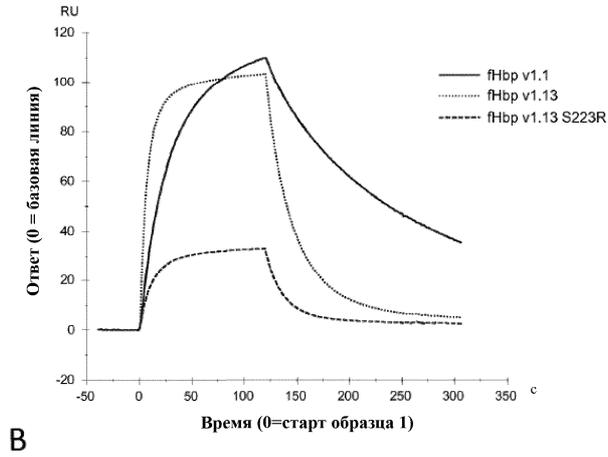
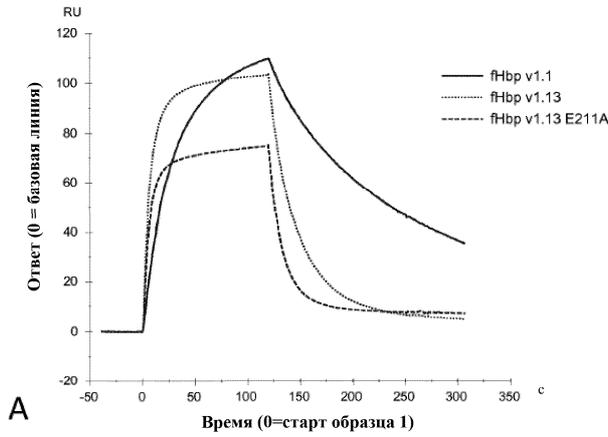
A



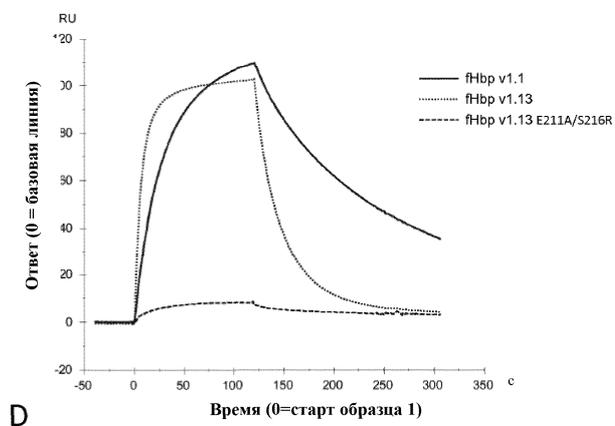
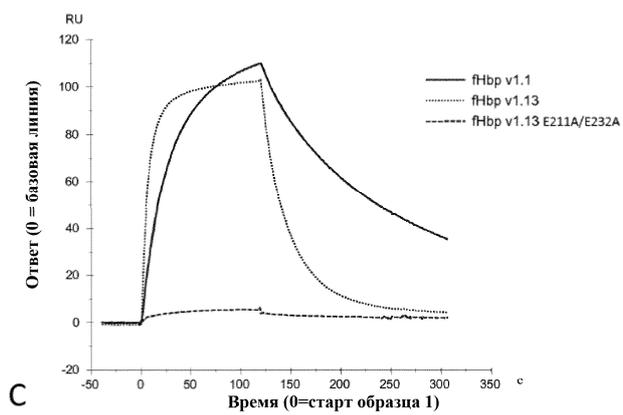
B



