



(51) МПК

A61K 39/095 (2006.01)*C12N 1/21* (2006.01)*C12N 1/36* (2006.01)*C12N 15/74* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2010153658/15, 01.06.2009**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.06.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.05.2008 US 61/057,462(43) Дата публикации заявки: **10.08.2012** Бюл. № 22(45) Опубликовано: **10.03.2013** Бюл. № 7(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US 2006/02450045 A1, 26.10.2006. EP**
1208214 B1, 15.11.2006. EP 1797894 A2,
20.06.2007. US 200300594444 A1, 27.03.2003.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **30.12.2010**(86) Заявка РСТ:
US 2009/045818 (01.06.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/158142 (30.12.2009)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"**

(72) Автор(ы):

**ЗОЛЛИНГЕР Уэнделл Дэвид (US),
ДОНЕЦ Михаил (US),
ШМИЛЬ Дебора (US),
ИОНИН Борис (US),
МАРКЕС Райан (US),
МОРАН Элизабет Эллен (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**ДЗЕ Ю.Эс.Эй., ЭС РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ
ДЗЕ СЕКРЕТАРИ ОФ ДЗЕ АРМИ, ОН
БЕХАФ ОФ УОЛТЕР РИД АРМИ (US)****(54) МУЛЬТИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА ИЗ НАТИВНЫХ ВЕЗИКУЛ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ
МЕНИНГОКОККОВ, СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, а именно к биофармацевтике, и может быть использована для приготовления вакцин. Для этого вакцина содержит: нативные везикулы наружной мембраны (NOMV), полученные по меньшей мере из двух штаммов менингококков, которые были генетически модифицированы для широкого спектра защиты, где нативные везикулы наружной мембраны включают различные наборы антигенов, где различные наборы антигенов содержат один или несколько белков PorA, один или несколько LOS и один или несколько

консервативных белков наружной мембраны; где генетически модифицированные штаммы были модифицированы для повышения безопасности путем инактивации генов *lpxL1*, *synX* и *lgtA* и где по меньшей мере один генетически модифицированный штамм экспрессирует по меньшей мере два различных подтипа белков или подтипа эпитопов PorA. Также предложен способ стимуляции иммунного ответа на менингококковую инфекцию, включающий в себя введение вакцинной композиции по настоящему изобретению. Группа изобретений обеспечивает защитный иммунитет против менингококковой инфекции,

предпочтительно инфекции, вызываемой
менингококками подтипа В. 4 н. и 45 з.п. ф-лы,

11 пр., 21 ил., 10 табл.

RU 2 4 7 7 1 4 5 C 2

RU 2 4 7 7 1 4 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 477 145** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 39/095 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010153658/15, 01.06.2009**

(24) Effective date for property rights:
01.06.2009

Priority:

(30) Convention priority:
30.05.2008 US 61/057,462

(43) Application published: **10.08.2012 Bull. 22**

(45) Date of publication: **10.03.2013 Bull. 7**

(85) Commencement of national phase: **30.12.2010**

(86) PCT application:
US 2009/045818 (01.06.2009)

(87) PCT publication:
WO 2009/158142 (30.12.2009)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**ZOLLINGER Uehndell Dehvid (US),
DONETs Mikhail (US),
ShMIL' Debora (US),
IONIN Boris (US),
MARKES Rajan (US),
MORAN Ehliizabet Ehllen (US)**

(73) Proprietor(s):

**DZE Ju.Ehs.Ehj., EhS REPRESENTED BAJ DZE
SEKRETARI OF DZE ARMI, ON BEKhAF OF
UOLTER RID ARMI (US)**

(54) **MULTIVALENT VACCINE OF NATIVE VESICLES OF MENINGOCOCCAL OUTER MEMBRANE,
METHOD FOR MAKING AND USING IT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine, namely biopharmaceuticals, and may be used for making vaccines. For this purpose, the vaccine contains: native outer membrane vesicles (NOMV) prepared of at least two meningococcal strains which are genetically modified for a wide safety spectrum, wherein the native outer membrane vesicles contain various antigen sets, wherein the various antigen sets contain one or more PorA proteins, one or more LOS and one or more conservative outer membrane proteins; wherein the genetically modified stains are

modified for providing higher safety by lpxLL, synX and lgtA gene inactivation; and wherein at least one genetically modified stain expresses at least two various protein subtypes or PorA epitope subtypes. There are also presented a method for stimulating an immune response to meningococcosis involving the introduction of the vaccine composition under the present invention.

EFFECT: group of inventions provides protective immunity against meningococcosis, preferentially subtype B meningococcosis.

49 cl, 11 ex, 21 dwg

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США номер 61/057462, озаглавленной «МУЛЬТИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА ИЗ НАТИВНЫХ ВЕЗИКУЛ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ МЕНИНГОКОККОВ» и поданной 30 мая 2008 г., полное описание и содержание вышеуказанной заявки, таким образом, полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Федеральная поддержка исследования или разработки

Правительство США имеет права на настоящее изобретение.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Neisseria meningitidis является основной причиной менингита и септицемии во всем мире. Менингококковый менингит представляет собой воспаление мягких оболочек мозга, оболочки, выстилающей головной мозг и спинной мозг. Как при менингококковой септицемии, так и при менингококковом менингите поражение вызвано неконтролируемым местным или системным воспалительным ответом хозяина. Заболевание, вызываемое менингококками группы В, в настоящее время является причиной по меньшей мере половины всех вызванных менингококками заболеваний во многих странах, включая Северную и Южную Америку и Европу. Возникновение нового вирулентного клона *Neisseria meningitidis* группы В, известного как ET5, в Норвегии в конце 70-х годов с тех пор стало ответственным за продолжительные эпидемии в Норвегии, на Кубе, в Бразилии и Чили. Эти эпидемии вызвали серьезную опасность для общественного здравоохранения и значительно усилили попытки разработки эффективной вакцины против группы В в нескольких странах с эпидемией. Отсутствие лицензированной в США вакцины против группы В наряду со слабым эффектом вакцин, состоящих из капсульных полисахаридов А и С, на детей младше 18 месяцев препятствует принятию решения о повсеместной вакцинации детей против менингококковых инфекций.

Neisseria meningitidis разделяют на 13 серогрупп, из которых 9 вызывают инвазивное заболевание (А, В, С (C1, C1-), Х, Y, W-135, Z, и L). Пять серотипов являются мишенями для разработки вакцин из-за их способности вызывать эпидемии, включая серотипы А, В, С, Y и W135, являющиеся мишенью большого числа исследований для создания вакцин.

Вакцины против серогрупп А, С, Y и W135 *Neisseria meningitidis*, вызывающих почти все инвазивные менингококковые инфекции, являются доступными и общепринятыми для использования с отличными результатами. Разработка подходящей вакцины против штаммов *Neisseria meningitidis* группы В более значительно затруднена множеством причин. Например, капсульный полисахарид, определяющий серогруппу, неэффективен и потенциально небезопасен для использования в вакцине, поскольку обладает такой же структурой, как полисиаловая кислота, обнаруженная на определенных клетках человека, а именно клетках крови.

Кроме того, дополнительным фактором невозможности создания подходящей вакцины является антигенная изменчивость и/или непостоянная экспрессия у разных штаммов группы В субкапсульных антигенов, экспонированных на поверхности, таких как белки наружной мембраны и липоолигосахарид (эндотоксин). Не было идентифицировано ни одного антигена, который бы обладал всеми характеристиками, необходимыми для создания эффективной вакцины.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей

нативные везикулы наружной мембраны менингококков (NOMV), полученные по меньшей мере из двух штаммов менингококков, генетически модифицированных для обеспечения широкого спектра защиты. Нативные везикулы наружной мембраны менингококков включают три различных набора антигенов на основе PorA, LOS и консервативных белков наружной мембраны; и генетически модифицированные штаммы модифицированы для обеспечения повышения безопасности путем инактивации генов *lpxL1*, *synX* и *lgtA*. Оба штамма менингококков могут экспрессировать LOS с различной коровой структурой LOS и иметь альфа-цепи, состоящие из глюкозы и галактозы. Каждый штамм может экспрессировать по меньшей мере два различных подтипа белков или подтипа эпитопов PorA, которые выбраны на основе подтипов PorA, преобладающих у изолятов группы В. Кроме того, вакцина может дополнительно содержать другой консервативный поверхностный белок, который, как известно, может индуцировать бактерицидные антитела, со сверхэкспрессией в каждом штамме и выбранный из группы, состоящей из вариантов 1 FHBP (GNA1870), вариантов 2 FHBP и вариантов 3 FHBP; NadA; App; NspA; TbpA и TbpB.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к комбинации NOMV из трех генетически модифицированных штаммов *Neisseria meningitidis*, обладающих антигенной изменчивостью. По меньшей мере один из штаммов выбран из (1) H44/76 HOPS-DL, который обладает следующими генетическими модификациями или характеристиками: гены *synX*, *lpxL1* и *lgtA* инактивированы; инсерция второго гена *porA* (подтип P1.7-1,1) вместо *opaD*, повышена экспрессия NadA; и стабилизирована высокая экспрессия Opc и PorA; (2) 8570 HOPS-G_AL, обладающего следующими генетическими модификациями или характеристиками: гены *synX*, *lpxL1* и *lgtA* инактивированы; инсерция второго гена *porA* вместо *opaD*, повышена экспрессия варианта 1 белка, связывающего фактор H; и стабилизирована высокая экспрессия PorA и Opc; и/или (3) B16B6 HPS-G₂A, обладающего следующими генетическими модификациями или характеристиками: гены *synX*, *lpxL1* и *lgtA* инактивированы; инсерция второго гена *porA* вместо *opaD*, повышена экспрессия варианта 2 белка, связывающего фактор H; и стабилизирована высокая экспрессия PorA и Opc. NOMV получают без обработки детергентом или денатурирующими растворителями из клеточной массы или из истощенной культуральной среды. Вакцину можно комбинировать с одним или несколькими адъювантами и можно вводить внутримышечно и/или интраназально.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции вакцины против менингококковой инфекции, более предпочтительно инфекции, вызванной менингококками группы В, содержащей нативные везикулы наружной мембраны менингококков (NOMV) одного или нескольких генетически модифицированных штаммов *Neisseria meningitidis*. Один или несколько генетически модифицированных штаммов модифицированы посредством: инактивации гена *synX*, инактивации гена *lpxL1*, инактивации гена *lgtA* в каждом штамме, приводящей к экспрессии укороченных или усеченных липоолигосахаридов (LOS) с отсутствием тетрасахарида лакто-N-неотетраозы, и/или инсерции по меньшей мере одного второго гена *porA*, отличающегося по антигенным свойствам, вместо гена *opa*. В другом аспекте генетически модифицированный штамм дополнительно обладает повышенной или стабильной экспрессией по меньшей мере одного минорного консервативного белка наружной мембраны, и/или стабилизированной экспрессией по меньшей мере одного белка наружной мембраны. По меньшей мере один второй ген *porA*, отличающийся

по антигенным свойствам, может экспрессировать по меньшей мере один подтип белка или подтип эпитопа PorA, выбранный из наиболее распространенных подтипов PorA изолятов *meningitidis* группы B.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированному вакцинному штамму *Neisseria meningitidis* подтипа B. Генетически модифицированный вакцинный штамм может включать штамм H44/76 HOPS-D (B1), штамм 8570 HOS-G1 (B2) и/или штамм B16B6 HPS-G₂A (B3).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированному вакцинному штамму *Neisseria meningitidis* подтипа B, полученному из: штамма H44/76, который имеет следующие генетические модификации: i) ген *synX* инактивирован, ii) ген *lpxL1* инактивирован, iii) ген *lgtA* инактивирован, iv) инсерция второго гена *porA* вместо гена *opaD*, v) экспрессия NadA по сравнению с нативным штаммом повышена и vi) стабилизирована повышенная экспрессия белков Орс и PorA. В некоторых аспектах генетически модифицированный штамм получен из штамма дикого типа ET-5 H44/76 (B:15: P1.7,16: L,3,7:P5.5,C).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированному вакцинному штамму из штамма *Neisseria meningitidis* подтипа B, полученному из 8570, который обладает следующими генетическими модификациями из: i) ген *synX* инактивирован, ii) ген *lpxL1* инактивирован, iii) ген *lgtA* инактивирован, iv) инсерция второго гена *porA* вместо *opaD*, v) повышена экспрессия варианта 1 белка, связывающего фактор H; и vi) стабилизирована повышенная экспрессия белков PorA и Орс. В некоторых аспектах генетически модифицированный штамм получен из штамма дикого типа ET-5 85 70(B:4: P 1.19,15: L3,7v: P5.5,11,C).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированному вакцинному штамму *Neisseria meningitidis* подтипа B, полученному из B16B6, который имеет следующие генетические модификации: i) ген *synX* инактивирован, ii) ген *lpxL1* инактивирован, iii) ген *lgtA* инактивирован, iv) инсерция второго гена *porA* (подтип P1.22-1,4) вместо *opaD*, v) повышена экспрессия варианта 2 белка, связывающего фактор H; и vi) стабилизирована повышенная экспрессия белков PorA и Орс. В некоторых аспектах генетически модифицированный штамм получен из штамма дикого типа ET-37 B16B6 (B:2a:P 1.5,2: L2:P5.1,2,5).

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к генетически модифицированному штамму, выращенному на среде с дефицитом железа.

В других аспектах настоящее изобретение относится к генетически модифицированному штамму, где инактивацию гена *synX*, гена *lpxL1* или гена *lgtA* осуществляют посредством введения гена устойчивости к лекарственному средству в последовательность инактивированного гена.

В другом аспекте изобретение относится к вакцине, содержащей NOMV, полученные из генетически модифицированных штаммов по настоящему изобретению. NOMV получают из клеточной массы или из использованной культуральной среды без обработки детергентом или денатурирующим растворителем. Вакцина может также содержать один или несколько адъювантов. В других аспектах генетически измененный штамм модифицирован так, что экспрессирует белки накопления железа.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к вакцине против

менингококковой инфекции, содержащей множество нативных везикул наружной мембраны менингококков (NOMV), где по меньшей мере некоторые из NOMV по существу не экспрессируют или не сialiруют липоолигосахарид (LOS), содержат LOS, который включает липид А с пента-ацильной структурой, и имеют 5 повышенный уровень экспрессии по меньшей мере одного минорного консервативного белка наружной мембраны, где минорный консервативный белок наружной мембраны выбран из белков, индуцирующих бактерицидные антитела. Минорный консервативный белок наружной мембраны может быть выбран из 10 группы, состоящей из Nad А, варианта 1 белка, связывающего фактор Н (FHBP) и варианта 2 FHBP. В других аспектах по меньшей мере некоторые из NOMV содержат укороченный или усеченный LOS, по существу не имеющий тетрасахарид лакто-N-неотетраозу (LNNТ) и/или по меньшей мере некоторые из NOMV содержат два или более различных белков PorA.

15 В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу стимуляции иммунного ответа в ответ на менингококковую инфекцию у животного или человека, включающему введение композиции, содержащей NOMV по меньшей мере из одного генетически измененного штамма *N. Meningitidis*, животному или человеку для 20 иммунизации против менингококковой инфекции. Вакцину используют для иммунизации против инфекции, вызываемой менингококками группы В.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения генетически модифицированного штамма *N. Meningitidis*, который можно 25 использовать в вакцине против менингококковой инфекции, включающему стадии: а) выбора штамма менингококка типа В, способного к генетической модификации; b) генетической модификации штамма путем инактивации гена *synX*, с) генетической модификации штамма путем инактивации гена *lpxL1*, d) генетической модификации штамма путем инактивации гена *lgtA* и е) генетической модификации штамма путем 30 повышения экспрессии одного или нескольких консервативных белков наружной мембраны. В других аспектах изобретения способ дополнительно включает генетическую модификацию штамма путем инсерции по меньшей мере одного второго гена *porA*, отличающегося по антигенным свойствам, в открытую рамку считывания гена *opa*. В других аспектах изобретения способ дополнительно 35 включает стадию генетической модификации штамма для получения стабильной экспрессии или сверхэкспрессии по меньшей мере одного белка наружной мембраны посредством замены поли-С последовательности внутри промотора или открытой рамки считывания по меньшей мере одного белка наружной мембраны 40 последовательностью, содержащей нуклеотиды G и C.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения вакцины против менингококковой инфекции, включающему стадии: а) культивирования генетически модифицированного штамма *N. meningitidis*, обладающего одной или 45 несколькими модификациями, выбранными из группы, состоящей из ген *synX* инактивирован, ген *lpxL1* инактивирован, ген *lgtA* инактивирован, введен по меньшей мере один второй ген *porA* с антигенными отличиями вместо гена *opa*, экспрессия по меньшей мере одного минорного консервативного белка наружной мембраны, повышена или стабильна, и/или стабильна экспрессия по меньшей мере 50 одного белка наружной мембраны; b) увеличения размеров культуры посредством ферментации, используя культивированный штамм подпункта а), для инокуляции среды в ферментере; с) инактивации ферментированной культуры; d) сбора культивированных клеток *N. meningitidis* путем центрифугирования с непрерывным

потоком и сбора клеточной массы; е) выделения NOMV из клеточной массы и f) ресуспендирования NOMV в буфере или носителе, подходящем для введения вакцины.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1 представляет собой схему технологического процесса, обозначающую получение основного банка клеток из клеток для генетически модифицированных штаммов *Neisseria* для получения вакцины.

Фигура 2 представляет собой схему технологического процесса, обозначающую получение препарата банка клеток, применяемого для продукции генетически модифицированных штаммов *Neisseria* для получения вакцины.

Фигура 3 представляет собой схему технологического процесса, обозначающую ферментацию *Neisseria*, используемую для получения генетически модифицированных штаммов *Neisseria* для получения вакцины.

Фигура 4 представляет собой схему технологического процесса, обозначающую очистку NOMV из генетически модифицированных штаммов *Neisseria* для получения вакцины.

Фигура 5 представляет собой продолжение схемы технологического процесса фигуры 4.

Фигура 6 представляет собой изображение геля, окрашенного Кумасси синим, показывающего белковое содержание стандартного маркера (дорожка 1), контрольного препарата NOMV 8570 HOPS-G (дорожка 2), фильтрованной неочищенной вакцины (дорожка 3) и конечного продукта вакцины (дорожка 4).

Фигура 7 представляет собой гель, окрашенный серебром, показывающий содержание липоолигосахарида в вакцине. Дорожка 1 представляет собой контрольный ML5 LPS, дорожка 2 представляет собой фильтрованную неочищенную вакцину, и дорожка 3 представляет собой конечный продукт вакцины. Пятнадцать мкл разведения 1:2 100 мкг/мл вакцины разделяли в геле (20 мкл из 100 мкл/мл 1:2 разведения контроля).

Фигура 8 представляет собой изображение окрашенного антителом Вестерн-блота, показывающего идентичность и состав белков, обнаруженных в вакцине 8570 HOPS-G NOMV.

Фигура 9 представляет собой график, изображающий TNF- α , высвобождаемый из крови человека после инкубации с различными концентрациями вакцины.

Фигура 10 представляет собой график, на котором показано высвобождение IL-6 из крови человека после инкубирования с различными концентрациями генетически модифицированной вакцины NOMV.

Фигура 11 представляет собой график, на котором показан TNF- α , высвобождаемый из крови человека после инкубации с различными концентрациями генетически модифицированной вакцины по сравнению с DOC-экстрагированными OMV из штамма 44/76.

Фигура 12 представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показаны бактерицидные титры у мышей, вакцинированных различными концентрациями вакцины 8570 HOPS-G с адъювантом или без.

Фигура 13 представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показаны бактерицидные титры у мышей, вакцинированных вакциной 8570 HOPS-G, против различных тестируемых штаммов.

Фигура 14 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа истощения бактерицидных антител для антигенов LOS, GNA1870, NOMV и Орс.

На фигуре 15 показан ответ антител у кроликов, вакцинированных вакциной 8570

HOPS-G NOMV с адьювантом и без.

Фигура 16 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа бактерицидного истощения для тестируемых штаммов против вакцины 8570 HOPS-G1 NOMV.

Фигура 17 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа бактерицидного истощения для антигенов LOS и FHBP для штамма 8570 HOPS-G1 с нокаутом PorA.

На фигуре 18 представлен фенотип трех генетически модифицированных штаммов *Neisseria* (A=B1, B=B2 и C=B3) по настоящему изобретению.

На фигуре 19 представлены плазмиды, используемые для конструирования генетически модифицированных штаммов *Neisseria*: а) плазида, сконструированная для нокаута *lgtA*, б) плазида для экспрессии второго PorA, с) плазида для сверхэкспрессии fHbp под контролем ортологичного (Ptac в случае *E. coli*) промотора и d) плазида для сверхэкспрессии NadA под контролем гомологичного промотора (промотор PorA *N. meningitidis*) и е) характерная схема трансформации *N. meningitidis* плазмидой для сверхэкспрессии fHbp (вариант 1 и 2) и NadA посредством замены гена *NspA* гомологичной рекомбинацией.

Фигура 20а представляет собой изображение стабилизации иммунотипа с усеченным LOS вакцинного штамма NOMV посредством нокаута гена *lgtA* трех генетически модифицированных штаммов. На фигуре 20b представлен иммуноблоттинг экспрессии альфа-цепи LOS генетически измененным штаммом B2 и родительским штаммом (B16B6) с моноклональными антителами против L3.7,9 (слева) и L8 (справа).