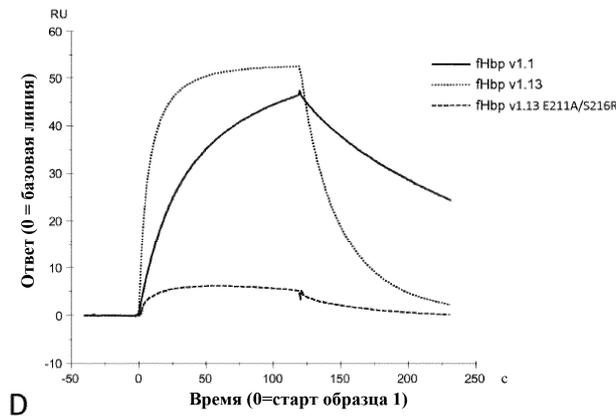
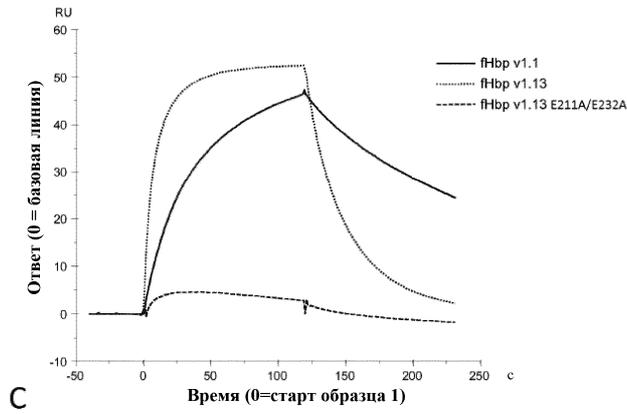
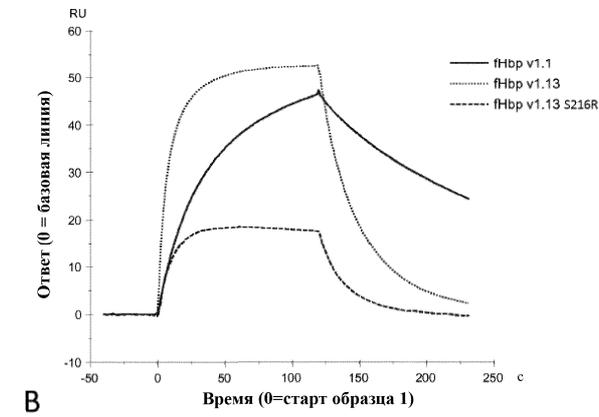
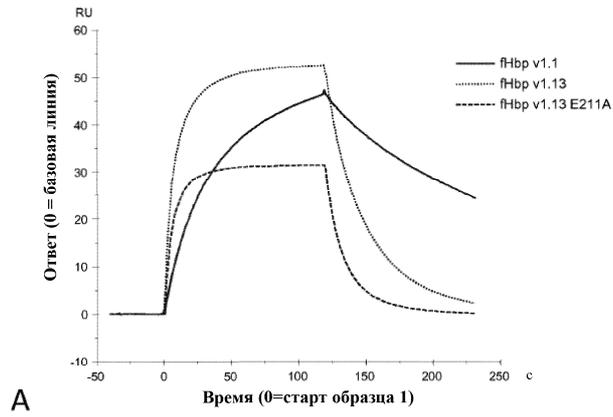
Фиг. 2



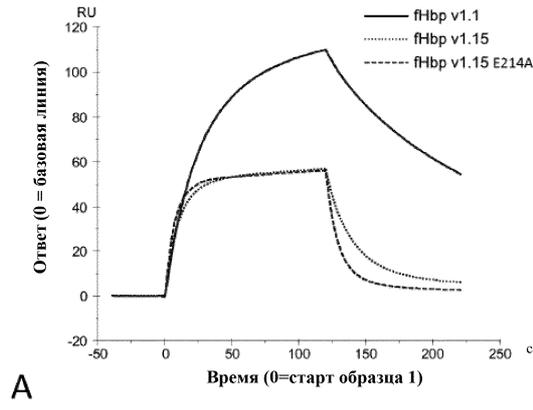
046480



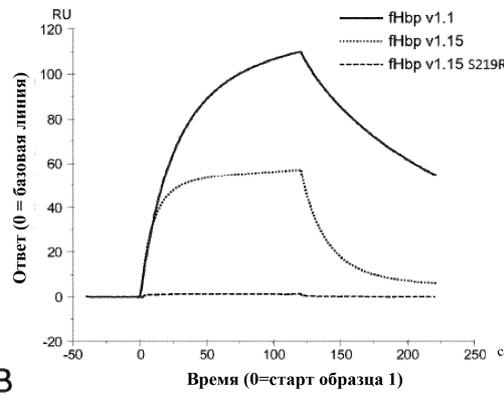
Фиг. 3



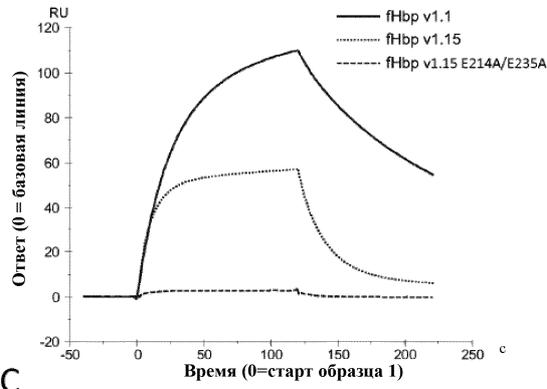
Фиг. 4



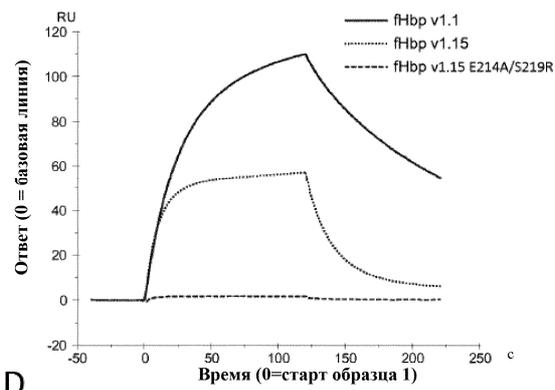
A



B

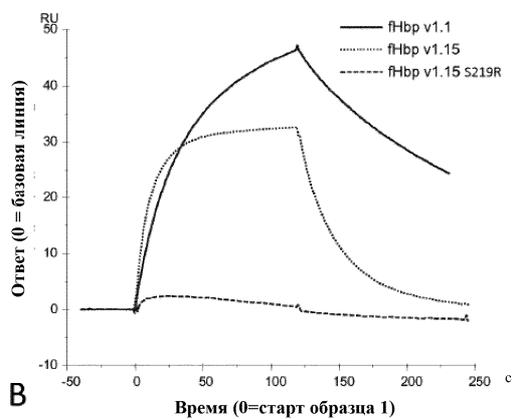
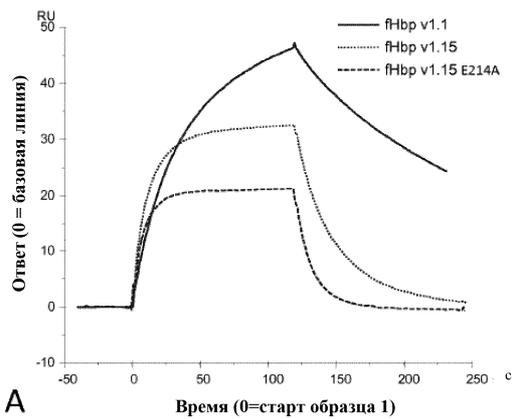


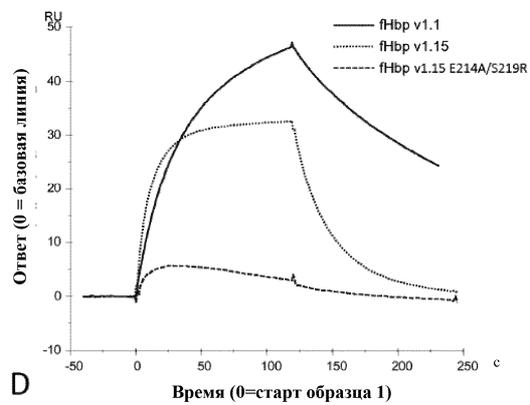
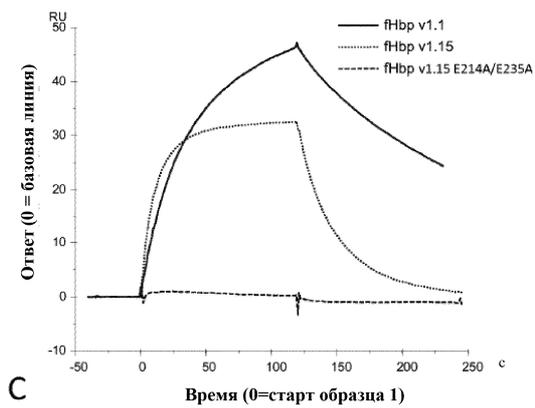
C