На фигуре 21 графически показана экспрессия варианта 2 fHbp в генетически модифицированном штамме B3. На фигуре 21a показан выбор штамма, содержащего устойчивый к гентамицину рекомбинант, содержащий сверхэкспрессированный fHbp, посредством иммуноблоттинга, и фигура 21b представляет собой Вестерн-блоттинг с использованием моноклонального антитела против fHbp JAR4, показывающий повышенную экспрессию fHbp.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композиции вакцины с широким спектром защиты, используемой для иммунизации против инфекции, вызываемой менингококками, более предпочтительно подгруппой *Neisseria meningitidis* типа В. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции вакцины, содержащий нативные везикулы наружной мембраны менингококков (NOMV) по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, более предпочтительно по меньшей мере трех генетически модифицированных штаммов *Neisseria meningitidis*. Нативные везикулы наружной мембраны менингококков, называемые также пузырьками, представляют собой везикулы, сформированные или полученные из фрагментов наружной мембраны грамотрицательной бактерии, которые естественным образом отделяются во время роста и которые можно получить из культуральной среды или из клеток неагрессивными способами, в которых не применяются детергенты или денатурирующие растворители. Эти NOMV, как правило, содержат белки наружной мембраны (OMP), липиды, фосфолипиды, периплазматический материал и липополисахарид (LPS), в том числе липоолигосахариды. Грамотрицательные бактерии, особенно патогены, подобные *N. meningitidis*, часто передают NOMV при вирулентном инфицировании процессом, известным как пузырение. В соответствии с

настоящим изобретением NOMV представляют собой везикулы, полученные из наружной мембраны бактерий без использования способов химической денатурации и полученные из генетически модифицированных штаммов, которые обладают антигенным разнообразием и каждый из которых генетически модифицирован с целью повышения безопасности, антигенной стабильности и расширения защитного иммунного ответа.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции вакцины, содержащей нативные везикулы наружной мембраны менингококков (NOMV), полученные по меньшей мере из двух или более генетически модифицированных штаммов *N. meningitidis*, предпочтительно по меньшей мере из трех различных генетически модифицированных штаммов.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к штаммам *N. meningitidis* с антигенным разнообразием, предпочтительно подтипа В, содержащим по меньшей мере три генетических модификации в бактериальном геноме, более предпочтительно по меньшей мере пять генетических модификаций, более целесообразно по меньшей мере шесть генетических модификаций.

Генетические модификации могут включать одну или несколько из следующих модификаций: 1) инактивацию гена *synX*, необходимого для биосинтеза сиаловой кислоты, что приводит к потере способности экспрессировать или сиалировать липоолигосахарид (LOS) в капсуле; 2) инактивацию гена *lpxL1*, что приводит к значительно меньшей токсичности LOS, имеющего липид А с пента-ацильной структурой; 3) инсерцию второго гена *porA*, отличающегося по антигенным свойствам, вместо генов *opa* (*OpaC* или *OpaD*); 4) повышение экспрессии по меньшей мере одного минорного консервативного белка наружной мембраны, где минорный консервативный белок наружной мембраны обладает способностью индуцировать бактерицидные антитела (в качестве неограничивающих примеров, NadA, вариант 1 белка, связывающего фактор Н (FHBP), и вариант 2 (FHBP); 5) инактивацию гена *lgtA* в каждом штамме, что приводит к экспрессии укороченного или усеченного LOS, у которого отсутствует тетрасахарид лакто-N-неотетраозы (LNnT); и/или 6) стабилизированной экспрессии конкретных белков наружной мембраны, таких как Орс и PorA, ответственных за фазовые варианты штаммов дикого типа.

Настоящее изобретение относится к генетически модифицированным штаммам, обеспечивающим как повышенную безопасность использования, так и увеличение широты защитного ответа антител на менингококковые инфекции. В одном из вариантов осуществления генетически модифицированные штаммы обеспечивают повышенную безопасность посредством включения по меньшей мере одной из следующих мутаций в бактериальный геном: делеции гена *synX*, что блокирует синтез сиаловой кислоты капсулы и приводит к формированию отрицательного капсульного фенотипа NOMV, делеции гена *lpxL1*, уменьшающей активность эндотоксина, приводя к пента-ацильной структуре липида А, и/или делеции гена *lgtA*, блокирующей биосинтез лакто-N-неотетраозы на липоолигосахаридах (LOS), что стабилизирует усеченную структуру LOS; более предпочтительно генетически модифицированные штаммы предоставляют две из этих мутаций, наиболее предпочтительно генетически модифицированные штаммы предоставляют все три эти мутации. В другом варианте осуществления настоящего изобретения генетически модифицированные штаммы обладают увеличенной широтой защитного ответа антител из-за нацеливания по меньшей мере на один из трех наборов возможных защитных антигенов, содержащихся в NOMV. Три возможных для нацеливания

антигена включают по меньшей мере одно из следующего: белок PorA, по меньшей мере один консервативный минорный белок и/или коровая структура LOS, и включают любое их сочетание. В более предпочтительных вариантах осуществления генетически модифицированный штамм нацелен по меньшей мере на два из
 5 возможных защитных антигенов, наиболее предпочтительно нацелен на все три возможных защитных антигена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутацию *synX*- (инактивация гена *synX*) вводили в генетически модифицированный штамм способом,
 10 как описано в патенте США 6558677, полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки. В кратком изложении, плазмиду на основе pUC19, содержащую ген *synX*, в котором последовательность 200 п.о. заменена на ген устойчивости к канамицину, использовали для трансформации генетически модифицированного штамма. Устойчивые к Кап трансформанты
 15 отбирали и тестировали посредством ПЦР по присутствию поврежденного гена *synX* и по отрицательному капсульному фенотипу. Этот *synX*-мутант сконструирован на основании результатов и информации о последовательности, опубликованной Swartley и Stephens (Swartley and Stephens (1994) J. Bacteriol. 176: 1530-
 20 1534), которые показали, что вставка транспозона в ген *synX* приводит к отрицательному капсульному фенотипу. Такую же или эквивалентную мутацию можно вводить в любой поддающийся трансформации штамм *N. meningitidis*. Подходящая плаزمида для использования для трансформации менингококков была сконструирована с использованием следующего способа. Три последовательности
 25 ДНК соединяли с использованием слияния способом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с элонгацией перекрывающихся фрагментов (SOE) (Horton et al. (1989) Gene 77: 61-65). Три последовательности включали, в следующем порядке, начиная с 5'-конца, *synXB*, основания 67-681; ген устойчивости к канамицину из pUC4K (Pharmacia LKB
 30 Biotech Co.), 671-1623; и *synxB*, основания 886-1589. Кроме того, на 5'-конце добавляли предположительную последовательность для накопления, ACCGTCTGAA, посредством включения ее на конце праймера для ПЦР, применяемого для амплификации последовательности оснований 67-691 *synXB*. Полную конструкцию амплифицировали посредством ПЦР, очищали и лигировали по тупым концам
 35 в pUC19. pUC19 использовали для трансформации *Escherichia coli* DH5α и отбирали на LB с агаром с 50 мкг канамицина. Отбирали устойчивую к канамицину колонию, ДНК выделяли, очищали и расщепляли XbaI. Другую копию предположительной последовательности для накопления лигировали в полилинкер и полученную
 40 плазмиду опять использовали для трансформации *E. coli* DH5α, и проводили скрининг устойчивых к канамицину колоний посредством ПЦР по присутствию дополнительной последовательности для накопления. Плазмидную ДНК выделяли из отобранной колонии и использовали в качестве матрицы для ПЦР с использованием праймеров, амплифицирующих только часть вставки из плазмиды,
 45 исключая ген устойчивости к ампициллину, который не следует вводить в *N. meningitidis*. Затем амплифицированную ДНК очищали и использовали для трансформации генетически модифицированного штамма *N. meningitidis*. Мутант *synX*(-) *N. meningitidis* отбирали по устойчивости к канамицину и подтверждали амплификацией ПЦР модифицированной области.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ген *lpxL1* инактивировали в генетически модифицированных штаммах для получения LOS с уменьшенной эндотоксичностью, экспрессированного на NOMV в композициях

вакцины. Липид А из LOS *N. meningitidis* обычно представляет собой гекса-ацильную структуру и является ответственным за эндотоксические свойства LOS. Две вторичные жирные кислоты, связанные ацил-окси-ацилом, присутствующие в липиде А, являются важными для эндотоксической активности. Генетически модифицированный штамм включает мутант *lpxL1*, как описано van der Ley и соавторами (van der Ley, P., Steeghs, L., Hamstra, HJ., van Hove, J., Zomer, B., and van Alphen, L. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infection and Immunity* 69(10), 5981-5990, 2001). Делеция гена *lpxL1* приводила к экспрессии нормальных уровней пента-ацильного LOS с сильно уменьшенной эндотоксичностью, как тестировали и посредством теста на пирогенность у кроликов, и посредством анализа высвобождения цитокинов с использованием моноцитов человека из цельной крови. Другие способы нарушения функции гена *lpxL1* предусмотрены в нижеприведенных вариантах осуществления настоящего способа для разработки генетически модифицированных штаммов.

В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированный штамм содержит инсерцию второго гена *porA*, отличающегося по антигенным свойствам, вместо одного из генов *opa* (*OpaC* или *OpaD*). Мажорный белок наружной мембраны, порин А, или PorA, *Neisseria meningitidis*, является продуктом гена *porA*. PorA обладает широким антигенным разнообразием и является объектом фазовой изменчивости для уклонения от иммуноселективного давления; таким образом, он не всегда перекрестно взаимодействует с другими подтипами. Для повышения реактивности композиций вакцины в отношении различных подтипов PorA по меньшей мере один дополнительный ген *porA* встраивают в ген *opaC* или *opaD* генетически измененного штамма. Серотип PorA, отобранный для вставки, выбирают на основе наиболее преобладающих форм PorA, обнаруженных при инфекциях, вызываемых менингококками подтипа В. Подходящие серотипы PorA включают в качестве неограничивающих примеров: P1.7-1 (из штамма M1080); P1.22,14 (из штамма M4410); P1.22,1,4; или другие подходящие серотипы PorA, что понятно специалисту в данной области или как описано в современной литературе, например, как описано в Sacchi et al., Diversity and prevalence of PorA types in *Neisseria meningitidis* serogroup B in the United States, 1992-1998, *J Infect Dis.* 2000 Oct; 182(4): 1169-76. Вторые гены *PorA* могут находиться под контролем любого подходящего сильного промотора, обеспечивающего экспрессию белка PorA, например промотора PorA подходящих штаммов, например, штамма H44/76. Подходящие способы клонирования гена *porA* в генетически измененный штамм известны специалисту в данной области и могут включать в качестве неограничивающих примеров гомологичную рекомбинацию. Например, ген *porA* можно амплифицировать с помощью ПЦР с ДНК бактериальной хромосомы, клонировать в клонирующий вектор и затем клонировать в соответствующим образом сконструированную плазмиду, например pUC19, с использованием слияния генов посредством модификации способа ПЦР с элонгацией перекрывающихся фрагментов. Эту сконструированную плазмиду можно вводить в бактериальный геном посредством гомологичной рекомбинации, так чтобы заменить ген *opa*. Трансформанты можно отбирать блоттингом колоний с моноклональными антителами против порина. Эти способы известны специалисту в данной области.

В следующих вариантах осуществления настоящего способа модифицированные штаммы обладают стабильной и/или повышенной экспрессией по меньшей мере

одного минорного белка наружной мембраны. Подходящие минорные белки наружной мембраны обладают способностью индуцировать бактерицидные антитела (например, в качестве неограничивающих примеров, NadA, вариант 1 белка, связывающего фактор H (FHBP), и вариант 2 (FHBP). Не ограничиваясь рамками какой-либо теории, стабилизация и/или повышенная экспрессия высоко консервативных экспонированных на поверхности минорных белков наружной мембраны, идентифицированных посредством геномного анализа, как обладающие потенциалом индуцировать защитные антитела, могут приводить к увеличению перекрестного защитного иммунного ответа. Подходящие консервативные минорные белки включают в качестве неограничивающих примеров, NadA, вариант 1 и 2 FHBP и Орс. Способы стабилизации и/или сверхэкспрессии минорного белка наружной мембраны (OMP) включают использование экспрессирующих плазмид и гомологичной рекомбинации или других подходящих способов, известных специалисту в данной области. Минорные OMP могут находиться под контролем сильного промотора, в качестве неограничивающих примеров, промотора *PogA N. meningitidis* или индуцируемого IPTG промотора *ptac E. Coli*.

Как описано в примерах ниже, сконструированные плазмиды использовали для установления повышенной экспрессии fHbp 1 и fHbp 2 в генетически модифицированных штаммах, где сверхэкспрессированный белок выглядит правильно процессированным, липидированным и транслоцированным к поверхности наружной мембраны. Например, экспрессия v.1 под контролем индуцируемого IPTG промотора *Ptac E. coli* в штамме 8570 HOPS-G (B2) была приблизительно в 4 раза выше, чем в родительском штамме 8570, а экспрессия v.2 в штамме B16B2 HPS-G₂A (B3) была в 32-64 раза выше, чем в родительском штамме B16B6 (см. фигуру 20). Альтернативно, систему экспрессии с использованием промотора *PogA* можно использовать для стабилизации/сверхэкспрессии минорных консервативных белков.

В следующих вариантах осуществления настоящего способа генетически модифицированные штаммы обладают инактивацией гена *lgtA*, что приводит к экспрессии укороченного или усеченного LOS с отсутствием тетрасахарида лакто-N-неотетраозы (LNnT).

Важной характеристикой LOS менингококков является фазовая изменчивость, которая происходит из-за мутаций с высокой частотой в гомополимерных отрезках нуклеотидных остатков в *lgtA* и других генах *Neisseria*. Эти мутации включают или исключают экспрессию трансферазы *LgtA*, которая опосредует сборку α -цепи LOS (изменяя конфигурацию заместителей гептозы два). Эта активация гена *lgtA* с фазовой изменчивостью может приводить к нежелательному удлинению α -цепи LOS, дающему в результате лакто-N-неотетраозу, обладающую структурным сходством с антигенами клеток крови человека. Генетически модифицированные штаммы по настоящему изобретению обладают геном *lgtA*, нокаутированным посредством нарушения нативного гена с помощью маркера устойчивости к антибиотику или другого подходящего маркера (для использования для скрининга по изменениям в гене), в качестве неограничивающего примера, гена устойчивости к зеомину. Способы нокаута гена *lgtA* известны специалисту в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров конструирование плазмид и гомологичную рекомбинацию или трансформацию. Подвергнутый мутагенезу ген $\Delta lgtA$ являлся неактивным во всех модифицированных штаммах на протяжении по меньшей мере 22 наблюдаемых пассажей и присутствовала стабилизированная усеченная

форма коровой структуры LOS. Делеция гена *lgtA* стабилизирует усеченную α -коровую структуру LOS, например, обеспечивая усеченные коровые структуры, как изображено на фигуре 19, где показаны три иллюстративных модифицированных штамма, например штамм В3 содержит альфа-цепь L8 с коровой структурой L3.

5 Генетически модифицированные штаммы по настоящему изобретению содержат специфические коровые структуры LOS, соответствующие иммунотипам L3, L5 и L2, обеспечивая стабилизированные коровые структуры, на которые можно вызвать иммунный ответ, и в примерах ниже показаны усеченные L8-подобные LOS (L8-3, L8-10 5 и L8-2), которые способны уничтожать штаммы дикого типа, экспрессирующие полноразмерный LOS. Штаммы $\Delta lgtA$ способны стимулировать антитела, распознающие как усеченные, так и полноразмерные формы структуры LOS, без перекрестной реакции с олигосахаридами лакто-N-неотетразы, обнаруженными на клетках крови человека.

15 В следующих вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированные штаммы *N. meningitidis* обладают стабилизированной экспрессией белков наружной мембраны, которые обычно являются чувствительными к фазовой изменчивости в штаммах дикого типа, например, в качестве неограничивающих примеров, Opc и PorA. Экспрессию этих белков можно 20 стабилизировать способами, известными в данной области и включающими способ замены последовательности полимерных повторов либо в промоторах, либо внутри рамки считывания гена, подлежащего стабилизации, не повторяющейся последовательностью оптимальной длины, вызывая максимальную экспрессию.

25 Например, часть последовательности поли-С или поли-G в промоторе этих генов можно заменять последовательностью такой же длины, содержащей как С, так и G нуклеотиды, например, последовательность поли-G 12 п.о. из промотора *opcA* (см. SEQ ID NO:1) заменяли новой последовательностью такой же длины, содержащей 30 как С, так и G нуклеотиды, и участок Not I (см. SEQ ID NO:2, участок Not I подчеркнут). В других подходящих вариантах осуществления последовательность поли-G в промоторе *PorA* (например, см. SEQ ID NO:3) можно заменять новой последовательностью, содержащей как С, так и G нуклеотиды.

Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к 35 вакцинным штаммам, выращенным в жидкой среде, содержащей низкий уровень железа, чтобы индуцировать белковую экспрессию белков, вовлеченных в накопление железа, например, связывающий трансферрин белок А и В. В некоторых вариантах осуществления используемая среда не содержит специфической добавки хелаторов железа, таких как десферол. Одна подходящая среда является 40 модифицированной из среды, опубликованной BW Catlin (Catlin BW. (1973) J. Infec. Dis. 128: 178-194), посредством замены нескольких индивидуальных аминокислот на 1% казаминокислоты (сертифицированные, Difco Laboratories). Среда содержала на литр: 0,4 г NH_4Cl , 0,168 г KCl , 5,85 г NaCl , 1,065 г Na_2HPO_4 , 0,17 г KH_2PO_4 , 0,647 г 45 цитрат натрия, 6,25 г лактата натрия (60% сироп), 0,037 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0013 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 г глицерина, 0,02 г цистеина, 10 г казаминокислот, 0,616 г MgSO_4 и дистиллированную воду до одного литра. Такую же среду с дефицитом железа использовали для исходных флаконов и для флаконов или ферментеров с конечной 50 культурой.

Композиция вакцины по настоящему изобретению, содержащая NOMV по меньшей мере из трех различных генетически модифицированных штаммов подгруппы В, может обеспечивать три потенциальных уровня защиты или три типа

антигенов, каждый из которых потенциально индуцирует защитный ответ антител. Три антигена представляют собой белок PorA (шесть различных подтипов PorA присутствуют в вакцине, два в каждом из трех вакцинных штаммов);

липоолигосахариды (три различных коровых структуры LOS присутствуют в вакцине, одна из каждого штамма) и консервативные минорные белки NadA, варианты 1 и 2 FHBP, и Opc, сверхэкспрессированные в вакцинных штаммах.

Хотя PorA обладает относительно высоким уровнем антигенной изменчивости с идентифицированными сотнями различных вариантов последовательности,

конкретные сероподтипы PorA встречаются намного более часто, чем другие, и умеренное число различных сероподтипов потенциально может защищать против более чем половины заболеваний, вызванных группой В. Наличие более одного антигена, способного индуцировать бактерицидные антитела, в вакцине является важным, поскольку показано, что когда поверхностная плотность антигена является

низкой, антитела против него могут не являться способными инициировать событие опосредованного комплементом лизиса. Но если присутствуют антитела против двух или более таких антигенов, антитела вместе могут инициировать опосредованный комплементом лизис. Генетически модифицированные штаммы по настоящему изобретению включают в качестве неограничивающих примеров три штамма, изображенные на фигуре 18, включая штаммы В1 (44/76 HOPS-D), В2 (8570 HOPS-G1) и В3 (B16B6 HPS-G2).

Настоящее изобретение относится к вакцине, обеспечивающей широкий спектр защиты против менингококковой инфекции, особенно менингококковых инфекций, вызываемых *Neisseria meningitidis* подгруппы В. Композицию вакцины по настоящему изобретению можно комбинировать с существующей тетравалентной вакциной А, С, Y и W-135 для обеспечения защиты против большинства патогенных серогрупп *N. meningitidis*. Не ограничиваясь рамками какой-либо конкретной теории, вакцина по настоящему изобретению может также обеспечивать вспомогательную защиту против других патогенных серогрупп, так же как против минорных серогрупп менингококков, поскольку субкапсульные антигены, на которых она основана, распространены среди всех серогрупп менингококков.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения интересные гены или интересующую ДНК доставляют и интегрируют в бактериальную хромосому посредством гомологичной и/или сайт-специфической рекомбинации. Интегративные векторы, используемые для доставки таких генов и/или оперонов, могут представлять собой репликативные в определенных условиях или суицидальные плазмиды, бактериофаги, транспозоны или линейные фрагменты ДНК, полученные рестрикционным гидролизом или амплификацией ПЦР, как известно специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления интеграция нацелена на хромосомные области, необязательные для роста *in vitro*. В других вариантах осуществления интересующий ген или интересующую ДНК можно доставлять в бактерию посредством эпизомальных векторов, таких как кольцевые/линейные репликативные плазмиды, космиды, плазмиды, лизогенные бактериофаги или бактериальные искусственные хромосомы. Отбор по событиям рекомбинации можно осуществлять посредством селективных генетических маркеров, таких как гены, придающие устойчивость к антибиотикам (например, канамицину, зеамицину, эритромицину, хлорамфениколу, гентамицину и т.д.), гены, придающие устойчивость к тяжелым металлам и/или токсическим соединениям, или гены, комплементирующие ауксотрофные мутации. Альтернативно, можно

проводить скрининг посредством амплификации ПЦР, секвенирования, рестрикционного расщепления или других способов, известных специалисту в данной области.

5 «Вакцина», как указано в настоящем документе, определена как фармацевтическая или терапевтическая композиция, используемая для инокуляции животного для иммунизации против инфекции организмом, предпочтительно патогенным организмом. Вакцины, как правило, содержат один или несколько антигенов, полученных из одного или нескольких организмов, которые при введении
10 животному могут стимулировать активный иммунитет и защищать этого животного от инфекции этими или родственными патогенными организмами.

Очищенные NOMV получают для введения млекопитающим, соответственно, человеку, мышам, крысам или кроликам, способами, известными в данной области, которые могут включать фильтрацию для стерилизации раствора, разведение
15 раствора, добавление адъюванта и стабилизацию раствора.

Вакцины по настоящему изобретению можно вводить человеку или животному множеством способов, включая в качестве неограничивающих примеров, например, парентеральный (например, внутримышечный, чрескожный), интраназальный,
20 пероральный, местный или другие способы, известные специалисту в данной области. Термин парентеральный, как используют в настоящем документе далее, включает способы внутривенной, подкожной, внутрикожной, внутримышечной, внутриартериальной инъекции или инфузии. Вакцина может быть в форме препарата для однократной дозы или представлена во флаконах для множественных доз,
25 которые можно использовать для программ массовой вакцинации. Подходящие способы получения и использования вакцин можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., Osol (ed.) (1980) and New Trends in Developments in Vaccines, Voller et al. (eds.), University Park Press, Baltimore, Md. (1978), содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

30 Композицию вакцины по настоящему изобретению, как правило, вводят парентерально в единичных дозированных составах, содержащих общепринятые, хорошо известные нетоксичные физиологически приемлемые носители, адъюванты и/или наполнители.

35 Композиции вакцины по настоящему изобретению могут дополнительно содержать один или несколько адъювантов. «Адъювант» представляет собой вещество, которое служит для усиления, ускорения или продления антиген-специфического иммунного ответа на антиген при использовании в комбинации со
40 специфическими антигенами вакцины, но не стимулирует иммунный ответ при самостоятельном использовании. Подходящие адъюванты включают неорганические или органические адъюванты. Подходящие неорганические адъюванты включают в качестве неограничивающих примеров соль алюминия, такую как гель гидроксида алюминия (квасцы) или фосфат алюминия
45 (предпочтительно гидроксид алюминия), но могут также представлять собой соль кальция (в частности, карбонат кальция), железа или цинка, или могут представлять собой нерастворимую суспензию ацилированного тирозина, или ацилированных сахаров, дериватизированных катионами или анионами полисахаридов или
50 полифосфазенов. Другие подходящие адъюванты известны специалисту в данной области. Можно использовать также системы адъювантов Th1, и они включают в качестве неограничивающих примеров, например, монофосфорилилипид А, другие нетоксичные производные LPS и комбинацию монофосфорилилипида А, такого как 3-

де-О-акрилированный монофосфориллипид А (#D-MPL), вместе с солью алюминия.

Другие подходящие адъюванты включают в качестве неограничивающих примеров MF59, MPLA, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, бактериальные липополисахариды, соединения аминокислотглюкозаминфосфата (AGP), или их производные или аналоги, которые являются доступными из Corixa (Hamilton, Mont.) и которые описаны в патенте США No. 6113918; например, 2-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоиламино]этил, 2-дезоксид-4-О-фосфоно-3-О-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоил]-2-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоиламино]-b-D-глюкопиранозид, MPL™ (3-О-деацелированный монофосфориллипид А) (доступный из Corixa), описанный в патенте США No. 4912094, синтетические полинуклеотиды, такие как олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG (патент США No. 6207646), COG-ODN (CpG олигодезоксинуклеотиды), полипептиды, сапонины, такие как Quil A или STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, Mass.), описанный в патенте США No. 5057540, токсин коклюша (PT), или термолабильный токсин *E. coli* (LT), в частности LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; см., например, Международные публикации патентов No. WO 93/13302 и WO 92/19265, холерный токсин (в форме дикого типа или в мутантной форме). Альтернативно, различные масляные составы, такие как стеарилтирозин (ST, см. патент США No. 4258029), дипептид, известный как MDP, сапонин, субъединица В холерного токсина (CTB), термолабильный энтеротоксин (LT) из *E. coli* (разработан генетически токсидированный мутант LT) и эмульсомы (Pharmos, LTD., Rehovot, Israel). Различные цитокины и лимфокины являются подходящими для использования в качестве адъювантов. Одним таким адъювантом является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), обладающий нуклеотидной последовательностью, как описано в патенте США No. 5078996. Цитокин интерлейкин-12 (IL-12) представляет собой другой адъювант, описанный в патенте США No. 5723127. Показано, что другие цитокины или лимфокины обладают иммуномодулирующей активностью, включая, в качестве неограничивающих примеров, интерлейкины 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 и 18, интерфероны-α, β и γ, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и факторы некроза опухоли α и β, и являются подходящими для использования в качестве адъювантов.

Композиции вакцины можно лиофилизировать для получения вакцины против *N. meningitidis* в сухую форму для простоты транспортировки и хранения. Кроме того, вакцину можно получать в форме смешанной вакцины, содержащей NOMV, содержащие белки из генетически измененных штаммов, описанных выше, и по меньшей мере один другой антиген, при условии, что добавленный антиген не мешает эффективности вакцины и побочные эффекты и неблагоприятные реакции не увеличиваются аддитивно или синергически. Вакцину можно связывать с химическими группами, которые могут улучшать растворимость, поглощение, биологическое время полужизни вакцины и т.д. Альтернативно, группы могут уменьшать токсичность вакцины, прекращать или ослаблять какой-либо нежелательный побочный эффект вакцины и т.д. Группы, способные опосредовать такие эффекты, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). Способы присоединения таких групп к молекуле хорошо известны в данной области.

Вакцину можно хранить в запечатанном флаконе, ампуле или т.п. Вакцину по настоящему изобретению, как правило, можно вводить в форме спрея для интраназального введения или посредством капель в нос, ингаляций, тампонов на

миндалины или капсул, жидкостей, суспензий или эликсиров для перорального введения. В случае когда вакцина находится в сухой форме, вакцину растворяют или суспендируют в стерилизованной дистиллированной воде перед введением.

Предпочтительно используют любой инертный носитель, такой как солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, или любой такой носитель, в котором вакцина NOMV обладает подходящей растворимостью.

Композиции вакцины по настоящему изобретению могут включать носитель. В случае раствора или жидкой аэрозольной суспензии подходящие носители могут включать в качестве неограничивающих примеров солевой раствор, раствор сахарозы или другие растворы фармацевтически приемлемых буферов. Аэрозольные растворы могут дополнительно содержать поверхностно-активное вещество.

Подходящими наполнителями и растворителями, которые можно использовать, являются вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия, включая солевые растворы, забуференные фосфатом, лактатом, Tris и т.п. Кроме того, стерильные нелетучие масла являются общепринятыми в качестве растворителя или суспендирующей среды, включая, в качестве неограничивающих примеров, синтетические моно- или ди-глицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение в получении подходящих для инъекции лекарственных средств.

Подходящие для инъекции препараты, например стерильные подходящие для инъекции водные или масляные суспензии, составляют, как известно в данной области, с использованием подходящих диспергирующих или увлажняющих веществ и суспендирующих веществ. Стерильные подходящие для инъекции препараты представляют собой также стерильный подходящий для инъекции раствор или суспензию в нетоксичном, подходящем для парентерального введения разбавителе или растворителе, например, в форме раствора в 1,3-бутандиоле.

Описанный в настоящее время способ и его преимущества будут лучше понятны со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры представлены для описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Предоставлением этих конкретных примеров заявители не ограничивают объем и содержание настоящего способа. Специалистам в данной области понятно, что полный объем описанного в настоящее время способа включает объект, определенный формулой изобретения, приложенной к этому описанию, и любые изменения, модификации или эквиваленты этих пунктов формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Разработка генетически модифицированного вакцинного штамма *N. meningitidis* и получение NOMV, содержащих белки наружной мембраны генетически модифицированного вакцинного штамма.

Генетически модифицированный штамм 8570 HOPS-G1 модифицировали посредством пяти генетических модификаций из родительского штамма 8570, который анализировали мультилокусным ферментативным электрофорезом в лаборатории, из которой получен этот штамм, и определили, что он принадлежит к клональному комплексу ET-5 (Caugant, et al.). Вариабельные области PorA были типированы по последовательности, и иммунотип LOS был верифицирован перед выполнением генетических модификаций. Штамм 8570 представлял собой клон ET-5 4:P1.19, 15:L7v, ProB3 (ST4) Tbp2 типа II. Серии из пяти последовательных генетических модификаций выполняли для штамма, как описано ниже:

1) Второй, отличный ген *porA* вставляли в локус *opaD*, нокаутируя ген *opaD*.

Основанную на pUC 19 плазмиду pA 18.4, не имеющую маркера устойчивости к антибиотику во вставку, использовали для инсерции второго гена *porA* в хромосому в локус *opaD*, инактивируя ген *opaD* заменой последовательности 100 п.о. в середине гена на вставку. Инсерция содержала новый ген *porA*, взятый из штамма M4410 (B:15: PI.22,14) и помещенный под промотор *porA*, взятый из штамма H44/76. Полученный тип *porA* представлял собой P1.19,15: P1.22,14, содержащий два гена порина A.

2) Начиная со штамма, полученного из 1, со вторым экспрессированным *PorA*, экспрессию белка наружной мембраны *OpcA* стабилизировали заменой

последовательности поли-С 12 п.о. в промоторе *opcA* новой последовательностью такой же длины, содержащей как С, так и G нуклеотиды. Оригинальную последовательность промотора (SEQ ID NO:1) (последовательность поли-G выделена курсивом и жирным шрифтом)

5'..CATAGTTAAAACCTCTAAAATTTGGATTGTAGTCGGATATGGTAACATAACGTAA
ATAATCGTTACGCTTACAATTATATTCTTAAGCTTTCGGGGGGGGGGGGGATTT..3'

заменяли модифицированной последовательностью промотора (SEQ ID NO:2), содержащей как С, так и G нуклеотиды, с участком Not I (подчеркнут)

5'..CATAGTTAAAACCTCTAAAATTTGGATTGTAGTCGGATATGGTAACATAACGT
AAATAATCGTTACGCTTACAATTATATTCTTAAGCTTTCGCGCGGCCGCGCATTTT.3'

Выбрана последовательность для замены, содержащая участок NotI, чтобы позволить верификацию присутствия замененной последовательности. Плазмида, используемая для трансформации, представляла собой pOpc79 (SEQ ID NO:4).

Вставка плазмиды не содержит маркера устойчивости к антибиотику. Отбор трансформантов был основан на блоттинге колоний с моноклональным антителом против *OpcA*. Выбирали штамм, подлежащий трансформации, являющийся отрицательным по *OpcA* фазовым вариантом, и сильные положительные по *OpcA* клоны идентифицировали блоттингом колоний. Истинные трансформанты отличали от положительных по *OpcA* фазовых вариантов посредством ПЦР и анализа рестрикционным ферментом (Not I).

3) Начиная со штамма, полученного из 2, ген *lpxL1*, представляющий собой ацилтрансферазу, ответственную за связывание одной из двух связанных ацил-оксиацилом жирных кислот с липидом А из LOS, инактивировали заменой

последовательности 260 п.о. в середине гена *lpxL1* вставкой, содержащей ген устойчивости к антибиотику tetM. Ген tetM получали из плазмиды pJS1934, полученной из транспозона Tn916 (Swartley, et al. 1993. Mol. Microbiol. 10:299-310).

Плазмида, используемая для инактивации гена *lpxL1*, представляла собой pMn5 (SEQ ID NO:5). Присутствие вставки гена *lpxL1* верифицировали посредством ПЦР, дающей ампликон 3,3 т.п.о. с использованием праймеров в начале и в конце гена *lpxL1*.

4) Начиная со штамма, полученного со стадии 3, экспрессию консервативного белка наружной мембраны GNA 1870 (вариант 1) (FHBP v.1) увеличивали вставкой второй копии варианта 1 гена GNA 1870 в локус *nspA*, с нокаутом экспрессии *NspA*. Вновь вставленный ген составлял часть вставки, содержащей ген устойчивости к антибиотику гентамицину, *lac* оперон *E. coli* с индуцируемым IPTG промотором Ptac, вариант 1 гена GNA 1870 и терминатор *rrnB*, использованная плазмида изображена на фигуре 19с и SEQ ID NO:6. Плазмиду на основе PUC19, pBE/GNA1870/101, использовали для трансформации и гомологичной рекомбинации для вставки варианта 1 гена GNA 1870 в модифицированный штамм. Плазмиду pBE/GNA1870/101 (7687 п.о.) сконструировали с элементами, как описано в таблице 1

(последовательность можно найти в SEQ ID NO:6).

Таблица 1

	Элемент	Координаты (нуклеотиды ##)	Источник
5	PUC19 ^{*)}	1-191	New England Biolabs (NEB)
	Участок Sac I (уникальный)	192-197	Участок клонирования pUC19
	Последовательность для накопления	198-212	Конструкт ПЦР
	5'-некодирующая область NspA (NCR)	213-1248	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
	Участок Bam H I	1249-1254	Участок клонирования гена Gent ^R
10	Ген Gent ^R	1255-2104	Конструкт ПЦР гена GentR
	Sac II (уникальный)	2105-2110	Конструкт ПЦР
	5'-фрагмент промотора Rmp (остальной)	2111-2230	Предыдущая плазмида для экспрессии NspA
	Участок Mfe I (уникальный)	2231-2236	Конструкт ПЦР
	Lac ^q оперон	2237-3641	pMAL-p2X (New England Biolabs)
15	Промотор Ptac	3642-3673	pMAL-p2X, конструкт ПЦР
	Оператор Lac	3674-3702	pMAL-p2X, конструкт ПЦР
	RBS	3750-3755	pMAL-p2X, конструкт ПЦР
	Участок Nde I (уникальный)	3761-3766	Конструкт ПЦР
	Лидерный пептид fHBP (вариант 1)	3764-3823	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
20	ORF со стоп-кодоном fHBP (вариант 1)	3824-4588	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
	Участок SgrAI (уникальный)	4589-4596	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
	3'NspA и 3'NspA NCR	4597-4638	Предыдущая плазмида для экспрессии NspA
	Терминаторы	4639-4945	pBAD/Thio-E (Invitrogen), ПЦР
	транскрипции gtnB		
25	3' NspA NCR	4946-5432	N. mening., конструкт ПЦР
	Последовательность для накопления	5433-5447	конструкт ПЦР
	Hind III	5448-5453	Участок клонирования pUC19
	pUC 19	5454-7687 конец	NEB (Amp. ^R)

*) Старт от нуклеотида 1 pUC 19. Плазмиду модифицировали для удаления участка Nde I для последующего удобного клонирования следующим образом: Ее расщепляли Nde I-EcoR I и удаляли фрагмент 213 п.о. Липкие концы заполняли и лигировали для восстановления плазмиды. В результате участки Nde I (183) и EcoRI (395) были уничтожены. Для клонирования конструкций для экспрессии целевого белка авторы настоящего изобретения использовали участки клонирования Sac I и Hind III из pUC 19.

5) Штамм, полученный на стадии 4, трансформировали плазмидой на основе pUC19, содержащей ген *synX*, в котором последовательность 200 п.о. заменяли на ген устойчивости к канамицину. Отбирали устойчивые к Kan трансформанты и тестировали посредством ПЦР на присутствие инактивированного гена *synX* и отрицательный капсульный фенотип. Результаты верифицировали нокаут гена *synX*.

6) Штамм, полученный на стадии 4, трансформировали плазмидой pBE-501, содержащей ген устойчивости к зеомину, нокаутирующий ген *lgtA* (SEQ ID NO:9). Плазмида pBE-501 содержала элементы, которые можно найти в таблице 2. Нокаутом гена *lgtA* получали экспрессию укороченного или усеченного LOS с отсутствием тетрасахарида лакто-N-неотетраозы (LNnT) (см. фигуру 20).

Таблица 2

	Элемент	Координаты (нуклеотиды ##)	Источник
	Клонировующий вектор pCR 4-TOPO TA	1-3667	Invitrogen. Тип: точка начала репликации pUC
	Последовательность для накопления	3668-3682	Конструкт ПЦР
	5'-область LgtA	3683-4037	N. mening., 2996, конструкт ПЦР
		4038-4122	Invitrogen. Участок клонирования и промотор EM7 гена устойчивости к зеоцину
	Фрагмент pEM7/Zeo	4123-4497	Ген ZeocinR, дающий ΔLgtA pEM7/Zeo
		4498-4633	Фрагмент участка клонирования LgtA из pEM7/Zeo
		4634-5448	N. mening., 2996, конструкт ПЦР

Последовательность для накопления

5449-5463

Последовательность для накопления

Клонирующий вектор pCR 4-TOPO TA

5464-5759 конец

Invitrogen

*) кДНК LgtA расщепляли BssH II. Полученные 3'- и 5'- липкие концы заполняли и ген устойчивости к зеоцину вставляли в эту кДНК с тупыми концами. В случае вырезания инактивирующего гена устойчивости к зеоцину, что может происходить во время репарации бактериальной ДНК, резервные 3'- и 5'-фрагменты LgtA несут не поддающуюся репарации последовательность.

Этот генетически модифицированный штамм тестировали, чтобы убедиться в сохранении всех пяти мутаций и экспрессии всех ожидаемых антигенов.

Пример 2: Получение вакцинных количеств генетически модифицированного штамма

Затем генетически модифицированные штаммы использовали для получения основного банка клеток и банка клеток для продукции для использования для изготовления вакцины, как подробно описано на схемах технологического процесса на фигурах 1-5 для получения композиции NOMV. Культуру NOMV тестируют по экспрессии белков наружной мембраны и LOS.

Пример 3: Характеризация вакцин

Конечный продукт, полученный из примера 2, подвергали тестированию для контроля качества и доклиническому тестированию безопасности и иммуногенности на мышах и кроликах.

Состав конечного продукта вакцины представлял собой:

Белок 200 лаг/мл

Липоолигосахарид 36 тг/мл

Нуклеиновая кислота 2,5 мкг/мл

Хлорид натрия 0,9%

Буфер Tris-HCl 0,01 M pH 7,6

Композицию вакцины далее анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и Вестерн-блоттингом. На фигуре 6 изображен гель, окрашенный Кумасси синим, показывающий белковое содержание в вакцине (дорожка 4) по сравнению с контролем (дорожка 2) и партией фильтрованной неочищенной вакцины (дорожка 3). На фигуре 7 изображен гель, окрашенный серебром, показывающий липоолигосахаридный компонент вакцины (дорожка 3) по сравнению с контролем (ML5 LPS, дорожка 1) и партией фильтрованной неочищенной вакцины (дорожка 2). На фигуре 8 изображены результаты тестирования идентичности вакцины по главным компонентам вакцины NOMV в соответствии с антителами, как перечислено в таблице 3.

Таблица 3

Дорожка	Специфичность антител	Моноклональное антитело	Ожидаемая реакция	Результат теста
1	Предварительно окрашенный стандарт	NA		
2	L8 LOS	2-1 L8	Следовая	Следовая
3	L8v LOS	25-1-LC1	Положительная	Положительная
4	L3,7 LOS	9-2-L379	Следовая	Следовая
5	Lip (H8)	2-1-CA2	Положительная	Положительная
6	Opa P5.10	23-1-P5.10	Отрицательная	Отрицательная
7	Opa P5.11	MF7-1-P5.11	Отрицательная	Отрицательная
8	Opc (P5.C)	B306-P5C	Положительная	Положительная
9	FHBP I (GNA1870)	JAR 4	Положительная	Положительная
10	Rmp	9F5	Положительная	Положительная
11	PorB P4	15-1-P4	Положительная	Положительная
12	PorA P1.14	MN21G3.17	Положительная	Положительная
13	PorA P1.15	MN3C5C	Положительная	Положительная
14	PorA P1.19	2-1-P1.19	Положительная	Положительная

15	TBP2	476C2G2	Положительная	Положительная
16	Полисахарид группы В	2-2-B	Отрицательная	Отрицательная
17	Окрашивание амидо черным	NA		

Результаты, которые можно найти на фигурах 6, 7 и 8, показывают белки, обнаруженные в вакцинах NOMV из генетически модифицированного штамма 8570 HOPS-G NOMV, содержат белки и LOS, как описано.

Пример 4: Тест общей безопасности вакцины

Вакцину тестировали в Тесте общей безопасности вакцины, как предписано в 21 CFR 610.11. Результаты для вакцины приведены в таблице 4.

Таблица 4		
Тестируемый препарат	Результат теста	Комментарии
Вакцина 8570 HOPS-G NOMV, Партия № 1289	Пройден	Все животные остались нормальными и здоровыми и набирали массу

Пример 5: Тест пирогенности на кроликах*

Результаты теста пирогенности на кроликах по активности эндотоксина приведены в таблице 3 для генетически модифицированной вакцины 8570 HOPS-G NOMV отдельно и для вакцины, адсорбированной на адьюванте гидроксиде алюминия. Приведенные значения представляют собой наивысшие протестированные количества, которые не вызывали лихорадку у кроликов (увеличение температуры >0,5°C), результаты можно найти в таблице 5.

Таблица 5				
Тестируемый препарат	Тестируемая концентрация	Повышение температуры у указанного кролика		
		1	2	3
Вакцина 8570 HOPS-G NOMV, Партия № 1289	0,4 пг/кг	0,1	0,2	0,2
Вакцина 8570 HOPS-G NOMV, Партия № 1289, адсорбированная на Rehydragel HPA алюминия, партия № 1347	0,5 мкг/кг	0	0	0

* Эти тесты проводили в BioReliance, Inc. согласно GLP, следуя протоколу, указанному в CFR.
 ** Количество гидроксида алюминия/кг, предназначенное для использования в исследовании на человеке для всех составов (доз).

В общем, вакцина отдельно прошла тест при 0,4 пг/кг, адьювант гидроксид алюминия прошел тест при 15 пг/кг (наибольшее количество на кг, подлежащее использованию в клиническом исследовании), и вакцина, адсорбированная на гидроксиде алюминия, прошла тест при 0,5 мкг/кг, но не прошла при 1,0 пг/кг. Экстраполяция этих результатов на основе пг/кг позволяет предполагать, что адсорбированная вакцина может является не пирогенной для человека вплоть до дозы в диапазоне 25-50 мкг.

Пример 6: Высвобождение цитокинов из цельной крови человека

Вакцину тестировали на содержание эндотоксина посредством измерения ее способности индуцировать провоспалительные цитокины TNF-альфа и IL-6 из свежей цельной крови человека. Результаты показаны на фигурах 9 и 10. Данные представляют собой среднее из 3 (стандарт LPS *E. Coli* и вакцина NOMV партии 1119 с *lpxL2* LOS) или 5 (партия 0832 NOMV с LOS дикого типа и вакцина партии 1289 NOMV с *lpxL1* LOS) тестов. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего. Концентрация NOMV основана на белке, но стандарт LPS *E. Coli* основан на LPS по массе. Не ограничиваясь рамками какой-либо конкретной теории, эти результаты позволяют предполагать, что настоящая вакцина может иметь профиль безопасности у добровольцев-людей, сходный с тем, какой наблюдали для

вакцины, содержащей *lpxL2* LOS (Менингококковая вакцина 44/76 MOS 5D NOMV, партия № 1119, BB-IND 12687).