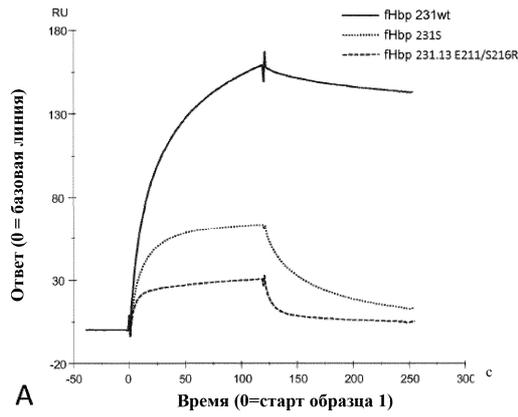
D

Фиг. 5

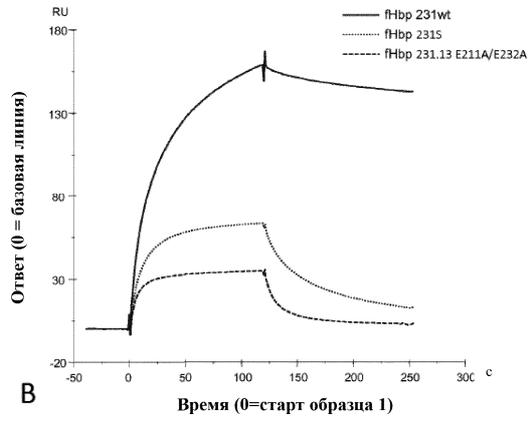




Фиг. 6

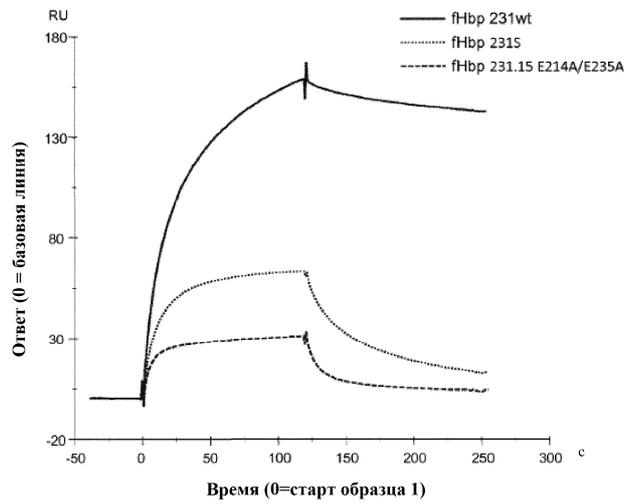


A

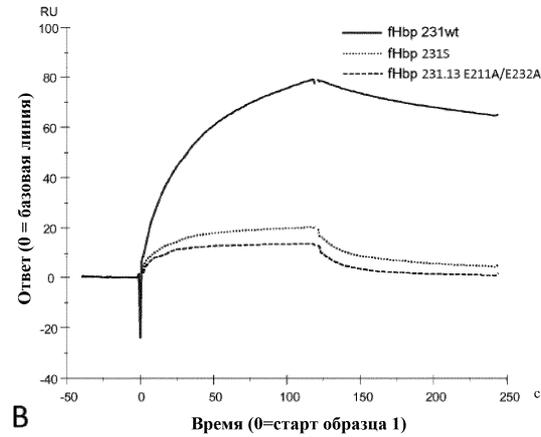
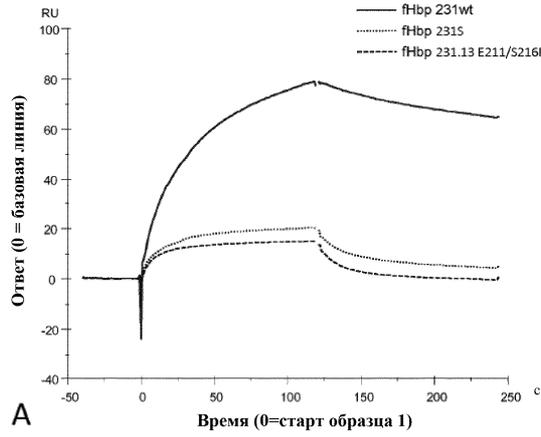