Активность вакцины 8570 HOPS-G NOMV партии № 1289 сравнивали с активностью экстрагированных дезоксихолатом везикул наружной мембраны (OMV).

Везикулы получали с использованием основного способа, описанного Fredriksen JH, et al. NIPH Annals, 14:67-80, 1991, за исключением того, что на протяжении процедуры использовали 0,5% дезоксихолат (DOC) вместо использования 1,2% DOC для ресуспендирования осадков после ультрацентрифугирования. Результаты этого сравнения показаны на фигуре 11.

Пример 7: Иммуногенность у мышей и ответ бактерицидных антител

Мышам вводили три дозы генетически модифицированного вакцинного штамма 8570 HOPS-G с интервалами в четыре недели с адсорбцией или без на адъюванте гидроксиде алюминия (Rehydragel LV). Группы из 10 мышей вакцинировали внутрибрюшинно на 0, 4 и 8 недели с помощью 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкг NOMV, где группы вакцин перечислены в таблице 6. Сыворотку отбирали на 0, 7 и 10 неделе. Сыворотку тестировали на бактерицидные антитела против четырех различных штаммов, родительского штамма вакцины и нескольких родственных штаммов с использованием нормальной сыворотки человека в качестве источника комплемента. В сыворотке до вакцинации одинаково отсутствовала бактерицидная активность.

Таблица 6	
Группа вакцины	Инъектированное количество вакцины
1	0,1 мкг
2	0,3 мкг
3	1,0 мкг
4	3,0 мкг
5	0,1 мкг+Rehydragel LV
6	0,3 мкг+Rehydragel LV
7	1,0 мкг+Rehydragel LV
8	3,0 мкг+Rehydragel LV
9	1,0 мкг+Rehydragel HPA

Результаты, полученные с помощью 10-недельной сыворотки (три дозы вакцины), показаны на фигуре 12, показывающей бактерицидный титр различных групп вакцины для генетически модифицированных штаммов. Два из тестируемых штаммов являлись изогенными с родительским штаммом вакцины. Они получены из родительского штамма заменой гена *porA* измененным *porA*, обладающим отличной специфичностью серотипа. Два из белков PorA, экспрессированных в этих тестируемых штаммах, присутствуют в вакцине (P1.19,15 и P1.22,14), но третий (P1.22-1,4) не присутствует. Четвертый штамм, 44/76, обладает отличным PorA, отличным PorB и отличной коровой структурой LOS по сравнению с вакцинным штаммом. Неожиданно, в отличие от опубликованных исследований, в которых для экстрагированных дезоксихолатом везикулярных вакцин показывают, что антиген PorA, как правило, является доминантным антигеном, для полученных по настоящему изобретению вакцин показали, что основная часть бактерицидной активности не зависела от серотипа штамма-мишени, и таким образом, не направлена против PorA.

Для бактерицидных антител, индуцированных у мышей посредством вакцины 8570 HOPS-G NOMV, не показали специфичности для серотипа, но, по-видимому, они

в основном являются независимыми от сероподтипа и серотипа (Фигура 13).
Обнаружено, что антитела, уничтожающие штамм 44/76, в основном направлены против LOS. Планки представляют собой стандартную ошибку среднего. Вакцину вводили с и без адсорбции на адьюванте гидроксиде алюминия Rehydragel LV.

Анализ специфичности ответа бактерицидных антител против гетерологичного штамма 44/76 проводили истощением бактерицидной активности с помощью различных выделенных антигенов. Сыворотку мышей после вакцинации разводили до бактерицидной конечной точки (-50% уничтожение) и инкубировали в лунках 96-луночного планшета для микротитрования, покрытых различными концентрациями нескольких антигенов. После 4-часовой инкубации сыворотку тестировали по бактерицидной активности и определяли процент удаления бактерицидного антитела. Очищенный LOS, полученный из штамма-мишени, (иммунотип L3,7) являлся способным удалять почти все антитело. Очищенный LOS (иммунотип L8v), полученный из вакцинного штамма, являлся способным удалять приблизительно 70% антитела. Консервативный белок GNA 1870 (очищенный, рекомбинантный белок), по-видимому, удалял приблизительно 20% бактерицидной активности, что, без связи с какой-либо конкретной теорией, может указывать на некоторое кооперативное уничтожение, вовлекающее как анти-LOS антитело, так и анти-GNA1870 антитело, как показано на фигуре 14.

Пример 8: Иммуногенность у кроликов

Вакцину тестировали также по иммуногенности у кроликов. Группы из четырех кроликов вакцинировали внутримышечно с помощью различных доз вакцины, с адсорбцией или без на адьюванте гидроксиде алюминия. Три дозы вводили с интервалами по шесть недель и кровь отбирали через две недели после последней инъекции. Определяли ответ бактерицидного антитела у кроликов на четыре тестируемых штамма. Тестируемые штаммы включали 3 изогенных варианта 8570, экспрессирующие различные белки PorA и L3,7v LOS, и штамм 44/76, обладающий гетерологичным PorA и LOS с отличной коровой структурой. Белки PorA P1.19,15 и P1.22,14 присутствовали в вакцине, но P1.22-1,4 не присутствовал. Результаты бактерицидных тестов приведены на фигуре 15. Анализ перекрестно реактивной бактерицидной активности против штамма 44/76 проводили таким же способом, как для сыворотки мышей, и результаты являлись в основном такими же. Большинство перекрестно-реактивных бактерицидных антител можно было удалить посредством очищенного LOS, гомологичного тестируемому штамму.

Пример 9: Получение и тестирование на животных лабораторной партии полной мультивалентной NOMV вакцины.

В дополнение к штамму 8570 HOPS-G1, который описан в примерах выше, два дополнительных вакцинных штамма были выбраны и генетически модифицированы. Первый представлял собой штамм B 16B6 (B:2a:P 1.5,2:L2). Этот штамм принадлежит к генетической группе ET-37 и обладает белком PorB класса 2 и связывающим трансферрин белком В типа I. Второй представлял собой штамм 44/76 (B:15:P1.7,16:L3,7), который принадлежит к генетической группе ET-5 и является представителем эпидемического штамма, ответственного за эпидемию, вызванную менингококками группы В в Норвегии в 1970 гг. и 1980 гг. Он экспрессирует белок PorB класса 3 и связывающий трансферрин белок В типа II.

Штамм B16B6 генетически модифицировали в основном таким же способом, как описано для штамма 8570 HOPS-G1. Два гена инактивировали, *synX* и *lpxL1*, для предотвращения синтеза капсулы и сialiрования LOS и для уменьшения

токсичности LOS. Второй ген *porA* (подтип Pl.22-4) вставляли вместо гена *opaD*.
 Вариант 2 GNA 1870 (FNBП) с индуцируемым IPTG промотором P_{tac} *E. coli* вставляли
 вместо гена *nspA* в качестве второй копии с использованием плазмиды pBE-201 (SEQ
 ID NO:7). Плазмиду pBE-201 (7687 п.о. для дополнительной экспрессии fNBП
 (вариант 2)) сконструировали с элементами, как описано в таблице 7.

Таблица 7

	Элемент	Координаты (нуклеотиды ##)	Источник
10	PUC19*)	1-191	New England Biolabs (NEB)
	Участок Sac I (уникальный)	192-197	pUC19
	Последовательность для накопления	198-212	Конструкт ПЦР
	5'-NCR NspA	213-1248	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
	Участок Bam H I	1249-1254	Участок клонирования гена Gent ^R
15	Ген Gent ^R	1255-2104	Конструкт ПЦР гена Gent ^R
	Sac II (уникальный)	2105-2110	Конструкт ПЦР
	5'-фрагмент промотора Rmp (остальной)	2111-2230	N. mening., конструкт ПЦР
	Участок Mfe I (уникальный)	2231-2236	Конструкт ПЦР
	Lac ^q оперон	2237-3641	pMAL-p2X (New England Biolabs)
20	Промотор P _{tac}	3642-3673	pMAL-p2X, конструкт ПЦР
	Оператор Lac	3674-3702	pMAL-p2X, конструкт ПЦР
	RBS	3750-3755	pMAL-p2X, конструкт ПЦР
	Участок Nde I (уникальный)	3761-3766	Конструкт ПЦР
	Лидерный пептид fNBП (вариант 2)	3764-3823	N. mening., 2996, конструкт ПЦР
	ORF со стоп-кодоном fNBП (вариант 2)	3824-4588	N. mening., 2996, конструкт ПЦР
25	Участок SgrAI (уникальный)	4589-4596	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
	3'NspA и 3'NspA NCR	4597-4638	Предыдущая плазида для экспрессии NspA
	Терминаторы транскрипции gmb	4639-4945	pBAD/Thio-E (Invitrogen), ПЦР
	3' NspA NCR	4946-5432	N. mening., конструкт ПЦР
	Последовательность для накопления	5433-5447	конструкт ПЦР
30	Hind III	5448-5453	Участок клонирования pUC19
	pUC 19	5454-7687 конец	NEB (Amp. ^R)

*) Старт от нуклеотида 1 pUC 19. Плазмиду модифицировали для удаления участка Nde I для последующего удобного клонирования
 следующим образом: Ее расщепляли Nde I-EcoR I и удаляли фрагмент 213 п.о. Липкие концы заполняли и лигировали для
 восстановления плазмиды. В результате участки Nde I (183) и EcoRI (395) были уничтожены. Для клонирования конструкций для
 экспрессии целевого белка авторы настоящего изобретения использовали участки клонирования Sac I и Hind III из pUC 19.

Фазовый вариант полученного штамма, экспрессирующий усеченную альфа-цепь,
 состоящую из глюкозы и галактозы, L2 LOS, отбирали блоттингом колоний.
 Полученный генетически модифицированный штамм обозначили B16B6 HPS-G2, см.
 фигуру 18.

Штамм 44/76 также генетически модифицировали по тому же принципу, как
 описано для штамма 8570 HOPS-G1. Два гена, *synX* и *lpxL1*, инактивировали
 инсерционным мутагенезом, второй ген *porA* (подтип Pl.7-1, 1) вставляли вместе с его
 промотором вместо гена *opaD* и вторую копию *nadA* вставляли под промотором
porA вместо гена *nspA*. Плазмиду pBE-311 использовали для гомологичной
 рекомбинации для вставки гена *NadA*, плазмиду 3-11 сконструировали с элементами,
 как описано в таблице 8, и последовательность можно найти в SEQ ID NO:8.

Таблица 8

	Элемент	Координаты (нуклеотиды ##)	Источник
50	pUC19*)	1-191	New England Biolabs (NEB)
	Участок Sac I (уникальный)	192-197	Участок клонирования pUC19
	Последовательность для накопления	198-212	Конструкт ПЦР

	5'-NCR NspA	213-1248	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
	Участок Bam H I	1249-1254	Участок клонирования гена <i>Gent^R</i>
	Ген <i>Gent^R</i>	1255-2104	Конструкт ПЦР гена <i>Gent^R</i>
	Sac II (уникальный)	2105-2110	Конструкт ПЦР
5	Промотор <i>PogA</i> (44-76) (модифицированный)**	2111-3266	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
	Участок Nde I (уникальный)	3267-3272	Конструкт ПЦР
	Лидерный пептид <i>NadA</i> (аллель 3)	3270-3338	N. mening., 2996, конструкт ПЦР
	ORF со стоп-кодоном <i>NadA</i> (аллель 3)	3339-4487	N. mening., 2996, конструкт ПЦР
	Участок <i>SgrAI</i> (уникальный)	4488-4495	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
10	Терминатор <i>PogA</i> (44-76)	4496-4910	N. mening., 44-76, конструкт ПЦР
	<i>BsmI</i>	4911-4916	Конструкт ПЦР
	3' NspA NCR	4917-5329	N. mening., конструкт ПЦР
	Последовательность для накопления	5330-5344	Конструкт ПЦР
	<i>Hind III</i>	5345-5350	Участок клонирования <i>pUC19</i>
15	<i>pUC 19</i>	5351-7584 конец	NEB (<i>Amp.R</i>)

*) Старт от нуклеотида 1 *pUC 19*. Плазмиду модифицировали для удаления участка *Nde I* для последующего удобного клонирования следующим образом: Ее расщепляли *Nde I-EcoR I* и удаляли фрагмент 213 п.о. Липкие концы заполняли и лигировали для восстановления плазмиды. В результате участки *Nde I* (183) и *EcoRI* (395) были уничтожены. Для клонирования конструкций для экспрессии целевого белка авторы настоящего изобретения использовали участки клонирования *Sac I* и *Hind III* из *pUC 19*.

**) Участок поли G из 14G промотора 44-76 модифицировали заменой оптимальными для экспрессии 11 G.

20

Кроме того, экспрессию *OrsA* стабилизировали исправлением фазовой изменчивости, связанной с его геном. Это выполнено, как описано для штамма 8570 HOPS-G1, посредством прерывания поли-G участка в его промоторе в примере 1. Ген *IgtA* прерывали, как в примере 1, получая усеченный LOS. Фазовый вариант

25 полученного штамма, экспрессирующий иммунотип L8, отбирали блоттингом колоний с помощью специфических для L8 моноклональных антител. Этот генетически модифицированный штамм обозначили 44/76 HOPS-D, как показано на фигуре 18. Два дополнительных штамма охарактеризовали для подтверждения

30 стабильности всех генетических модификаций и культуры каждого для хранения заморозили.

Пример 10: Получение NOMV вакцины из штаммов B16B6 HPS-G2 и 44/76 HOPS-D.

Три генетически модифицированных штамма использовали для получения

35 лабораторных партий композиций вакцин NOMV. Штаммы выращивали в модифицированной среде Кэтлина в виде культур по одному литру в колбах Фернбаха с вращением и качанием. Клетки собирали центрифугированием, взвешивали и клеточную массу замораживали. Клеточную массу оттаивали и

40 использовали для получения NOMV, следуя в основном такому же способу, как описано для клинической партии вакцины из штамма 8570 HOPS-G1, как описано в примере 2. Процесс довели до меньшего масштаба и ультрацентрифугирование проводили дважды при 225000×g в течение 60 мин при 2-8°C для удаления

нуклеиновых кислот и всего растворимого, не относящегося к везикулам материала.

45

Пример 11: Иммунизация мышей полной мультивалентной вакциной

Группы из десяти мышей CD-1 вакцинировали внутрибрюшинно двумя пг вакцины NOMV из каждого генетически модифицированного вакцинного штамма (всего 6 пг для комбинированной вакцины с NOMV из трех штаммов). Три дозы

50 вводили на 0, 4 и 8 недели. Кровь отбирали перед вакцинацией и через 2 недели после последней вакцинации (на 10 недель).

Сыворотку от индивидуальных мышей тестировали на бактерицидные антитела против гомологичных штаммов и объединенную сыворотку от каждой группы из 10

мышей тестировали против панели из 14 гетерологичных штаммов группы В и штамма группы 1 С, экспрессирующих широкий диапазон различных субкапсульных антигенов.

Комбинированная мультивалентная вакцина индуцировала титр со средним геометрическим 1:256 против каждого из трех вакцинных штаммов и 4-кратным или большим увеличением количества бактерицидных антител против 13 из 15 гетерологичных штаммов. Два из тестируемых штаммов не подвергались уничтожению, несмотря на обладание антигеном, общим с одним из вакцинных штаммов. Наблюдаемые бактерицидные титры против панели штаммов приведены в таблице 9.

Таблица 9 Бактерицидные титры объединенной сыворотки мышей против разнообразной панели тестируемых штаммов						
Тестируемый на бактерицидность штамм	Экспрессируемые антигены	Титр объединенной сыворотки от мышей, вакцинированных указанной вакциной				
		B1+B2+B3	B2+B3	B1	B2	B3
44/76	B:15:P1.7.16:P5.11,C:L3.7	256	256	256	256	1
8570	B:4:P1.19,15:P5.5:L3,7v	256	256	256	256	2
816136	B:2a:P1.5,2:P5.1a:L2	256	256	1	1	256
9162	B:15:P1.7-2,3:P5.10,11:L3,7*	16	16	8	2	1
M1080	B:1,19:P1.1:P5.3:L1,3,7	2	1	1	1	1
3576	B:NT:P1.22-1:L3,7	128	128	4	2	16
8047	B:2b:P1.5,2:L3,4,7	64	128	1	1	128
9547	B:4:P1.4:L1	256	256	128	2	64
531	B:2a:P1.5,2:P5.1a,1b,4,5:L3,7	256	256	256	1	256
7608	B:2b:P1.5,2:P5.2,c:L4	256	128	1	1	128
6940	B:8,19:P1.NT:L1	4	4	1	1	1
1901	B:8,19:P1.NT:P5.C:L1,3,7	256	32	128	1	8
99M	B:2a:P1.2:P5.1a,1b,5:L3,7	512	512	16	8	256
6275	B:2a:P1.2:P5.1a,4,5:L3,7	-	512	32	1	512
126E	C:8,19:P1.5,2:L1:P5.C	256	256	4	2	64
2981	B:8,19:P1.14:L1	32	8	4	64	2
M4720	B:19:P1.22,14:L2	1	1	1	1	1
6557	B:17:P1.14:L1(3,7)	32	16	1	32	16

Обозначение вакцин: B1=44/76 HOPS-D NOMV

B2=8570 HOS-G1 NOMV

B3=B16B6 HPS-G2 NOMV

Эти результаты показывают способность комбинированной вакцины индуцировать бактерицидные (защитные) антитела против широкого диапазона штаммов группы В и, потенциально, также против штаммов других серогрупп.

Анализом бактерицидных антител с использованием бактерицидного истощения показали, что антитела против всех трех наборов антигенов вовлечены в уничтожение по меньшей мере некоторых из тестируемых штаммов. В некоторых случаях, по-видимому, антитела против более чем одного антигена были вовлечены и действовали совместно для получения бактерицидной активности против данного штамма.

Дополнительные группы мышей вакцинировали вакциной NOMV, полученной из изогенных мутантов штамма 8570 HOPS-G1. Мутантные штаммы отличались по экспрессии PorA. Два мутанта экспрессировали один PorA (один или другой из двух в мультивалентном вакцинном штамме) и третий представлял собой мутант с нокаутом PorA, не экспрессирующий белка PorA. Бактерицидные титры, индуцируемые каждым из четырех штаммов против нескольких различных

тестируемых штаммов, показаны в таблице 10.

Тестируемый штамм	Мутант 8570 HOPS-G1, из которого получена вакцина NOMV			
	8570 (P1.19,15 и P1.22,141)	8570 (P1.19,15)	8570 (P1.22,14)	8570 APorA
8570	256	256	256	256
44/76	256	256	256	256
B16B6	1	1	1	1
3576	2	8	8	8
9547	2	4	4	2
2981	64	1	16	1
6557	32	1	128	1

Для первых пяти тестируемых штаммов в таблице 10 экспрессия PorA не оказывала эффекта на титр бактерицидных антител, индуцированных вакциной. Для последних двух штаммов, которые оба экспрессировали P1.14, присутствие эпитопа P1.14 в вакцине коррелировало со способностью соответствующей сыворотки уничтожать штамм. Это показывает, что антитела против PorA вовлечены в наблюдаемое уничтожение некоторых штаммов. Для других штаммов, таких как гомологичный штамм и штамм 44/76, другие антигены являются ответственными за большую часть бактерицидной активности. Это показано анализом с исследованием бактерицидного истощения. Результаты одного такого анализа приведены на фигуре 16. Результаты, показанные на фигуре 17, показывают, что антитела против LOS и FHBP (GNA1870) были вовлечены в уничтожение штамма 8570 антисывороткой против мутанта с нокаутом PorA 8570 HOPS-G1.

Формула изобретения

1. Вакцина, содержащая нативные везикулы наружной мембраны (NOMV), полученные по меньшей мере из двух штаммов менингококков, которые были генетически модифицированы для широкого спектра защиты, где нативные везикулы наружной мембраны включают различные наборы антигенов, где различные наборы антигенов содержат один или несколько белков PorA, один или несколько LOS и один или несколько консервативных белков наружной мембраны; где генетически модифицированные штаммы были модифицированы для повышения безопасности путем инактивации генов *lpxL1*, *synX* и *lgtA*; и где по меньшей мере один генетически модифицированный штамм экспрессирует по меньшей мере два различных подтипа белков или подтипа эпитопов PorA.

2. Вакцина по п.1, где LOS, экспрессированный каждым штаммом, имеет отличающуюся коровую структуру LOS и имеет альфа-цепь, состоящую из глюкозы и галактозы.

3. Вакцина по п.1, где каждый подтип белков или подтип эпитопов PorA содержит по меньшей мере один, наиболее преобладающий подтип PorA из изолятов группы В.

4. Вакцина по п.1, где в каждом штамме сверхэкспрессирован другой консервативный поверхностный белок с известной способностью индуцировать бактерицидные антитела и он выбран из группы, состоящей из варианта 1 FHBP, варианта 2 FHBP и варианта 3 FHBP; NadA; App; NspA; TbpA и TbpB.

5. Вакцина по п.1, где NOMV получены без обработки детергентом или денатурирующими растворителями из клеточной массы или культуральной среды, собранной из бактериальной культуры.

6. Вакцина по п.1, где вакцину суспендируют в 5%-ной глюкозе, используемой в качестве наполнителя.

7. Вакцина по п.1, где NOMV комбинируют с одним или несколькими адъювантами, например гидроксидом алюминия или фосфатом алюминия, MF 59, CPG-ODN или MPLA.

8. Вакцина по п.1, где вакцина против менингококковой инфекции содержит нативные везикулы наружной мембраны менингококков (NOMV) одного или нескольких генетически модифицированных штаммов *Neisseria meningitidis*, где один или несколько генетически модифицированных штаммов модифицированы путем:

i. инактивации гена *synX*,

ii. инактивации гена *lpxL1*,

iii. инактивации гена *lgtA* в каждом штамме, что приводит к экспрессии укороченных или усеченных липоолигосахаридов (LOS) без тетрасахарида лакто-N-неотетраозы, и

iv. инсерции по меньшей мере одного второго гена *porA*, отличающегося антигенными свойствами, вместо гена *ora*.

9. Вакцина по п.8, где генетически модифицированный штамм дополнительно стабильно экспрессирует по меньшей мере один минорный консервативный белок наружной мембраны или его экспрессия повышена.

10. Вакцина по п.8, где генетически модифицированный штамм дополнительно стабильно экспрессирует по меньшей мере один белок наружной мембраны, где белок наружной мембраны выбран из группы, содержащей *Орс* и *PorA*.

11. Вакцина по п.8, где по меньшей мере один второй ген *porA*, отличающийся антигенными свойствами, экспрессирует по меньшей мере один подтип белка или подтип эпитопа *PorA*, выбранный из распространенных подтипов *PorA* изолятов *Meningitidis* группы В.

12. Вакцина по п.9, где по меньшей мере один минорный консервативный белок наружной мембраны выбран из группы, состоящей из: вариантов 1 FHBP (GNA 1870), варианта 2 FHBP, варианта 3 FHBP; *NadA*; *App*, *NspA*, *TbpA* и В.

13. Вакцина по п.1, где вакцина содержит генетически модифицированный вакцинный штамм из штамма *Neisseria meningitidis* подтипа В, включая штамм H44/76 HOPS-D.

14. Вакцина по п.13, где вакцина содержит генетически модифицированный вакцинный штамм *Neisseria meningitidis* подтипа В, полученный из штамма H44/76, который имеет следующие генетические модификации:

i) ген *synX* инактивирован,

ii) ген *lpxL1* инактивирован,

iii) ген *lgtA* инактивирован,

iv) проведена инсерция второго гена *porA* вместо гена *oraD*,

v) повышена экспрессия *NadA* по сравнению с нативным штаммом, и

vi) отмечается стабильная повышенная экспрессия белков *Орс* и *PorA*.

15. Вакцина по п.13, где генетически модифицированный штамм H44/76 HOPS-DL получен из штамма дикого типа ET-5 H44/76.

16. Вакцина по п.1, где вакцина содержит генетически модифицированный вакцинный штамм *Neisseria meningitidis* подтипа В, включая штамм 8570 HOS-G1.

17. Вакцина по п.16, где генетически модифицированный вакцинный штамм *Neisseria meningitidis* подтипа В получен из 8570, который имеет следующие генетические модификации:

- i) ген *synX* инактивирован,
- ii) ген *lpxL1* инактивирован,
- iii) ген *lgtA* инактивирован,
- iv) проведена инсерция второго гена *porA* вместо *oraD*;
- v) повышена экспрессия варианта 1 белка, связывающего фактор H; и
- vi) отмечается стабильная повышенная экспрессия белков *PorA* и *Ors*.

18. Вакцина по п.16, где генетически модифицированный штамм получен из штамма дикого типа ET-5 8570.

19. Вакцина по п.1, где вакцина содержит генетически модифицированный вакцинный штамм *Neisseria meningitidis* подтипа B, включая штамм B16 B6 HPS-G2A.

20. Вакцина по п.19, где генетически модифицированный штамм получен из штамма дикого типа ET-37 B16B6.

21. Вакцина по п.1, где генетически модифицированный вакцинный штамм *Neisseria meningitidis* подтипа B получен из B16B6, который имеет следующие генетические модификации:

- i) ген *synX* инактивирован,
- ii) ген *lpxL1* инактивирован,
- iii) ген *lgtA* инактивирован,
- iv) проведена инсерция второго гена *porA* (подтип P1.22-1,4) вместо *oraD*;
- v) повышена экспрессия варианта 2 белка, связывающего фактор H; и
- vi) отмечается стабильная повышенная экспрессия белков *PorA* и *Ors*.

22. Вакцина по любому из пп.1-21, где NOMV получают из клеточной массы или из культуральной среды без обработки детергентом или денатурирующим растворителем.

23. Вакцина по любому из пп.1-21, где композицию вакцины суспендируют в 5%-ной глюкозе, используемой в качестве наполнителя.

24. Вакцина по любому из пп.1-21, где NOMV комбинируют с одним или несколькими адъювантами.

25. Вакцина по любому из пп.1-21, где генетически измененный штамм модифицирован так, что экспрессирует белки накопления железа.

26. Вакцина по любому из пп.13-21, где штамм выращивают на среде с дефицитом железа.

27. Вакцина по п.26, где NOMV получают из клеточной массы или из культуральной среды без обработки детергентом или денатурирующим растворителем.

28. Вакцина по п.26, где композицию вакцины суспендируют в 5%-ной глюкозе, используемой в качестве наполнителя.

29. Вакцина по п.26, где NOMV комбинируют с одним или несколькими адъювантами.

30. Вакцина по п.26, где генетически измененный штамм модифицирован так, что экспрессирует белки накопления железа.

31. Вакцина по любому из пп.13-21, где инактивацию гена *synX*, гена *lpxL1* или гена *lgtA* осуществляют посредством вставки гена устойчивости к лекарственному средству в последовательность инактивированного гена.

32. Вакцина по п.31, где NOMV получают из клеточной массы или из культуральной среды без обработки детергентом или денатурирующим растворителем.

33. Вакцина по п.31, где композицию вакцины суспендируют в 5%-ой глюкозе,

используемой в качестве наполнителя.

34. Вакцина по п.31, где NOMV комбинируют с одним или несколькими адъювантами.

35. Вакцина по п.31, где генетически измененный штамм модифицирован так, что экспрессирует белки накопления железа.

36. Комбинация нативных везикул наружной мембраны (NOMV) из трех генетически модифицированных штаммов *Neisseria meningitidis*, обладающих антигенной изменчивостью, где три генетически модифицированных штамма содержат:

(1) штамм H44/76 HOPS-DL со следующими генетическими модификациями или характеристиками:

инактивацией генов *synX*, *lpXL1* и *lgtA*;

инсерцией второго гена *porA*, подтип P1.7-1,1, вместо *oraD*;

повышенной экспрессией *NadA* по сравнению с диким типом;

стабильной экспрессией L8-6 LOS; и стабильной высокой экспрессией *Opc* и *PorA*;

(2) штамм 8570 HOPS-GiL со следующими генетическими модификациями или характеристиками:

инактивацией генов *synX*, *lpXL1* и *lgtA*;

инсерцией второго гена *porA*, подтип P1.22.1,4, вместо *oraD*;

повышенной экспрессией варианта 1 белка, связывающего фактор H;

стабильной экспрессией L8-6 LOS; и стабильной высокой экспрессией *PorA* и *Opc*;

(3) штамм B16B6 HPS-GaA со следующими генетическими модификациями или характеристиками:

инактивацией генов *synX*, *lpXL1* и *lgtA*;

инсерцией второго гена *porA*, подтип P 1.22.1,4, вместо *oraD*;

повышенной экспрессией варианта 2 белка, связывающего фактор H;

стабильной экспрессией L8-6 LOS; и стабильной высокой экспрессией *PorA* и *Opc*.

37. Комбинация NOMV п.36, где штамм H44/76 HOPS-DL получен из штамма дикого типа ET-5 H44/76.

38. Комбинация NOMV по п.36, где штамм 8570 HOPS-GiL получен из штамма дикого типа ET-5 8570.

39. Комбинация NOMV по п.36, где штамм B16B6 HPS-G2L получен из штамма дикого типа ET-37 B16B6.

40. Композиция вакцины, содержащая нативные везикулы наружной мембраны (NOMV) из одного или нескольких генетически модифицированных штаммов *Neisseria meningitidis* подтипа B, выбранных из группы, состоящей из:

а) генетически модифицированного вакцинного штамма *Neisseria meningitidis* подтипа B, полученного из: штамма H44/76, содержащего генетические модификации:

i) ген *synX* инактивирован,

ii) ген *lpXL1* инактивирован,

iii) ген *lgtA* инактивирован,

iv) встроены второй ген *porA* вместо гена *oraD*,

v) повышена экспрессия *NadA* по сравнению с природным штаммом, и

vi) стабилизирована повышенная экспрессия белков *Opc* и *PorA*;

б) генетически модифицированного вакцинного штамма *Neisseria meningitidis* подтипа B, полученного из 8570, содержащего следующие генетические модификации:

i) ген *synX* инактивирован,
 ii) ген *lpXL1* инактивирован,
 iii) ген *lgtA* инактивирован,
 iv) встроен второй ген *porA* (подтип P1.22-1,4) вместо гена *oraD*,
 v) повышена экспрессия варианта 2 белка, связывающего фактор H; и
 vi) стабилизирована повышенная экспрессия белков *PorA* и *Orp*; и
 с) генетически модифицированного вакцинного штамма *Neisseria meningitidis* подтипа В, полученного из B16B6, содержащего следующие генетические

модификации:

i) ген *synX* инактивирован,
 ii) ген *lpXL1* инактивирован,
 iii) ген *lgtA* инактивирован,
 iv) проведена инсерция второго гена *porA* вместо *oraD*;
 v) повышена экспрессия варианта 2 белка, связывающего фактор H; и
 vi) отмечается стабильная повышенная экспрессия белков *PorA* и *Orp*.

41. Композиция вакцины по п.40, где композиция вакцины содержит NOMV из двух или более генетически модифицированных штаммов.

42. Композиция вакцины по п.40, где композиция вакцины содержит NOMV из трех или более генетически модифицированных штаммов.

43. Вакцина по любому из пп.40-42, где NOMV получают из клеточной массы или из культуральной среды без обработки детергентом или денатурирующим растворителем.

44. Вакцина по любому из пп.40-42, где композицию вакцины суспендируют в 5%-ной глюкозе, используемой в качестве наполнителя.

45. Вакцина по любому из пп.40-42, где NOMV комбинируют с одним или несколькими адъювантами.

46. Вакцина по любому из пп.40-42, где генетически измененный штамм модифицирован так, что экспрессирует белки накопления железа.

47. Способ стимуляции иммунного ответа на менингококковую инфекцию у животного или человека, включающий введение вакцины по любому из пп.1-35 или композиции вакцины по любому из пп.40-42 животному или человеку для иммунизации против менингококковой инфекции.

48. Способ по п.47, где вакцину используют для иммунизации против инфекции, вызываемой менингококками группы В.

49. Способ по п.47, где вакцину вводят внутримышечно и/или интраназально для иммунизации против менингококковой инфекции.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> U.S. ARMY MEDICAL RESEARCH ACQUISITION ACTIVITY
 Zollinger, Wendell D.
 Donets, Mikhail
 Schmiel, Deborah
 Ionin, Boris
 Marques, Ryan
 Moran, Elizabeth E.

<120> МУЛЬТИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА ИЗ НАТИВНЫХ ВЕЗИКУЛ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ
 МЕНИНГОКОККОВ, СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 20554W001

<150> 61/057,462
 <151> 2008-05-30

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 108
 <212> ДНК
 <213> Neisseria meningitidis

<220>
 <221> misc_feature
 <223> промоторная область гена *opcA* Neisseria meningitidis

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (93)..(104)
 <223> поли-G последовательность

<400> 1
 catagttaaa acctctaaaa ttggattgt agtcggatat ggtaacataa cgtaaataat 60
 cgttacgctt acaatttatat tcttaagctt tcgggggggg ggggattt 108

<210> 2
 <211> 109
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> промоторная область гена *opcA* Neisseria meningitidis

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (93)..(104)
 <223> заменяющая последовательность для поли-G последовательности

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (95)..(102)
 <223> участок рестрикции Not I

<400> 2
 catagttaaa acctctaaaa ttggattgt agtcggatat ggtaacataa cgtaaataat 60

cgttacgctt acaattatat tcttaagctt tcgcgcggcc gcgcatttt

109

<210> 3
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> промоторная область PorA Neisseria meningitidis

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(25)
 <223> поли-G последовательность

<400> 3
 gggtttttttg cggggggggg gggggtataa ttgaagac

38

<210> 4
 <211> 2940
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> плазмида pOpc-79 для вставки последовательности в промотор opc
 Neisseria meningitidis

<400> 4
 ctgcagattg ttttttacga cggggaagtt ggcaaagaaa tagcccgct aagaaaacag 60
 gataaccac aacaagccac cgatgatggt gtagcggata aatttggcat agtgcatttt 120
 ccccataccg gcgacgaagg gggcgaaggt gcggacgatg ggcataaaac gggcaatgat 180
 gatggttttg ccgccgtggt ttctgtaaaa acggtgggtt ttatcgagat attcacgtcg 240
 gaagatttta gaatcggggt tggcgaacag cctgccgccg aaatatttgc cgacggtaaa 300
 attgagcgcg tcgccgagta tggcggcaag gcttaataat gcaaccatca aatgaatac 360
 cataccgccc agcgcggcaa tcccgccggc ggcaaacagc agcgaatcgc cgggcagtaa 420
 gggcgtaaca atcaggccgg ttctgcacaaa aacaatcaaa aacagaatcg cataaatcca 480
 cacaccgtat tgcgcgcgaca gcgcgagcag gtgttggtcg atatggagga tgaagtcgat 540
 ggcggaggca agcacggcgc gttcctaaaa aaacaaaccg cgtattttta ccgattggaa 600
 aaatgcgcgc tgaaaagtgt cagacggcat cggctattca aattcatttc acgtaaaaac 660
 cgcaaaccac aatagtttgc ggtttggcat ttaaagtgac aatgatgatt tcaaatcatc 720
 agaattttat gccgacgcgc aagccgtatt cacgaatact ggttttcggg atggtgagcg 780
 atacgtcgcc actcttggtt gttacactaa actcgccgga ttctttgtaa gtgcgttggt 840
 tgtagaacgg ccccgccctg atgctggcgg attcgcccag ttttttacca atatttgcac 900
 ccaatccaaa gccccagccg ttgggtttttt gattgatgtc ttttttgaga ttggtaacgc 960

cggtgttttaa tttatagcgg gaattgaggt caaatttcac ttcagaccaa gggttgatat	1020
accagccgtt acccagttgg gaaagcaa at cgcgtgaac tttggctaac cacgactgac	1080
ggctgctgtg aagcgtatgc ttggtggttt taatgctgtc ttttgaagat tcaaaaccca	1140
agccggcacc cacacggaaa tttaaagaat cacttaacgt ttgggtgtag gtgtagcctg	1200
tgtaaagatc gatacggttt tcaggaacgc cgggtggcag ttttacattt ttagtcttac	1260
ccagcttggt ctcatctgtt tccaaattaa taatattttt ttgctgcgc ccgaaaccgg	1320
cttccaagcg gatgccttgg ttggcatcaa aaggaatata agcacgcacg ctgatgtgtt	1380
tggcagcttt gtgtttttct ttcaggaaag cacgagttga agaaatggaa gagaggctcg	1440
tgtggacggg aaactcatta gcggtttgaa gctcttgtgc agcggcggca gtaccgggtca	1500
gggcaatcat ggcacatgta aaaactgttt ttttcatagt taaaacctct aaaatttgga	1560
ttgtagtcgg atatggtaac ataacgtaaa taatcgttac gcttacaatt atattcttaa	1620
gctttcgcgc ggccgcgc at tttacatata ttaataaaaa ttaacaaata gttatttggt	1680
tacaacgaat tgttattctc acttggtttt ctgtttttta tgggaatgac gaaattttag	1740
tttgtgtgta tttatcggaa aaacagaaac ccgccgccgt cattcccgcg caggcgggaa	1800
tctagaaccc aacgcgacaa aaatttatcc gaagcgacaa caatcttttc atcgtcatcc	1860
ccgcgcaggc gggaatctag aacgtaaaat ctaaagaaac cgttttacct gataagtttc	1920
cgtgccgaca aacctagatt ccgcctgcgc cgggaatgac gggattttag gtttctgatt	1980
tcggttttct gttttaaggg aatgacgaga cttgagatgg cggcatttat cgggagcaac	2040
tgaaccacc ctgccgtcat tccgcgaaa gggggaatct aggttcgtcc ggtttcgggt	2100
atttccgata gattcctgcc gcgttggggg tctggattcc cgcctgcgcg ggaatgacgg	2160
gacttttagt ttctgttttt gtttgagacc tttgcaaaat tcctttccct cccgacagcc	2220
gaaacccaaa cacaggtttt cggtgtttt cgecccaa at accgccta at tttacccaaa	2280
tacccctta atcctccccg gatacccgat aatcaggcat ccgggctgcc ttttaggcgg	2340
cagcgggcgc acttaacctg ttggcgcgtt tcaacagggt caaacacatc gccttcagg	2400
ggctttgcgc actcaattta atcagtcga aataggctgc ccgcgcatag cggaatttac	2460
ggtgcagcgt accgaagctc tgttcgacca catatagtgg attaaattta aaccagtagc	2520
gcgttgctc gccttgccgt actatttgta ctgtctgcgc ctctgcgc ttgtcctgat	2580
ttaaatttaa tccactataa cgggtcttcg ataaatatcg gttacgtttg gtttgcgttt	2640
ccgtcagcgg acggttgccg caggctttgc gcataatgcc gtccaacaac tgatgttctt	2700
ccagatgttg ccggttttcc gcactgtcat agcctttgtc ggcatagacg gtcgtacctt	2760
tgggcagtc ttccaacaaa ggccgcagggt gtttgactc atgggcattg gggggggtaa	2820
tgtgcagttt ctgatatag ccttcgcgat cggtaagggt atgttggttg taaccgaggt	2880

tgtagaggcc gtttttcttg atccaacggg catcgctgtc cttactcggg gtggtttggc 2940

<210> 5
 <211> 3341
 <212> ДЕК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида рМN5 для вставки последовательности, используемой
 для нокаута гена *lpxLi* (называемого также *htrB*) *Neisseria meningitidis*

<400> 5
 ctgcagaaac cgtattgtct gcctcgcgga cgggaatggc gggatcact tttgcatttg 60
 caagcgcggc aatgcggctc aatccggtaa tcgttgccgt ctgaataccg aaaaaatcca 120
 caaaaaccga atcgttgctg ccgaaatcct gatcgggcag atacagaaac ggcgcgctgc 180
 ttttgcggaa ctgtttgacg agggcgcgca gcccttcggg gcgcccgata aggaagacgt 240
 tgtgatagcg gttgcggcct ttcaaaatct gttcgtccaa tatcttggtt ttttgatggg 300
 aatacatact gatcagcggg atatcctgat taagcgcgta caccgcacac tcgaacgcgg 360
 tgaagtgcgg atacaggatg atgacacgcg tttgtaatca tgaactcttt ttgataaaaa 420
 attggagatt cctttacaaa tatgctctta cgtgctatta tttaagtgaс tatttaaaag 480
 gagttaataa atatgcggca aggtattctt aaataaactg tcaatttgat agcgggaaca 540
 aataattaga tgtccttttt taggaggggt tagttttttg taccagttt aagaatacct 600
 ttatcatgtg attctaaagt atccagagaa tatctgtatg ctttgataac ctatggttat 660
 gcataaaaat ccagtgata aaagtattta tcaactggggt ttttatgccс ttttgggttt 720
 ttgaatggag gaaaatcaca tgaaaattat taatattgga gtttttagctc atgttgatgc 780
 aggaaaaact accttaacag aaagcttatt atataacagt ggagcgatta cagaattagg 840
 aagcgtggac aaaggtacaa cgaggacgga taatacgctt ttagaacgtc agagaggaat 900
 tacaattcag acaggaataa cctcttttca gtgggaaaat acgaaggatga acatcataga 960
 caccgcagga catatggatt tcttagcaga agtatatcgt tcattatcag ttttagatgg 1020
 ggcaattcta ctgatttctg caaaagatgg cgtacaagca caaactcgta tattgtttca 1080
 tgcacttagg aaaatgggga ttccsacaat cttttttatc aataagattg accaaaatgg 1140
 aattgattta tcaacgggtt atcaggatat taaagagaaa ctttctgcgc aaattgtaat 1200
 caaacagaag gtagaactgt atcctaatat gtgtgtgacg aactttaccg aatctgaaca 1260
 atgggatacg gtaatagagg gaaatgatga ctttttagag aaatatatgt ccggtaaact 1320
 attagaagca ttggaactcg aacaagagga aagcataaga ttccataatt gttccctgtt 1380
 ccctgtttat caccggaagtg caaaaaacaa tatagggtat gataacctta tagaagtgat 1440
 tacgaataaa ttttattcat caacacatcg aggtccgtct gaactttgcg gaaatgtttt 1500
 caaaattgaa tatacaaaaa aaagacaacg tcttgcatat atacgccctt atagtggagt 1560

actacattta cgagattcgg ttagagtatc agaaaaagaa aaaataaaaag ttacagaaaat 1620
gtataacttca ataaatgggtg aattatgtaa gattgataga gcttattctg gagaaattgt 1680
tattttgcaa aatgagtttt tgaagttaaa tagtgttctt ggagatacaa aactattgcc 1740
acagagaaaa agaattgaaa atccgcaccc tctactacaa ataactgttg aaccgagtaa 1800
acctgaacag agagaaatgt tgcttgatgc ccttttggaa atctcagata gtgatccgct 1860
tctacgatat tacgtggatt ctacgacaca tgaaattata ctttctttct tagggaaagt 1920
acaaatggaa gtgattagtg cactgttgca agaaaagtat catgtggaga tagaactaaa 1980
agagcctaca gtcatttata tggagagacc gttaaaaaat gcagaatata ccattcacat 2040
cgaagtgccg ccaaaccctt tctgggcttc cattggttta tctgtatcac cgcttcggtt 2100
gggaagtgga atgcagtatg agagctcggg ttctcttgga tacttaaatc aatcatttca 2160
aaatgcagtt atggaaggga tacgctatgg ttgcgaacaa ggattatatg gttggaatgt 2220
gacggaatgt aaaaatctgtt ttaagtatgg cttatactat agccctgtta gtaccccagc 2280
agattttcgg atgcttgctc ctattgtatt ggaacaagtc ttaaaaaaag ctggaacaga 2340
attgttagag ccatacttta gttttaaaat ttatgcgcca caggaatatc tttcacgagc 2400
atacaacgat gtcctaaat attgtgcgaa catcgtagac actcaattga aaaataatga 2460
ggtcattctt agtgagaaaa tccctgctcg gtgtattcaa gaatatcgta gtgatttaac 2520
tttctttaca aatggacgta gtgtttgttt aacagagtta aaagggtacc atgttactac 2580
cgggtgaacct gtttgccagc cccgtcgtcc aaatagtcgg atagataaag tacgatatat 2640
gttcaataaaa ataacttagt gtattttatg ttgttatata aatatggttt cttgttaaat 2700
aagatgaaat attttttaat aaagatttga attaaagtgt aaaggaggag atagttatta 2760
taaaactacaa gtggatattg tgtcctgtat gtggaaataa aacacgatta aagataaggg 2820
aagatactga attaaaaatt cccctctat tgtccgaaat gcagacaaga aaatttaatt 2880
gaaataaagc agttcaaagt aactgtgatt acagagccag acgcaaagac gcagagccga 2940
taaaatgaga ttaatacaat ctcatTTTTT tgggtctctt ccgttatgta tggattcttt 3000
taacgcgtca gaaactgcaa aacatacagt acaaaaaata taaatttcat ctcgatacac 3060
attttctttt cagacggcaa aatacaaatg ccgtctgaaa ctattgaaac ctgccgcgct 3120
tgacctgcat ccccgaggga ttgagtttgg cggcaagccc gtggttgctg aaggcgtggg 3180
tcagcgcgac ggcaagaccg tccgccgcat ccggtctggg cgttcccgaa agtcccaaca 3240
tctgcaccac catatgctgc acctgttctt ttgccgcctt gcccttgccg actaccgcct 3300
gtttgacctg ctttcagacg gtccatccat cacactgcag g 3341