B

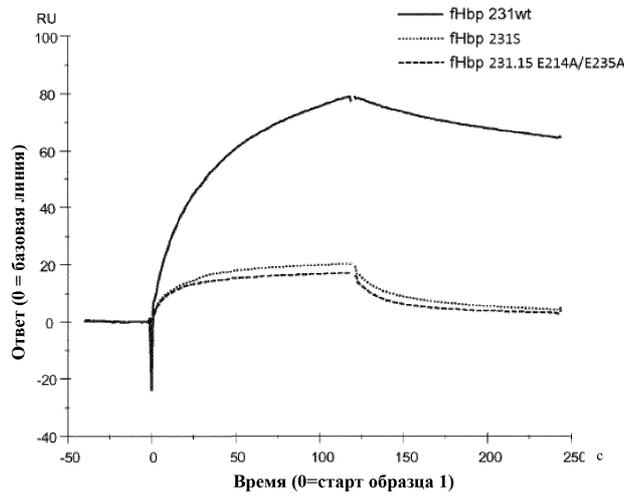
Фиг. 7



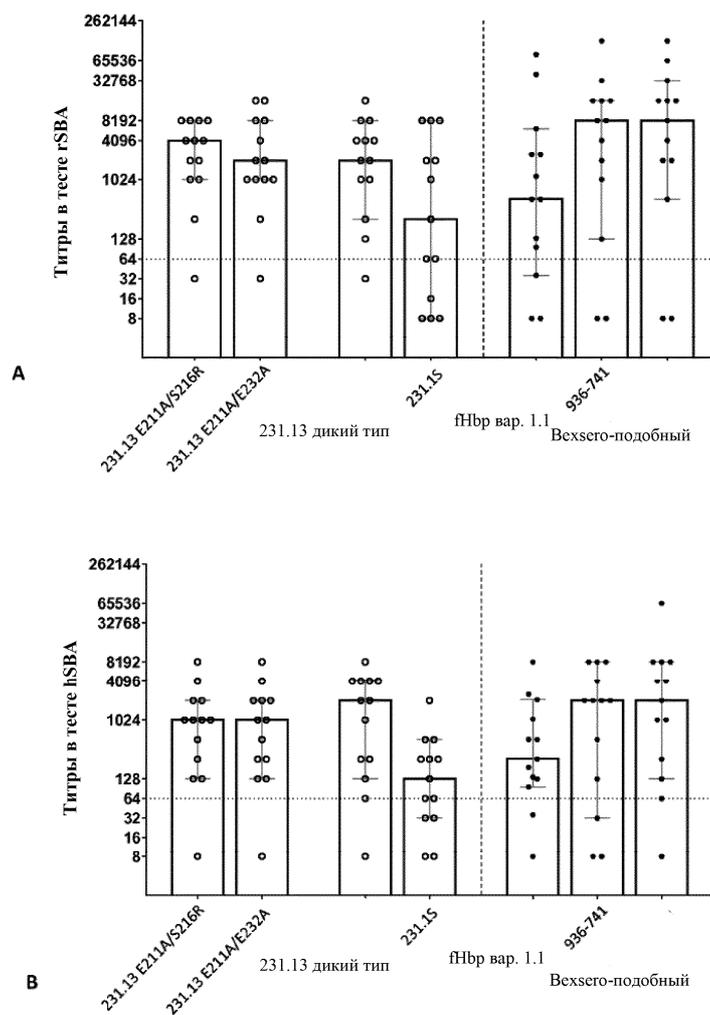
Фиг. 8



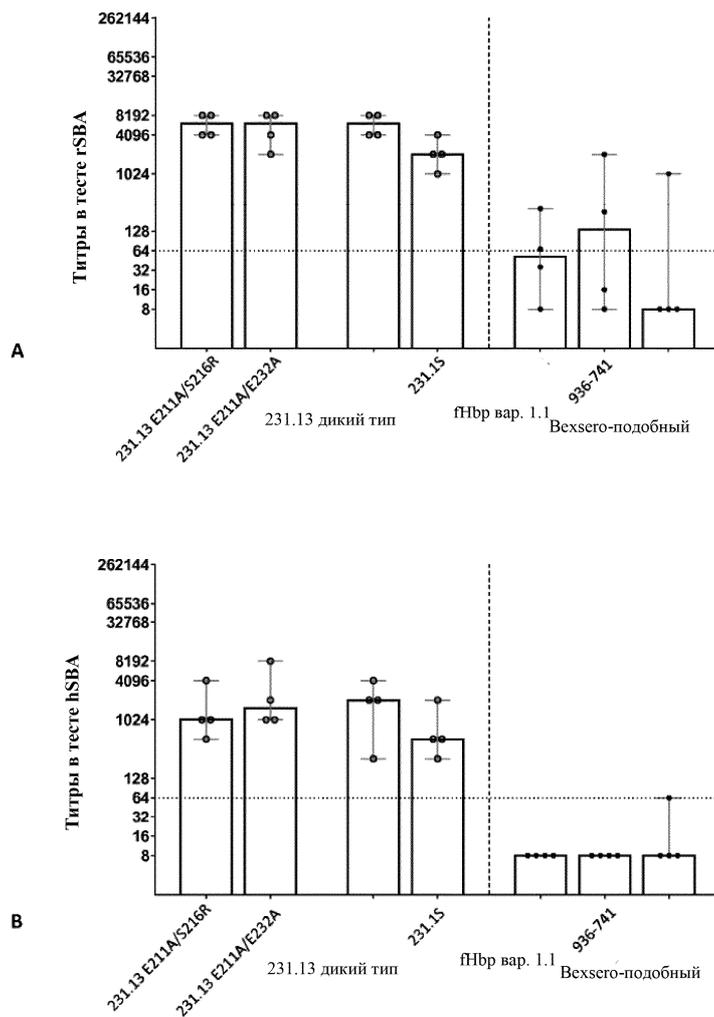
Фиг. 9



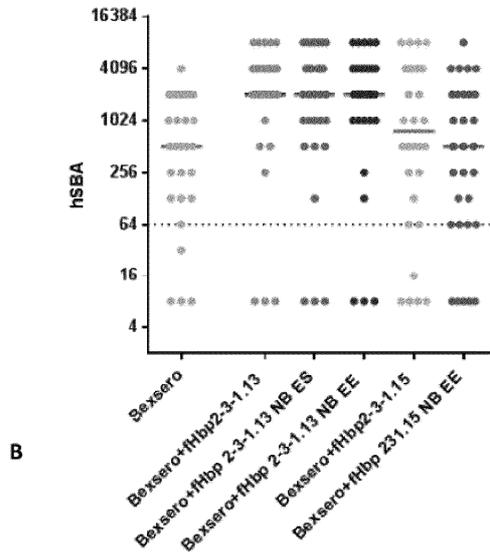
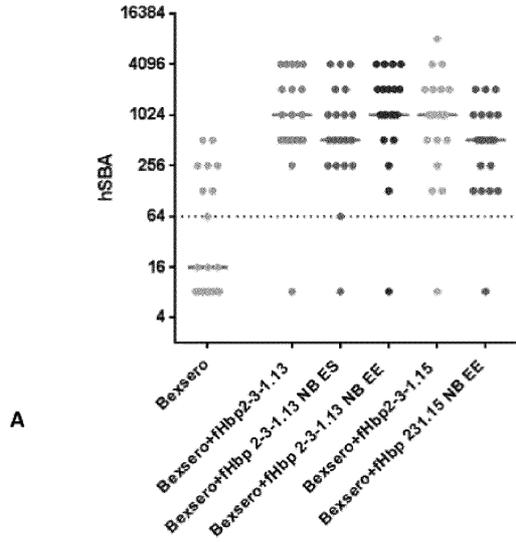
Фиг. 10