<210> 6
<211> 7687

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> плазмида pBE-101 для экспрессии варианта 1 fHBP
Neisseria meningitidis

<400> 6

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccc gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cctaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggccgcaaag ccgttaaccc gcgcgttgcc	240
tttaaatggt ggccggcgca tcacgcggcg gatgggtgaa acttgcaaac ggtttgaaa	300
aaacagcggc atctgtcgga ttgttcgagg tgcaggcata cggttttgtg tgcgtctgtg	360
ccttaagcgt cggacatttc cggcgccggc tgtgccgtct gaaacgcccc gcgggggagt	420
cggctgcgtt ttccatcgat aagcatatct tcggacgcg ttccggggcg gttttcccg	480
gcggccgcgc atttgtttgc gcttatatag tggattaaca aaaatcagga caaggcgacg	540
aagccgcaga cagtacaaat agtacggaac cgattcactt ggtgcttcag caccttagag	600
aatcgttttc tttagcctaa ggccgaggcaa cgcgcgtactg gtttttgtta atccactata	660
aaaaaactg cagcaaatcg tttaaaaaca agcgtccttt ttccgtcggg ccgaatacgg	720
cagggtcggc ttccagcagg cctttttgcc ttgccgtttc gatttgcgcc atgattttgg	780
cactcggtag gcccggtgcg tcttgcaaca tcggggcggg tacgccgtcg gtcaggcgca	840
ggcggttcac catgaattcg aacggcaaat ctccggcagc gacggttttg cgttcgacgg	900
cttcactcgg ttggctttgc attaaggcga ggtagtcgtt ggggtggcgg cggcgacgg	960
tgcgcctgat gcggtcggga taggaaatct tgccgtgcgc gcccgccct atgcctaaat	1020
aatcgccgaa ctgccagtag ttcaaattgt ggccgcaactg catggctggt ttccgaaaag	1080
ccgatgtttc gtagtggaca aaacccgcgc cttccagcgc gccgtgtacc gcgtcttcga	1140
tgtcgagggc ggcttcgtct tgcggcaaac ctttcggcgg cgtatgaccg aacggcgtgt	1200
tcggttccat cgtcagggtg tacgcgctga tgtgggttgc gcccgtaggg atcccgactt	1260
cgtcgtgcc caaggttgcc gggtagcgca caccgtggaa acggatgaag gcacgaaccc	1320
agttgacata agcctgttcg gttcgtaaac tgtaatgcaa gtagcgtatg cgtcagcga	1380
actggtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg ccgagtgccg gttttcatgg	1440
cttggttatga ctgttttttt gtacagtcta tgcccgggc atccaagcag caagcgcgtt	1500
acgccgtggg tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagcaacgat	1560
gttacgcagc agggcagtcg cctaaaaaca aagttagggtg gctcaagtat gggcatcatt	1620
cgcacatgta ggctcggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgctct tgatctttc	1680

ggctgtgagt tccgagacgt agccacotac tcccaacatc agccggactc cgattacotc	1740
gggaacttgc tccgtagtaa gacattcatt gcgcttgctg ccttcgacca agaagcgggt	1800
gttggcgctc tccgcgctta cgtctctgcc aggtttgagc agccgcgtag tgagatctat	1860
atctatgac tccagctctc cggcgagcac cggagcgagg gcattgccac cgcgctcatt	1920
aattctctca agcatgaggc caacgcgctt ggtgcttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
tacggtgacg atccccgagt ggctctctat acaaagttgg gcatacggga agaagtgatg	2040
cactttgata tcgacccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggtctc	2100
ccggcccgcg aatgccgatt tcttcttcca gcaatttgat ttgtttggag atgccgggtt	2160
gcgaagtaaa caaggcttcg gccgcttcgg aaacgttcag gttgtgctgg taaacttcta	2220
aggcgatatt caattgccga caccatcgaa tgggtgcaaaa cctttcgcgg tatggcatga	2280
tagcgcccg aagagagtca attcagggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgat	2340
gtcgcagagt atgccggtgt ctcttatcag accgtttccc gcgtggtgaa ccaggccagc	2400
cacgtttctg cgaaaacgcg ggaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt	2460
cccaaccgcg tggcacaaca actggcgggc aaacagtcgt tgctgattgg cgttgccacc	2520
tccagctctg cctgcacgc gccgtcgcaa attgtcgcgg cgattaaac tcgcgccgat	2580
caactgggtg ccagcgtggt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgctga agcctgtaaa	2640
gcggcggtgc acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtgggc tgatcattaa ctatccgctg	2700
gatgaccagg atgccattgc tgtggaagct gcctgcacta atgttccggc gttatttctt	2760
gatgtctctg accagacacc catcaacagt attattttct cccatgaaga cggtaacgga	2820
ctgggcgtgg agcatctggt cgcattgggt caccagcaaa tcgcgctgtt agcgggcccc	2880
ttaagttctg tctcggcgcg tctgcgtctg gctggctggc ataaatatct cactcgcaat	2940
caaattcagc cgatagcgga acgggaaggc gactggagtg ccattgtccg ttttcaacaa	3000
accatgcaaa tgctgaatga gggcatcggt cccactgcga tgcctggtgc caacgatcag	3060
atggcgctgg gcgcaatgcg cgcattacc gagtccgggc tgcgcgttgg tgcggatatt	3120
tccgtagtgg gatacgacga taccgaagac agctcatgtt atatcccgcc gtaaccacc	3180
atcaaacagg attttcgcct gctggggcaa accagcgtgg accgcttgct gcaactctct	3240
cagggccagg cggatgaagg caatcagctg ttgccgtct cactggtgaa aagaaaaacc	3300
accctggcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgct tggccgattc attaatgcag	3360
ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtaag	3420
ttagctcact cattaggcac aattctcatg ttgacagct tatcctcgac tgcacggtgc	3480
accaatgctt ctggcgctcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggtgtg caggctgtaa	3540
atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgct ctggataatg ttttttgcgc	3600

cgacatcata acggttcttg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatcggc	3660
tctgataatg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gccagtcggt	3720
ttaggtgttt tcacgagcac ttcaccaaca aggaccatag catatgaatc gaactgcctt	3780
ctgctgcctt tctctgacca ctgcccyygat tctgaccgcc tgcagcagcg gaggggggtg	3840
tgtgccgcc gacatcgggt cggggcttgc cgatgcacta accgcaccgc tcgaccataa	3900
agacaaaggt ttgcagtcct tgacgctgga tcagtcctgc aggaaaaacg agaaactgaa	3960
gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggg gacagcctca atacgggcaa	4020
attgaagaac gacaaggtca gccgttttoga ctttatccgc caaatcgaag tggacgggca	4080
gctcattacc ttggagagtg gagagttcca agtatacaaa caaagccatt ccgccttaac	4140
cgcctttcag accgagcaaa tacaagattc ggagcattcc gggaagatgg ttgcgaaacg	4200
ccagttcaga atcggcgaca tagcggggca acatacatct tttgacaagc ttccogaagg	4260
cggcagggcg acatatcgcg ggacggcggt cggttcagac gatgccggcg gaaaactgac	4320
ctacaccata gatttcgccg ccaagcaggg aaacggcaaa atcgaacatt tgaaatcgcc	4380
agaactcaat gtgcacctgg ccgccgcga tatcaagccg gatggaaaac gccatgccgt	4440
catcagcggg tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaagg agttactccc tcgggtatctt	4500
tggcggaaaa gccaggaag ttgccggcag cgcgggaagtg aaaaccgtaa acggcatacg	4560
ccatatcggc cttgccgcca agcaataacg ccggtgtgcg cgtcaaattc tgatatgcgc	4620
cttattctgc aaaccgccag cttggctgtt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga	4680
tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct ggcggcagta	4740
gcgcggtggt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgccgatg	4800
gtagtgtggg gtctcccat gcgagagtag ggaactgccg gccatcaaat aaaacgaaag	4860
gctcagtoga aagactgggc ctttcgtttt atcgttgtt tgcggtgaa cgctctctg	4920
agtaggaaa atccgccgc cgggcgagcc ttccggggtt ttgtttctg ccaccgcaac	4980
tacacaagcc ggcggttttg tacgataatc ccgaatgctg cggcttctgc cgccctatct	5040
tttgaggaaat ccgaaatgtc caaaaccatc atccacaccg acaaagcccc cgccgccatc	5100
ggcgcgtaaa gccaaagcgt ccgagcaggc gacaccgttt acatgagcgg tcaaatcccc	5160
ctcgatcccc ccacgatgac cgtcgtcggc aacggcgatt tccgcgccga agcgcgccaa	5220
gtgttccaaa acctgcaagc cgtcgccgaa gcggcaggcg gcacgctggc cgacatcgtc	5280
aaactcaacg cctacctgac cgaattgggc aattttgcg tcttcaacga agtcatggcg	5340
gaatttatcg ccgagccctt ccccgccgc gccgcgctg cgtttgcctc gctgcocaaa	5400
ggcgtgcagg tcgaagccga agccgtcctc gtgaccgtct gaaacggaag cttggcgtaa	5460
tcatggcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata	5520

cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gaggtagcta actcacatta	5580
attgcgttgc gctcactgcc cgttttccag tccggaaacc tgcgtgcca gctgcattaa	5640
tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgtcttc cgttctctcg	5700
ctcactgact cgtgcgcgc ggtcgttcgg cgcggcgag cggatcagc tcaactcaag	5760
gcggtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5820
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc	5880
cgtcccccctg acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc agagggtggc aaaccgcaca	5940
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tctgctgctc tctgttccg	6000
acctgcccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgtttct	6060
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg ttcgtccaa gctgggctgt	6120
gtgcacgaac ccccggtca gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta tctcttgag	6180
tccaaccggg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa caggattagc	6240
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	6300
actagaagga cagtattcgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	6360
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcgggtggtt tttgtttgc	6420
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	6480
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggcat gagattatca	6540
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt	6600
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgagc acctatctca	6660
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gctgactcc cgtcgtgta gataactacg	6720
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca	6780
cgggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggg	6840
cctgcaactt tatccgcctc catccagctt attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt	6900
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca	6960
cgtcgtcgtt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca	7020
tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga	7080
agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact	7140
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga	7200
gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcggcggt caatacggga taataccggc	7260
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc	7320
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga	7380
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat	7440

gcgcacaaaa aggggaataag ggcgacacgg aatgttgaa tactcatact ctcccttttt 7500
 caatattatt gaagcattta tcaggggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 7560
 atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 7620
 gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcggtat caccaggccc 7680
 ttctgtc 7687

<210> 7

<211> 7687

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> плазмида pBE-201 для дополнительной экспрессии варианта 2 fHBP
Neisseria meningitidis

<400> 7

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaacatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accataaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggcggcaaaag ccgttaaccc gcgcgttgcc 240
 tttaaatggt ggcggcgga tcacgcggcg gatgggtgaa acttgcaaac ggtttgaaa 300
 aaacagcggat atctgtcggg ttgttcaggg tgcaggcata cggttttgtg tgcgtctgtg 360
 ccttaagcgt cggacatttc cggcgcgcg cgtgctgtct gaaacgcccg gcgggggatg 420
 cggctgcgtt ttccatcgat aagcatattt tcgggacgcg ttcggggcgg gttttcccg 480
 gcggccgccc atttgtttgc gcttatatag tggattaaca aaaatcagga caaggcgacg 540
 aagccgcaga cagtacaaat agtacggaac cgattcactt ggtgcttcag cacccttagag 600
 aatcgttctc tttagagtaa ggcgaggcaa cgcggtactg gtttttgta atccactata 660
 aaaaacactg cagcaaatcg tttaaaaaca agcgtccctt ttcggtcggg cggaaatcgg 720
 cagggtcggg ttccagcagg ccttttttgc ttgcggttcc gatttgcgcc atgattttgg 780
 cactcggtag gcccggtgccc tctgcaaca tcggggcggg tacgcccgtg gtcaggcgca 840
 gggcggtcat catgaattcg aacggcaaat cttcggcagc gacggttttg cgttcgacgg 900
 cttcactcgg ttggctttgc attaaggcga ggtagtcgtt ggggtggcg cggcggacgg 960
 tgcgctcgat gcggtcggga taggaaattt tgcggtgccc gcccgccct atgcctaaat 1020
 aatcgccgaa ctgccagtag ttcaaatgt ggcggcactg catggctggt ttgcgaaaag 1080
 ccgatgttc gtagtggaac aaaccgcgc cttccagcgc gcggtgtacc gcgtcttcga 1140
 tgtcgagggc ggcttcgtct tcgggcaaac ctttcggcgg cgtatgaccg aacggcgtgt 1200
 tcggttccat cgtcaggtga tacgcgctga tgtgggttgc gcccgtaggg atcccgaatt 1260
 cgtgctgcc caaggttgcc ggggtgacga caccgtgga acggatgaag gcacgaaccc 1320

agttgacata agcctgttcg gttcgtaaac tgtaatgcaa gtagcgtatg cgctcacgca	1380
actgggtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgcagtggcg gttttcatgg	1440
cttgttatga ctgttttttt gtacagtcta tgccctgggc atccaagcag caagcgcgtt	1500
acgccgtggg tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagcaacgat	1560
gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttagggtg gctcaagtat gggcatcatt	1620
cgcacatgta ggctcggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgctct tgatcttttc	1680
ggtcgtgagt tcggagacgt agccacctac tcccaacatc agccggactc cgattacctc	1740
gggaacttgc tccgtagtaa gacattcatc gcgcttgctg ccttcgacca agaagcgggtt	1800
gttggcgctc tcgcggtta cgttctgccc aggtttgagc agccgcgtag tgagatctat	1860
atctatgata tcgcagtctc cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgctcatc	1920
aatctcctca agcatgaggc caacgcgctt ggtgcttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
tacggtgacg atcccgcagt ggctctctat acaaagttgg gcatacggga agaagtgatg	2040
cactttgata tcgacccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggcttc	2100
ccggcccgcg aatgccgatt tcttcttcca gcaatttgat ttgtttggag atgccgggtt	2160
gcgaagtaaa caaggcttcg gccgcttcgg aaacgttcag gttgtgctgg taaacttcta	2220
aggcgtatth caattgccga caccatcgaa tggtgcaaaa ctttcgcgg tatggcatga	2280
tagcgcccg aagagagtca attcagggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgat	2340
gtcgcagagt atgccgtgt ctcttatcag accgtttccc gcgtggtgaa ccaggccagc	2400
cacgtttctg cgaaaacgcg ggaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt	2460
cccaaccgog tggcacaaca actggcgggc aaacagtcgt tgctgattgg cgttgccacc	2520
tccagtctgg ccctgcacgc gccgtcgcaa attgtcgcgg cgattaaatc tcgcgccgat	2580
caactgggtg ccagcgtggt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgtcga agcctgtaaa	2640
gcggcgggtg acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtgggc tgatcattaa ctatccgctg	2700
gatgaccagg atgccattgc tgtggaagct gcctgcacta atgttcgggc gttattttct	2760
gatgtctctg accagacacc catcaacagt attattttct cccatgaaga cggtagcgga	2820
ctgggcgtgg agcatctggt cgcattgggt caccagcaaa tcgcgctgtt agcgggcccc	2880
ttaagttctg tctcggcgcg tctgcgtctg gctggctggc ataaatatct cactcgcaat	2940
caaattcagc cgatagcgga acgggaaggc gactggagtg ccatgtccgg ttttcaacaa	3000
accatgcaaa tgctgaatga gggcatcggt cccactgcga tgctggttgc caacgatcag	3060
atggcgctgg gcgcaatgcg cgccattacc gagtcggggc tgccgcttgg tgcggatctc	3120
tcggtagtgg gatacgacga taccgaagac agctcatgtt atatcccgcc gttaaccacc	3180
atcaaacagg attttcgcct gctggggcaa accagcgtgg accgcttgct gcaactctct	3240

cagggccagg cggatgaagg caatcagctg ttgcccgtct cactggtgaa aagaaaaacc	3300
accctggcgc ccaatacgca aaccgcctct cccgcgcgt tggccgattc attaatgcag	3360
ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtaag	3420
ttagctcact cattaggcac aattctcatg tttagacagct tatcatcgac tgcacgggtgc	3480
accaatgctt ctggcgctcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggctgtaa	3540
atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccggt ctggataatg ttttttgccg	3600
cgacatcata acggtttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatcggc	3660
tcgtataatg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gccagtcctg	3720
ttaggtgttt tcacgagcac ttcaccaaca aggaccatag catatgaatc gaactgccct	3780
ctgtgcctt tctctgacca ctgcctcgat tctgacggcc tgcagcagcg gaggcggcgg	3840
tgctgcggcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcacta accgcacgcg tcgaccataa	3900
agacaaaagt ttgcagcttt tgacgctgga tcagtcctgc aggaaaaacg agaaactgaa	3960
gctggcggca caaggcgcg agaaaactta tggaaacggc gacagcctca atacgggcaa	4020
attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt caaatcgaag tggacgggca	4080
gctcattacc ttggagagcg gagagttcca aatatacaaa caggaccact ccgcctcgt	4140
tgccttacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc gacagcctga taaaccaacg	4200
ctccttcttt gtcagcggtt tgggcggaga acataccgcc ttcaaccaac tgcctgacgg	4260
caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgat gctggcggaa aactgacct	4320
taccatagat ttgcgcgcca aacagggaca cggcaaaaatc gaacacctga aaacacccga	4380
gcaaaatgct gagcttgccg ccgcggaact caaagcagat gaaaaatcac acgcctcat	4440
tttgggcgac acgcgctacg gcagcgaaga aaaaggcact taccacctcg cccttttcgg	4500
cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag ataggggaaa aggttcacga	4560
aatcggcctc gcgggcaaac agtagtaacg ccggtgtgcg cgtcaaattc tgatatgcgc	4620
cttattctgc aaaccgccag cttggctgtt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga	4680
tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgctt ggccgcagta	4740
gcgcggtggt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgcgatg	4800
gtagtgtggg gtctcccat gcgagagtag ggaactgccg ggcataaat aaaacgaaag	4860
gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgcggtgaa cgtctctctg	4920
agtaggacaa atccgcgcgc cgggcgagcc ttgcgcggtt ttgtttttct ccaccgcaac	4980
tacacaagcc ggccggttttg tacgataatc ccgaatgctg cggcttctgc cgcctatatt	5040
tttgaggaat ccgaaatgct caaaaccatc atccacaccg acaaagcccc cgcgcctatc	5100
ggcgcgtaca gccaaagcgt ccgagcagcg gacacgctt acatgagcgg tcaaatcccc	5160

ctcgatcccg ccacgatgac cgtcgtcggc aacggcgatt tccgcgcga agcgcgccaa	5220
gtgttccaaa acctgcaagc cgtcgccgaa gcggcaggcg gcacgctggc cgacatcgtc	5280
aaactcaacg cctacctgac cgacttgggc aattttgcg tcttcaacga agtcatggcg	5340
gaatttatcg ccgagccctt ccccgccgc gccgcgctg gcgttgctc gctgccaaa	5400
ggcgtgcagg tcgaagccga agccgtctc gtgaccgtct gaaacggaag cttggcgtaa	5460
tcattggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata	5520
cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gaggagcta actcacatta	5580
attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgccca gctgcattaa	5640
tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg	5700
ctcactgaat cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tactcaaag	5760
gcggtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5820
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc	5880
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca	5940
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tccgttccg	6000
acctgcgcg ttaccggata cctgtccgc tttctccctt cgggaagcgt gccgctttct	6060
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt	6120
gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag	6180
tccaaccgga taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	6240
agagcgaggc atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	6300
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	6360
gttggttagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc	6420
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	6480
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca	6540
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt	6600
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca	6660
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gctgactcc ccgtcgtgta gataactacg	6720
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca	6780
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa ggcccgagcg cagaagtggg	6840
cctgcaactt tatcgcctc catccagctt attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt	6900
agttcgccag ttaatatgtt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca	6960
cgctcgtcgt ttgggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca	7020
tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtctccgat cgttgtcaga	7080

agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctottact 7140
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 7200
gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg 7260
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 7320
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga 7380
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat 7440
gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa tactcatact ctccctttt 7500
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 7560
atttagaaaa ataaacaaat aggggttcgg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 7620
gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat caagaggccc 7680
tttcgtc 7687

<210> 8
<211> 7584
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> плазмида pBE-311 для дополнительной экспрессии NadA
Neisseria meningitidis