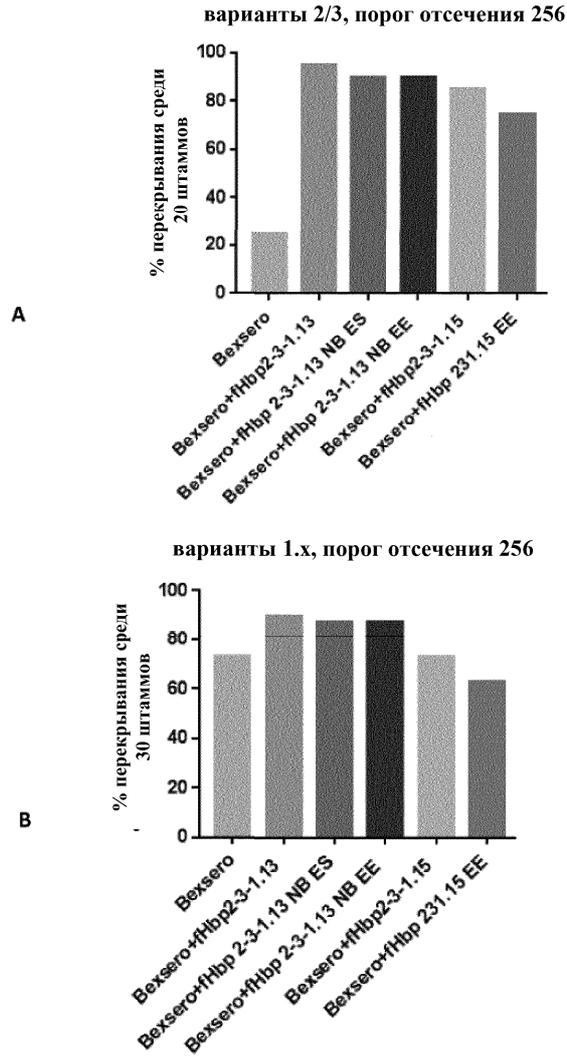
Фиг. 11



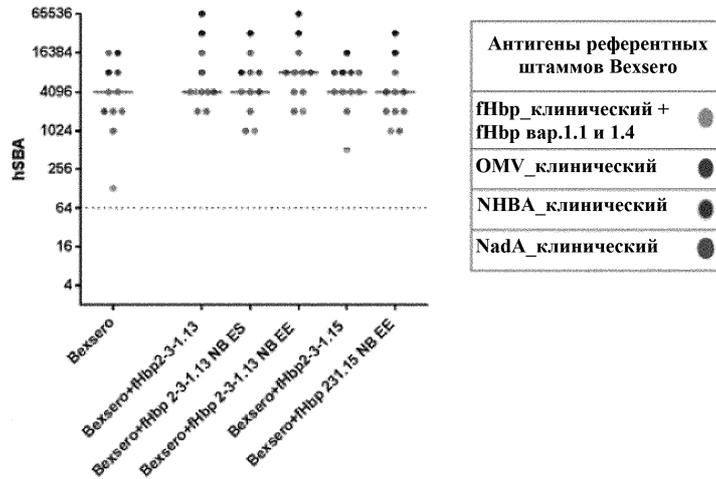
Фиг. 12



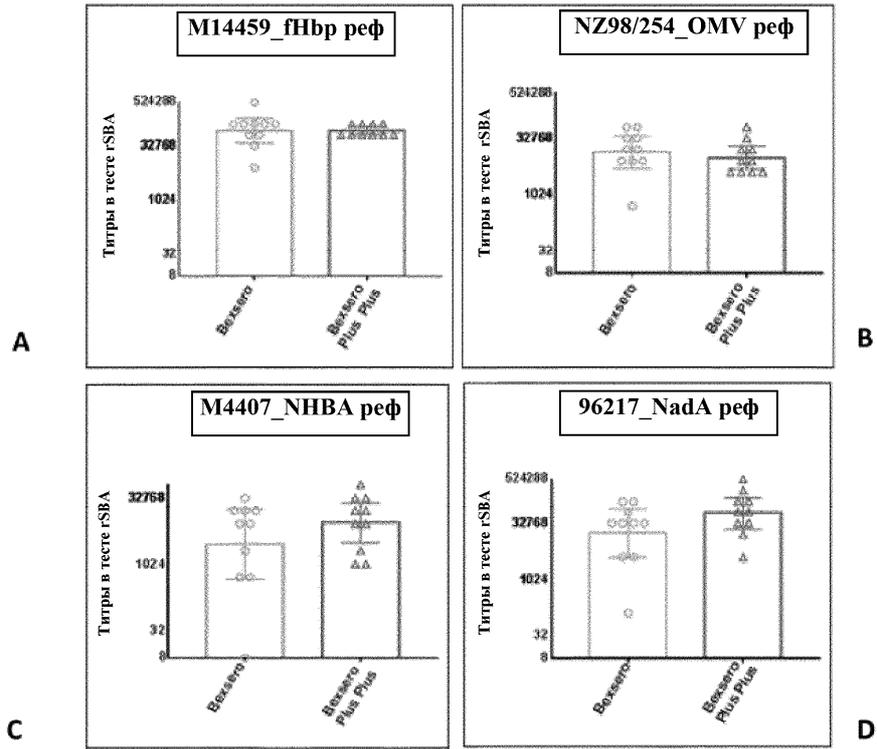
Фиг. 13