<400> 8
tcgcgcgttt cggcgatgac ggtgaaaaac totgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accataaaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggcggcaaag ccgttaaccc gcgcgttgcc 240
tttaaattggg ggcggcgga tcaogcggcg gatgggtgaa acttgcaaac ggtttgaaa 300
aaacagcggg atctgtcgga ttgttgacgg tgcaggcata cggttttgtg tgcgtctgtg 360
ccttaagcgt cggacatttc cggcggcggc tgtgcgtct gaaacgcccg gcgggggatg 420
cggtgcgtt ttccatcgat aagcatatth tcgggacgcg tcggggcgcg gttttcccgg 480
gcggccgccc atttgtttgc gcttatatag tggattaaca aaaatcagga caaggcgacg 540
aagccgcaga cagtacaaat agtacggaac cgattcactt ggtgcttcag caccttagag 600
aatcgttctc tttgagctaa ggcgaggcaa cgcgtactg gttttgtta atccactata 660
aaaaaactg cagcaaactg tttaaaaaca agcgtccttt ttcggtcggg cggaatacgg 720
cagggtcggg ttccagcagg ctttttgcc ttgcgtttc gatttgcgcc atgattttgg 780
cactcggtag gcccgtagc tcctgcaaca tcgcgcgggg tacgccgtcg gtcaggcgca 840
gggcgttcat catgaattcg aacggcaaat cttcggcagc gacggttttg cgttcgacgg 900

cttcaactcgg ttggctttgc attaaggcga ggtagtcgtt ggggtggcgg cggcggacgg	960
tgcgctcgat gcggtcggga taggaaattt tgccgtgcgc gcccgccct atgcctaaat	1020
aatcgccgaa ctgccagtag ttcaaattgt ggcggcactg catggctggt ttcgcaaaag	1080
cogatgtttc gtagtggaca aaacccgcgc cttccagcgc gccgtgtacc gcgtcttcga	1140
tgtcgagggc ggcttcgtct tgccggcaaac ctttcggcgg cgtatgaccg aacggcgtgt	1200
tcggttccat cgtcaggtga tacgcgtga tgtgggttgc gcccgtaggg atcccgactt	1260
cgctgctgcc caaggttgcc gggtgacgca caccgtggaa acggatgaag gcacgaaccc	1320
agttgacata agcctgttcg gttcgtaaac tgtaatgcaa gtagcgtatg cgctcacgca	1380
actggtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgcagtggcg gttttcatgg	1440
cttgttatga ctgttttttt gtacagtcta tgccctgggc atccaagcag caagcgcgtt	1500
acgcctggg tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagcaacgat	1560
gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttagggtg gctcaagtat gggcatcatt	1620
cgcacatgta ggctcggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgctct tgatcttttc	1680
ggctcgtgagt tcggagacgt agccacctac tcccaacatc agccggactc cgattacctc	1740
gggaacttgc tccgtagtaa gacattcatc gcgcttgctg ccttcgacca agaagcggtt	1800
gttggcgctc tcgcggctta cgttctgccc aggtttgagc agccgcgtag tgagatctat	1860
atctatgate tcgcagtcctc cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgctcatc	1920
aatctctca agcatgaggc caacgcgctt ggtgcttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
tacggtgacg atcccgcagt ggctctctat acaaagttgg gcatacggga agaagtgatg	2040
cactttgata tcgacccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggcttc	2100
cgggccgagg tcggactttc agataatctt tgaatattgc tgttgttcta aggtctagat	2160
tccgcctgc gcgggaatga cgaatccatc cgcacggaaa cctgcaccac gtcattccca	2220
cgaaccaca tcccgtcatt accacgaaag tgggaatcta ggacgcaggg ttaagaaaac	2280
ctacatcccg tcattctca aaaacagaaa accaaaatca gaaacctaaa atcccgcat	2340
tccgcgcag gcgggaatcc agtccgttca gtttcggctg tttccgataa attcctgctg	2400
cttttcattt ctagattccc actttcgtgg gaatgacggc ggaagggttt tggttttttc	2460
cgataaattc ttgaggcatt gaaattctag attccgcct gcgcgggaat gacgaatcca	2520
tccgtacgga aacctgcacc acgtcattcc taagaacctc catcccgta ttcctcaaaa	2580
aacagaaaac caaatcaga aacctaaaat cccgtcattc ccgcgcaggc gggaatccag	2640
tccgttcagt ttcggtcatt tccgataaat tctgctgct tttcattttot agattcccac	2700
tttcgtggga atgacggcgg aagggttttg gttttttccg ataaattctt gaggcattga	2760
aattctagat tccgcctgc gcgggaatga cggctgtaga tgcccgatgg totttatago	2820

ggattaacaa aaatcaggac aaggcgacga agccgcagac agtacagata gtacggaacc	2880
gattcacttg gtgcttcagc accttagaga atcgttctct ttgagctaag gcgaggcaac	2940
gccgtacttg tttttgttaa tccactataa agtgccgcgt gtgttttttt atggcgtttt	3000
aaaaagccga gactgcatcc gggcagcagc gcatcggctc gcacgaggtc tgcgcttgaa	3060
ttgtgttgta gaaacacaac gtttttgaaa aaataagcta ttgttttata tcaaaatata	3120
atcattttta aaataaaggt tgcggcattt atcagatatt tgttctgaaa aatgggtttt	3180
tgcggggggg ggggtataat tgaagacgta tcgggtgttt gcccgatgtt tttagggttt	3240
tatcaaattt acaaaaggaa gccgatcata tgaaacactt tccatccaaa gtactgacca	3300
cagccatcct tgccactttc tgtagcggcg cactggcagc cacaaacgac gacgatgtta	3360
aaaaagctgc cactgtggcc attgctgctg cctacaacaa tggccaagaa atcaacggtt	3420
tcaaagctgg agagaccatc tacgacattg atgaagacgg cacaattacc aaaaaagacg	3480
caactgcagc cgatgttgaa gccgacgact ttaaaggctc gggctctgaaa aaagtcgtga	3540
ctaacctgac caaaaccgtc aatgaaaaca acaaaacgt cgatgccaaa gtaaaagctg	3600
cagaatctga aatagaaaag ttaacaacca agttagcaga cactgatgcc gctttagcag	3660
atactgatgc cgctctggat gcaaccacca acgccttgaa taaattggga gaaaatataa	3720
cgacatttgc tgaagagact aagacaaata tcgtaaaaat tgatgaaaaa ttagaagccg	3780
tggctgatac cgtcgacaag catgccgaag cattcaacga tatcgccgat tcattggatg	3840
aaaccaacac taaggcagac gaagccgtca aaaccgccaa tgaagccaaa cagacggccg	3900
aagaaaccaa acaaaacgtc gatgccaaag taaaagctgc agaaactgca gcaggcaaag	3960
ccgaagctgc cgctggcaca gctaatactg cagccgacaa ggccgaagct gtcgctgcaa	4020
aagttaccga catcaaagct gatatcgcta cgaacaaaga taatattgct aaaaaagcaa	4080
acagtgccga cgtgtacacc agagaagagt ctgacagcaa atttgtcaga attgatggtc	4140
tgaacgctac taccgaaaaa ttggacacac gcttggcttc tgctgaaaaa tccattgccg	4200
atcacgatac tcgcctgaac ggtttgata aaacagtgtc agacctgcgc aaagaaaccc	4260
gccaaggcct tgcagaacaa gccgcgctct ccggtctgtt ccaaccttac aacgtgggtc	4320
ggttcaatgt aacggctgca gtcggcggtc acaaatecga atcggcagtc gccatcggtg	4380
ccggcttccg ctttaccgaa aactttgccg ccaaagcagg cgtggcagtc ggcacttcgt	4440
ccggttcttc cgcagcctac catgtcggcg tcaattacga gtggtaacgc cgggtgtatat	4500
cggggcggtg aagcggatag ctttgttttt gacggctcgc cttcattott tgattgcaat	4560
ctgactgcca atctgttca gccccaaaca aaaatccgga tacggaagaa aaacggcaat	4620
aaagacagca aataccgtct gaaagatttt cagacgggtat ttgcattttt tggtttggtt	4680
tgacatatata gtgagacctt tgcaaaaata gtctgttaac gaaatttgac gcataaaaat	4740

gcgcaaaaa attttcaatt gcctaaaacc ttctaataat tgagcaaaaa gtaggaaaaa	4800
tcagaaaagt ttgcatTTTT gaaaatgaga ttgagcataa aatttttagta acctatgtta	4860
ttgcaaaggt ctgaattgt cattccacg caggcgggaa tctagtctgg aatgctgcgg	4920
cttctgccgc cctatTTTT gaggaatccg aaatgtccaa aaccatcatc cacaccgaca	4980
aagccccgc cgccatcggc gcgtacagcc aagccgtccg agcaggcgac accgtttaca	5040
tgagcgggtca aatccccctc gatcccgcca cgatgaccgt cgtcggcaac ggcgatttcc	5100
gcgccgaagc gcgccaagtg ttccaaaacc tgcaagccgt cgccgaagcg gcaggcggca	5160
cgctggccga catcgtcaaa ctcaacgcct acctgaccga cttgggcaat ttgcccgtct	5220
tcaacgaagt catggcgga tttatcgccg agcccttccc cgcccgcgcc gccgtcggcg	5280
ttgcctcgct gcccaaaggc gtgcaggctg aagccgaagc cgtcctcgtg accgtctgaa	5340
acggaagctt ggcgtaatca tgggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca	5400
caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaataag	5460
tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgccgcg tttccagtcg ggaaacctgt	5520
cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc	5580
gctcttcgcg ttctcgcgc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg	5640
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa	5700
agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccagggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg	5760
cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga	5820
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg	5880
tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg	5940
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc	6000
gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg	6060
gtaactatcg tcttgagtc aaccocgtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca	6120
ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg	6180
ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag	6240
ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	6300
gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc	6360
ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt	6420
tgggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt	6480
ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa tgcttaataca	6540
gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcggttcac catagttgoc tgactccccg	6600
tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac	6660

cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg 6720
 ccgagcgag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc 6780
 gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta 6840
 caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac 6900
 gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc 6960
 ctcgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttate actcatggtt atggcagcac 7020
 tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact 7080
 caaccaagtc attctgagaa tagtgtagtc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaaa 7140
 tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt 7200
 cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca 7260
 ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagagcaa 7320
 aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataaggcg gacacggaaa tgttgaatac 7380
 tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcagtagcg 7440
 gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc 7500
 gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaata 7560
 ggcgtatcac gaggcccttt cgtc 7584

<210> 9

<211> 5759

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> плазмида pBE-501 для нокаута гена lgtA Neisseria meningitidis
 посредством замены на ген устойчивости к зеомину

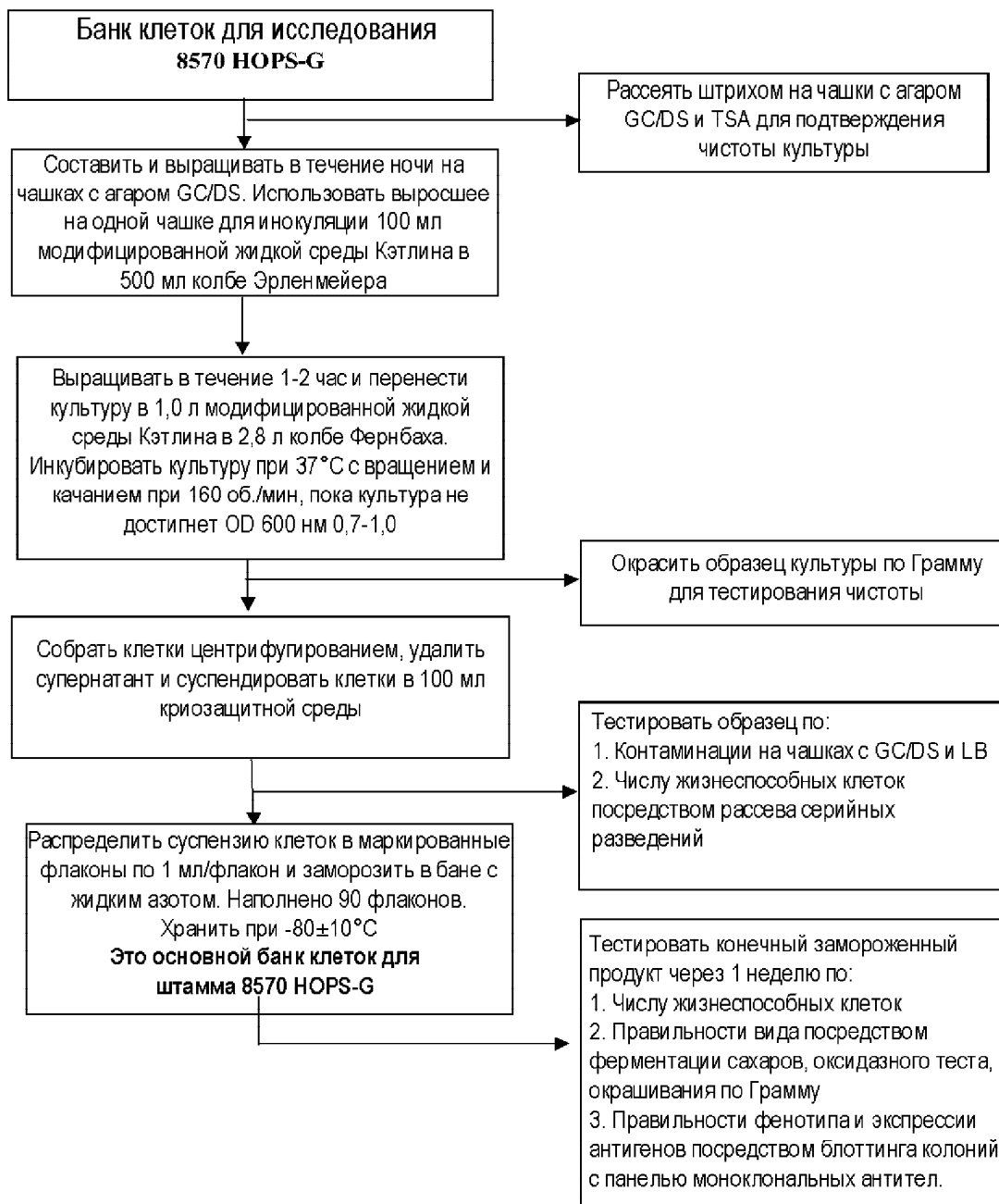
<400> 9

ctccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggctcg tcggctgcgg cgagcgggtat 60
 cagctcactc aaaggcggtta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 120
 acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 180
 ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 240
 ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 300
 gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 360
 gcgtagcgct ttctcatagc tcaagctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 420
 ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccgga ccgctgcgce ttatccggta 480
 actatcgtct tgagccaac ccggtaagac acgacttate gccactggca gcagccactg 540
 gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc 600
 ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 660

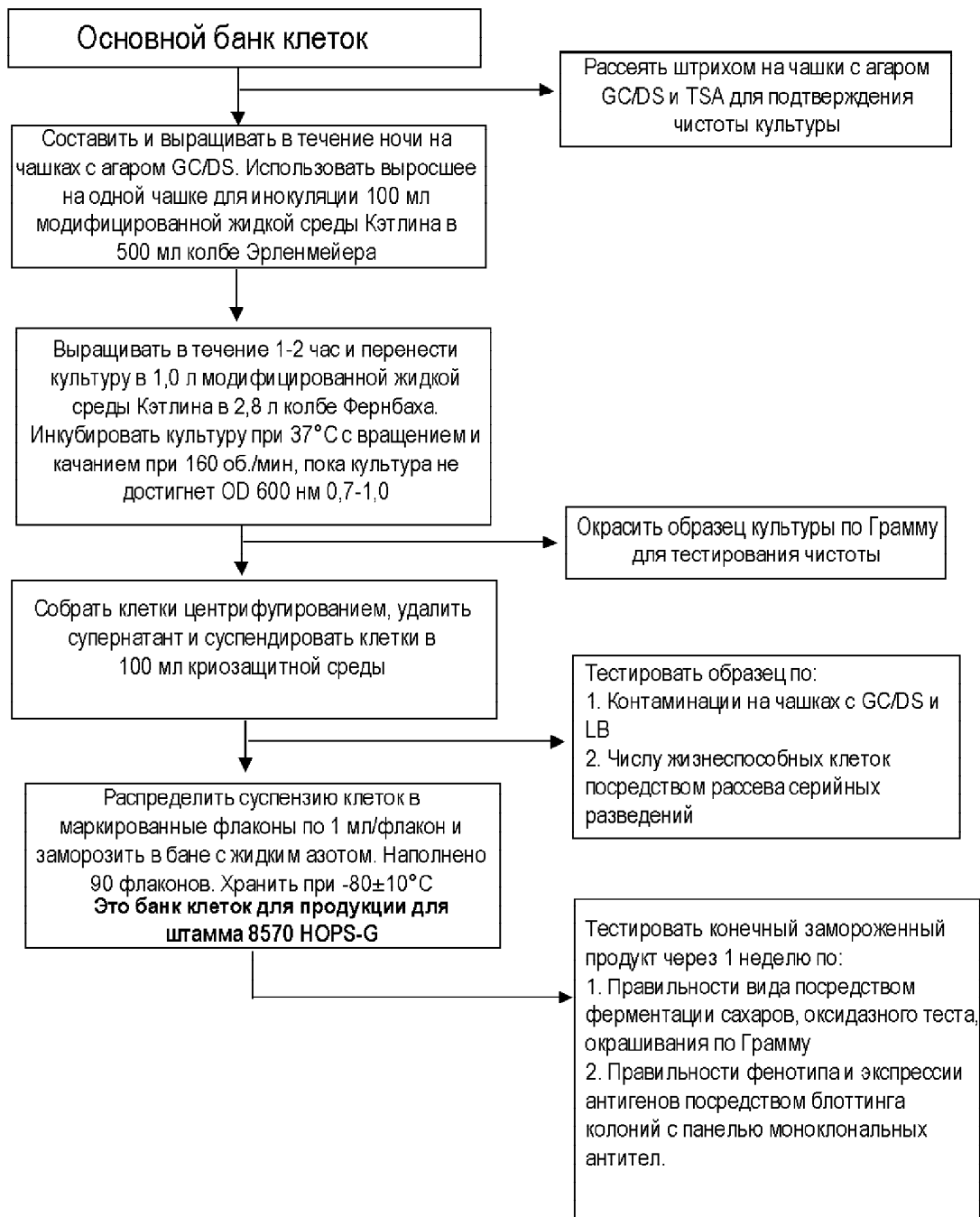
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggtg	720
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt	780
tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg	840
tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta	900
ttcaacatth ccgtgtcgcc ctatttcctt tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg	960
ctcaccacaga aacgctgggt aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtg	1020
gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac	1080
gttttccaat gatgagcact tttaaagtgc tgctatgtgg cgcgggtatta tcccgtattg	1140
acgcogggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt	1200
actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg	1260
ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac	1320
cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcggt	1380
gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag	1440
caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaaact acttactcta gcttcccggc	1500
aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc	1560
ttcoggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta	1620
tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg	1680
ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga	1740
ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gattttaaacc	1800
ttcatthttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgagcggat	1860
acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttcccga	1920
aagtgccacc tgatgcgggt tgaaataacc cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac	1980
aggaaattgt aagcgttaat aattcagaag aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg	2040
cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg	2100
ccaagctctt cagcaatatc acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca	2160
cccagccggc cacagtcgat gaatocagaa aagcggccat tttccaccat gatattcggc	2220
aagcaggcat cgccatgggt cacgacgaga tccctcgccgt cgggcatgct cgccttgagc	2280
ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg	2340
acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggctg	2400
aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgcgca ttgcatcagc catgatggat	2460
actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gcccggcac ttgcgccaat	2520
agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctcgcca aggaacgccc	2580

gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc togtottgca gttcattcag ggcaccggac	2640
aggtcgggtct tgacaaaaag aaccggggcgc ccttgcgctg acagccggaa cacggcggca	2700
tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc caccgaagcg	2760
gccggagaac ctgcgtgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc	2820
tcttgatcag agcttgatcc cctgcgccat cagatccttg gcggcaagaa agccatccag	2880
tttactttgc agggcttccc aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg	2940
cttgcgtgtcc ataaaaccgc ccagtctagc tatcgccatg taagcccact gcaagctacc	3000
tgttttctct ttgcgcttgc gttttccctt gtccagatag cccagtagct gacattcatc	3060
cggggtcagc accgtttctg cggactggct ttctacgtga aaaggatcta ggtgaagatc	3120
ctttttgata atctcatgcc tgacatttat attcccaga acatcagggtt aatggcgttt	3180
ttgatgtcat ttctgcgggtg gctgagatca gccacttctt ccccgataac ggagaccggc	3240
acactggcca tatcggtggt catcatgcgc cagctttcat ccccgatatg caccaccggg	3300
taaagttcac gggagacttt atctgacagc agacgtgcac tggccagggg gatcaccatc	3360
cgtcgccccg gcgtgtcaat aatatcactc tgtacatcca caaacagacg ataacggctc	3420
tctcttttat aggtgtaaac cttaaactgc cgtacgtata ggctgcgcaa ctgttgggaa	3480
gggcgatcgg tgcgggcctc ttgcgtatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca	3540
aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc	3600
agtgaattgt aatacgactc actatagggc gaattgaatt tagcgggccgc gaattcgccc	3660
ttgcgtcgac cgtctgaaac gggggcgagt aaccgttgta cagtccaaat gccgtctgaa	3720
gccttcagac ggcatcgtgc ctatcgggag aataaattgc agcctttagt cagcgtattg	3780
atttgccct acaacgtaga aaaatatttc gcccaatcat tagccgccgt cgtgaatcaa	3840
acttggcgca acttgatat ttgattgtc gatgacggct cgacggacgg tacgcttgcc	3900
attgccagc gtttccaaga acaggacggc cgcacccgca tcctcgcgca gccgcgcaat	3960
tccggtctga ttccctcttt aaacatcggg ctggatgaat tggcaaagtc gggggggggg	4020
ggggaatata ttgcgcgac gctagctcga gcacgtgttg acaattaatc atcggcatag	4080
tatatcggca tagtataata cgacaagggt aggaactaaa ccatggccaa gttgaccagt	4140
gccgttccgg tgcacaccgc gcgcgacgtc gccggagcgg tcgagttctg gaccgaccgg	4200
ctcgggttct cccgggactt cgtggaggac gacttcgccg gtgtgggtcc ggacgacgtg	4260
accctgttca tcagcgcggt ccaggaccag gtggtgccgg acaacaccct ggcttgggtg	4320
tgggtgcgcg gcctggacga gctgtacgcc gagtggtcgg aggtcgtgtc cacgaacttc	4380
cgggacgct cggggccggc catgaccgag atcggcgagc agcctgggg gcgggagttc	4440
gccctgcgcg acccggccgg caactgcgtg cacttcgtgg ccgaggagca ggactgagaa	4500