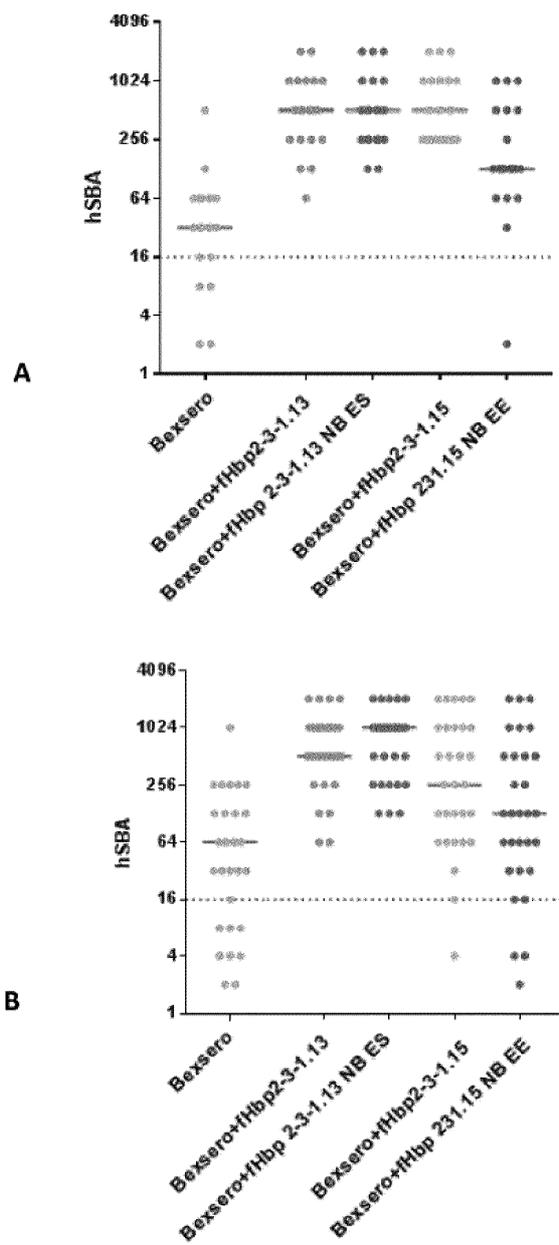
Фиг. 14



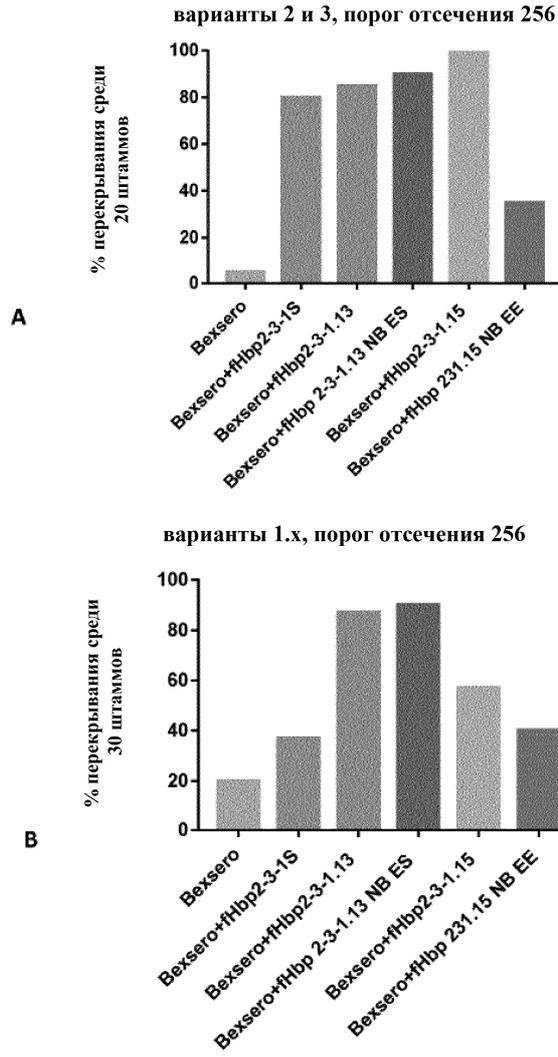
Фиг. 15



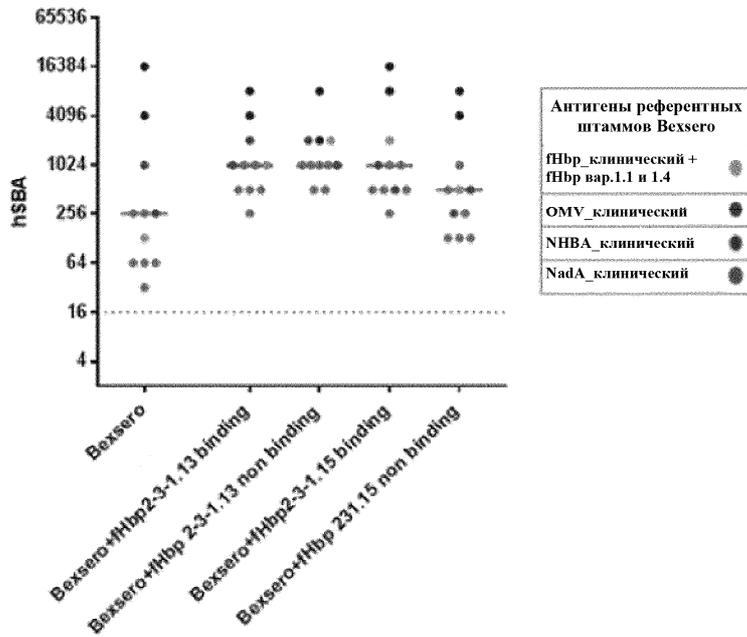
Фиг. 16