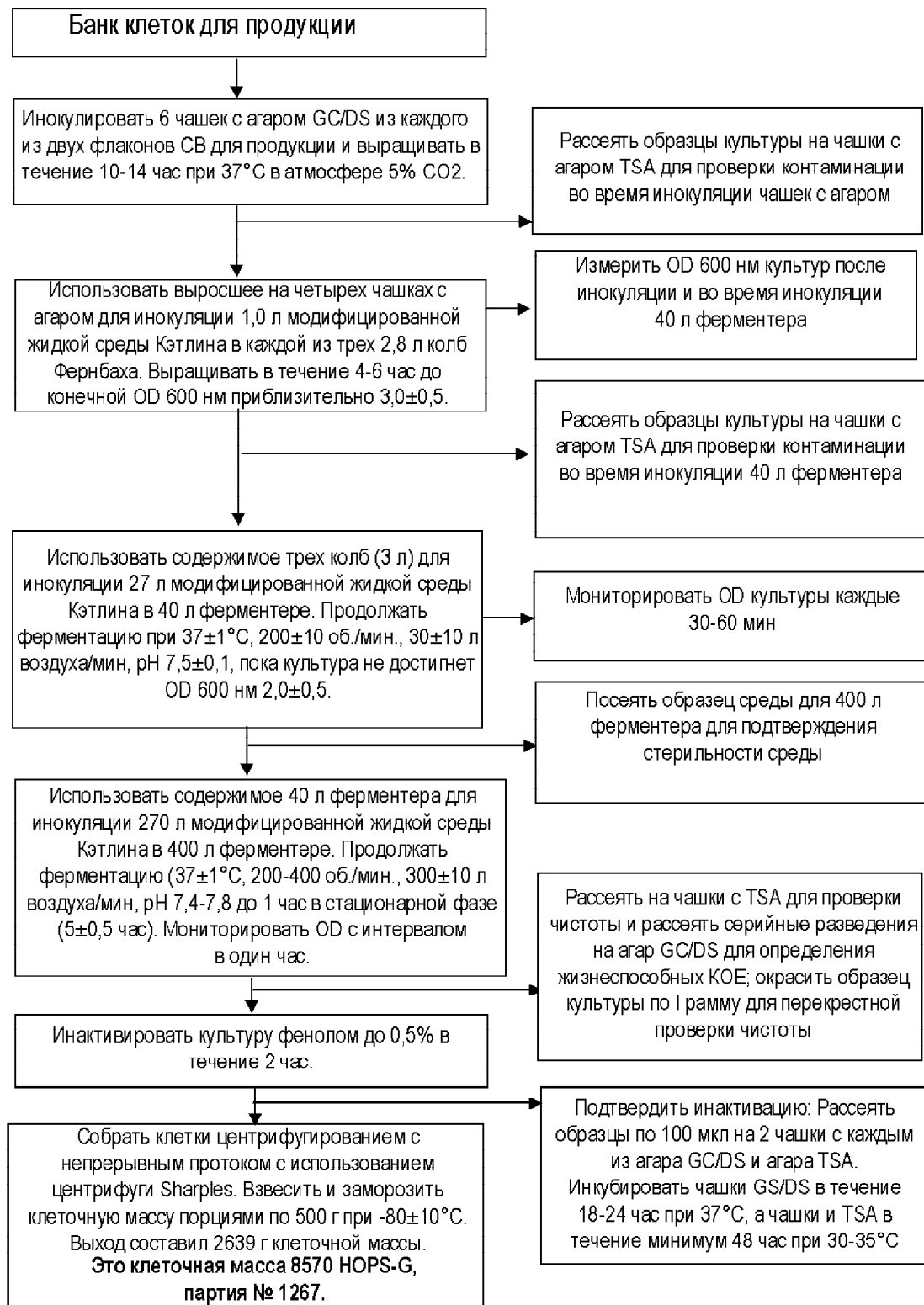
ttccccgggga	tcctctagag	tcgacctgca	ggcatgcaag	cttggcactg	gccgtcgttt	4560
tacaacgtcg	tgactgggaa	aacctggcg	ttacccaact	taatcgctt	gcagcacatc	4620
cccctttcgc	cagcgcgcac	cgatgcagac	gatattgccg	cccccgactg	gattgagaaa	4680
atcgtgggtg	agatggaaaa	agaccgcagc	atcatcgoga	tgggtgcgtg	gctggaagtt	4740
ttgtcggaag	aaaaggacgg	caaccggctg	gcgcggcacc	acgaacacgg	caaaaattgg	4800
aaaaaaccca	cccgacacga	agacattgcc	gactttttcc	ctttcggcaa	ccccatacac	4860
aacaacacga	tgattatgag	gcgcagcgtc	attgacggcg	gtttgcgtta	caacaccgag	4920
cgggattggg	cggaagatta	ccaatttttg	tacgatgtca	gcaaattggg	caggctggct	4980
tattatcccc	aagccttggt	caaataccgc	cttcacgcca	atcaggtttc	atccaaatac	5040
agcatccgcc	aacacgaaat	cgcgcaaggc	atccaaaaaa	ccgccagaaa	cgattttttg	5100
cagtctatgg	gttttaaaac	ccggttcgac	agccttgaat	acggccaaat	aaaagcagta	5160
gcgtatgaat	tgctggagaa	acatttgccg	gaagaagatt	ttgaacgcgc	ccgccggttt	5220
ttgtaccaat	gcttcaaacg	gacggacacg	ctgccgcgcg	gcgcgtggct	ggattttgcg	5280
gcagacggca	ggatgcggcg	gctgtttacc	ttgaggcaat	acttcggcat	tttgcaaccga	5340
ttgtgaaaa	accgttgaaa	aacgcgcgtt	tatccaacag	acaaaaaaca	ggataaatta	5400
tgcaaaacca	cgttatcagc	ttagcttccg	ccgcagaacg	cagggcgccc	gtttcagacg	5460
gtcgaaaggg	cgaattcggt	taaacctgca	ggactagtcc	ctttagttag	ggttaattct	5520
gagcttggcg	taatcatggt	catagctgtt	tcctgtgtga	aattgttata	cgctcacaat	5580
tccacacaac	atacgagccg	gaagcataaa	gtgtaaagcc	tggggtgcct	aatgagttag	5640
ctaactcaca	ttaattgcgt	tgcgctcaat	gcccgccttc	cagtcgggaa	acctgtcggt	5700
ccagctgcat	taatgaatcg	gccaacgcgc	ggggagaggg	ggtttgcgta	ttgggcgct	5759



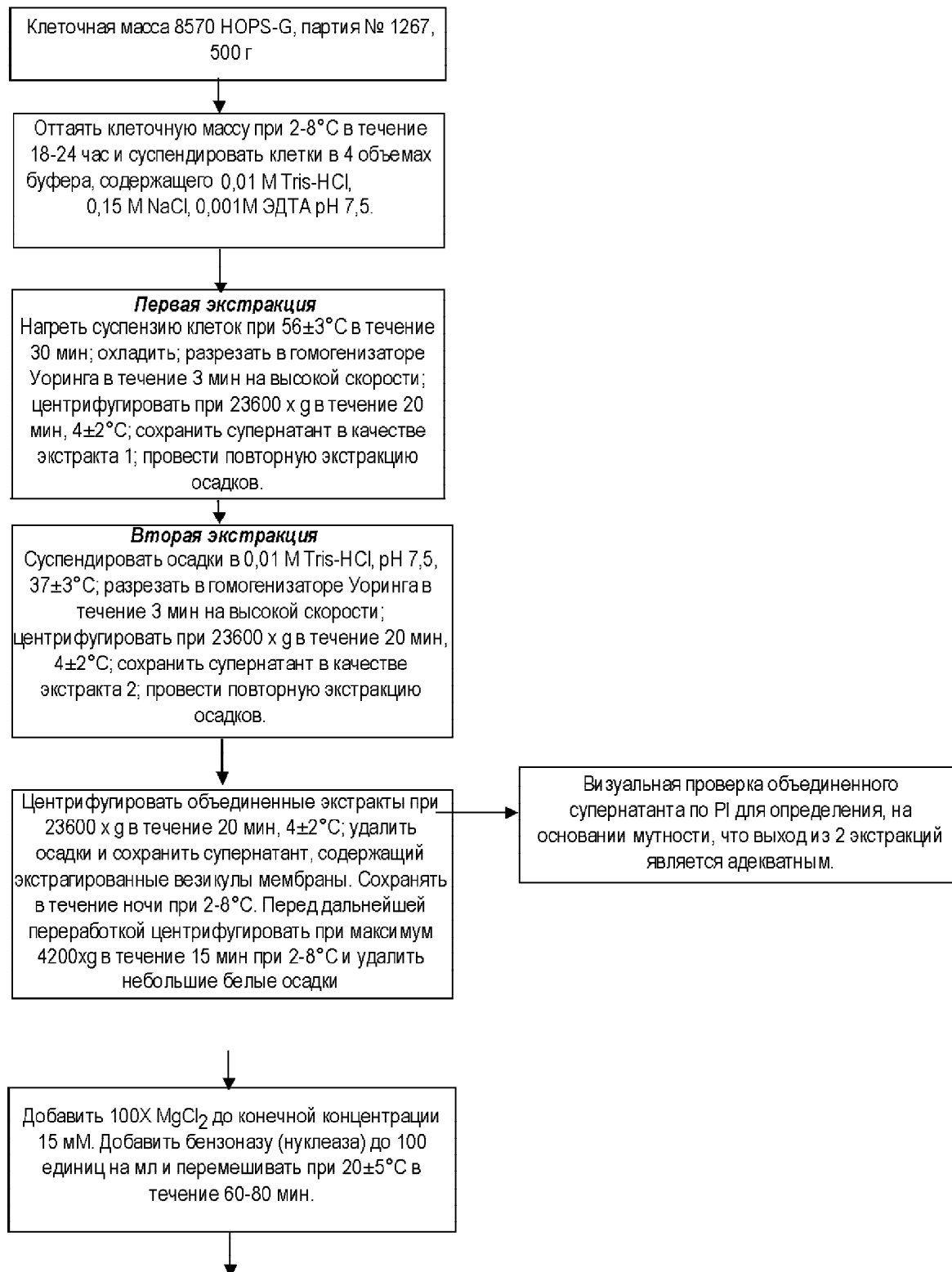
ФИГ.1



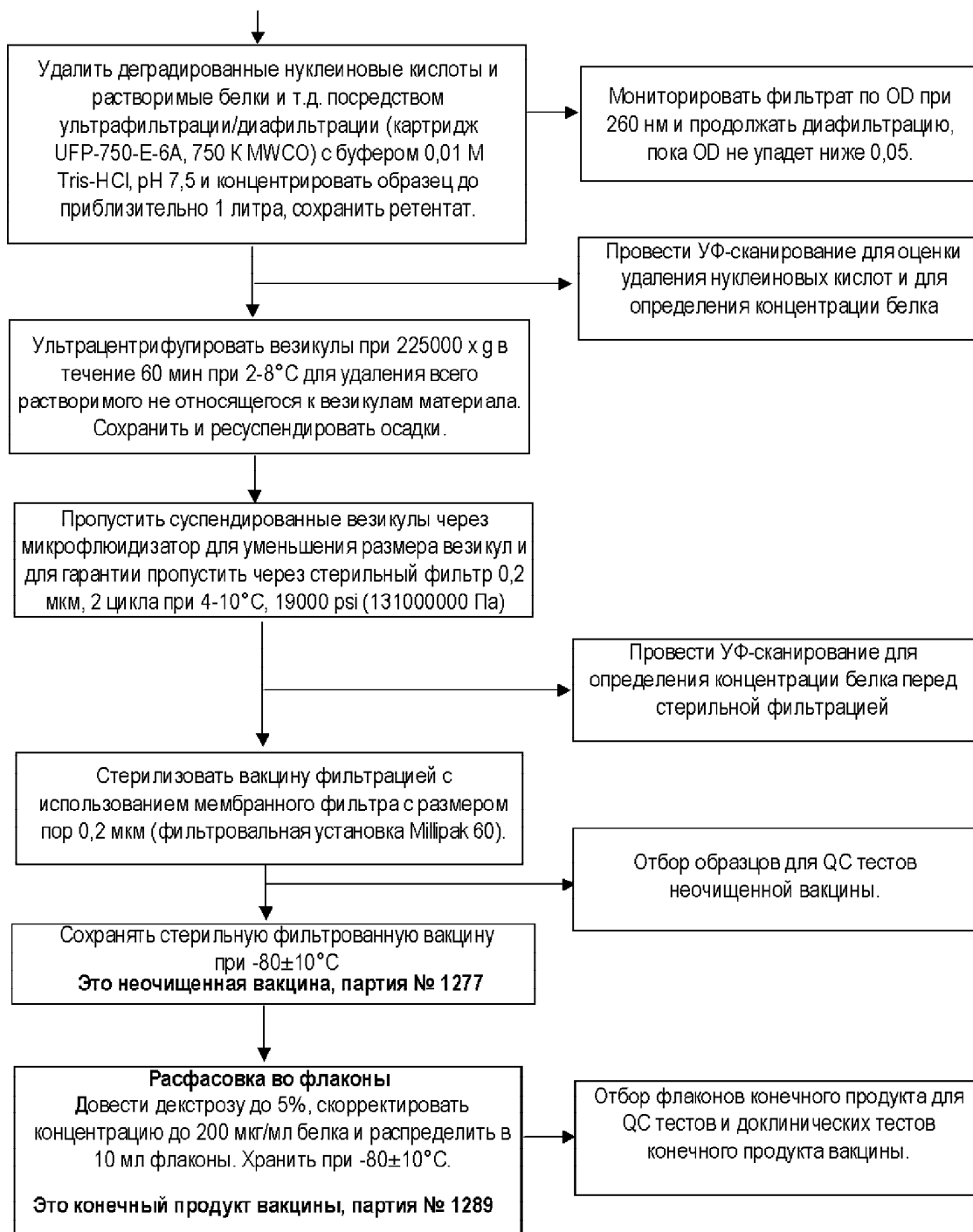
ФИГ.2



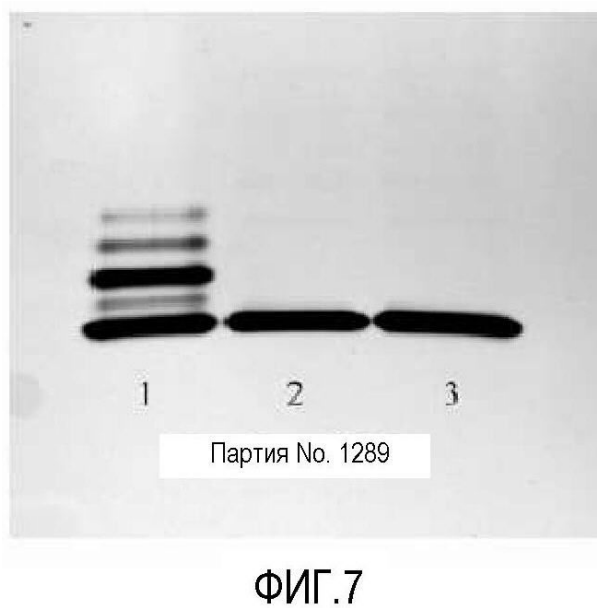
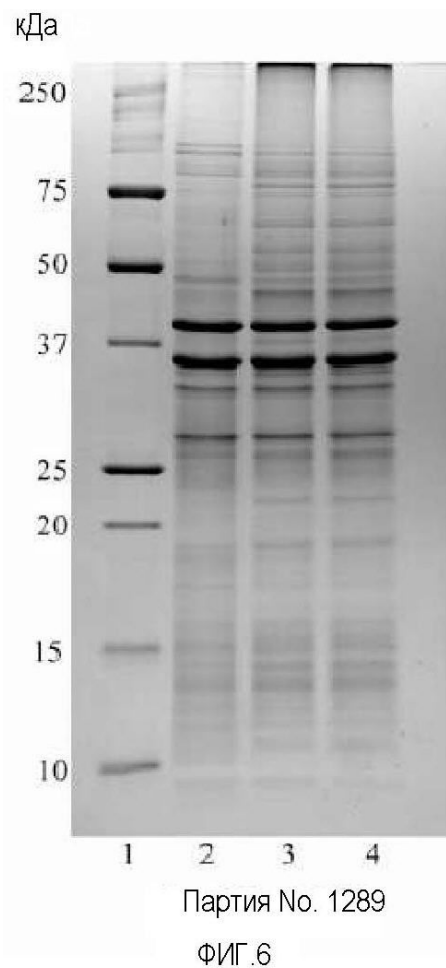
ФИГ.3

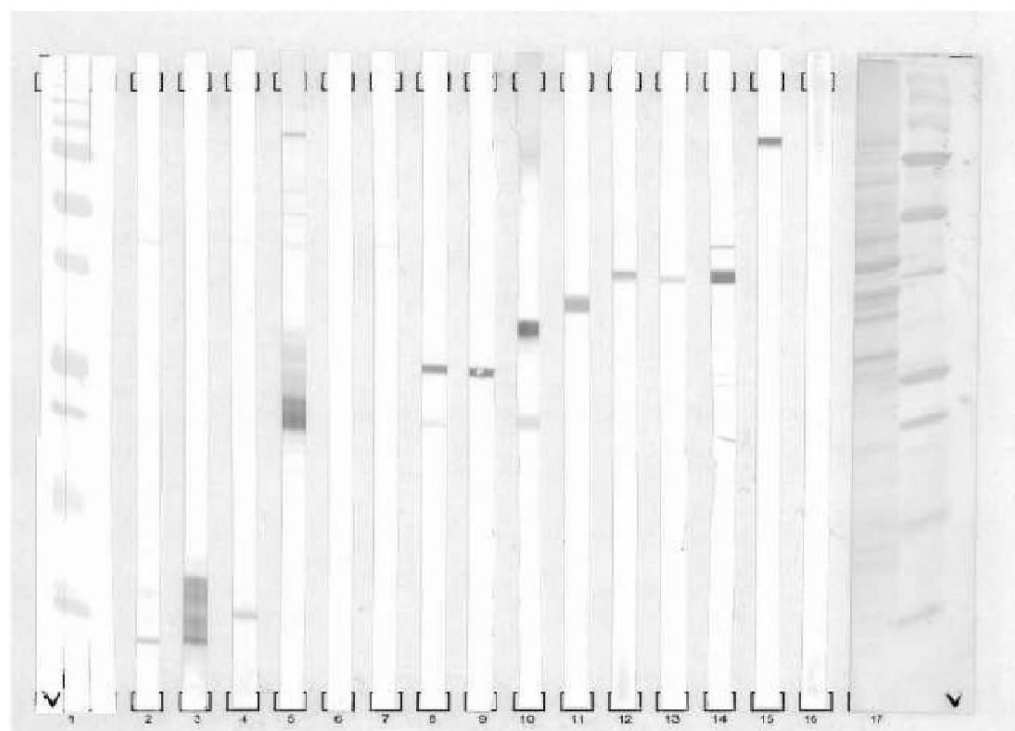


ФИГ.4



ФИГ.5

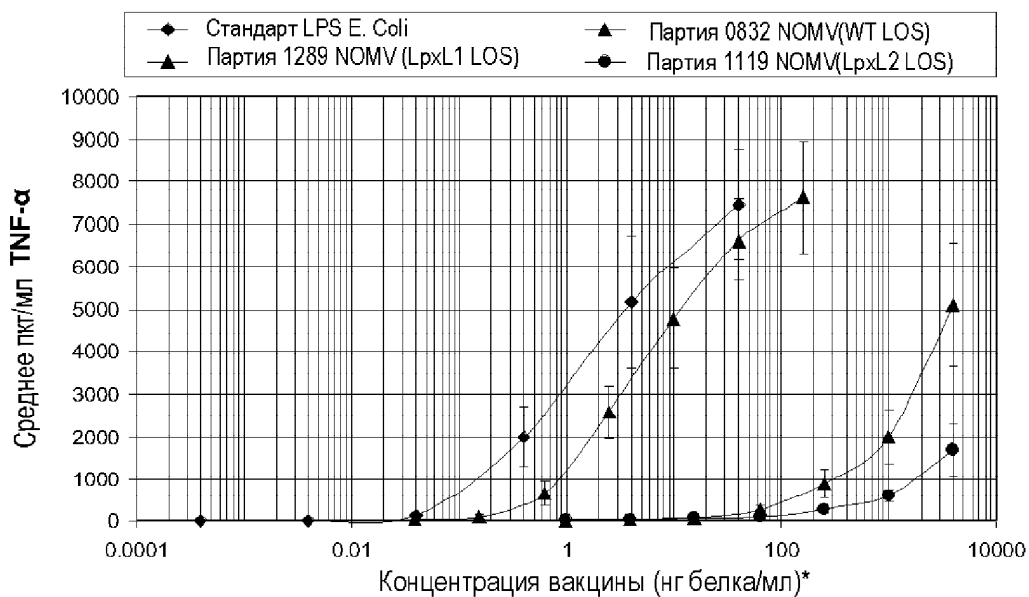




Дорожка	Специфичность антител	Моноклональное антитело	Ожидаемая реакция	Результат теста
1	Предварительно окрашенный стандарт	NA		
2	L8 LOS	2-1 L8	Следовая	Следовая
3	L8v LOS	25-1-LC1	Положительная	Положительная
4	L3,7 LOS	9-2-L379	Следовая	Следовая
5	Lip (H8)	2-1-CA2	Положительная	Положительная
6	Opa P5.10	23-1-P5.10	Отрицательная	