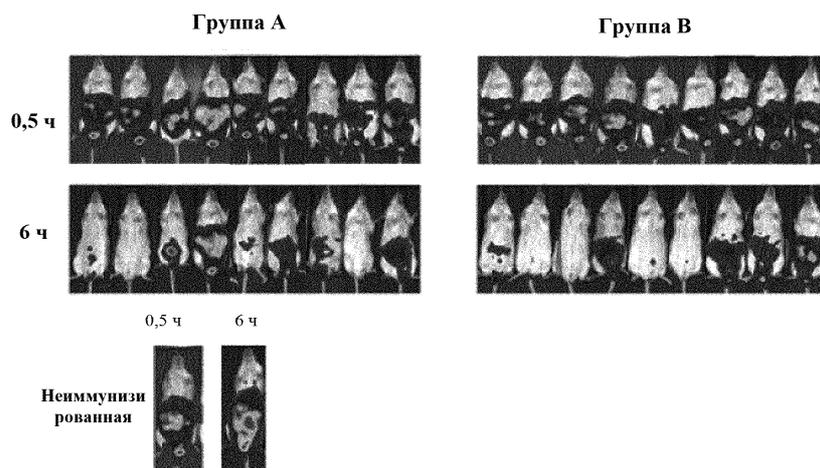
Фиг. 17



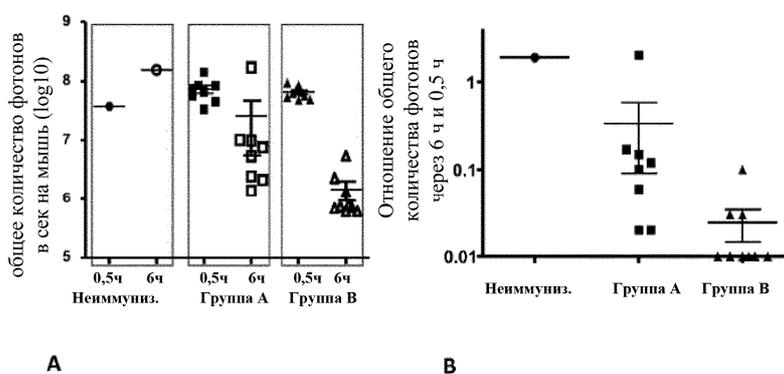
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

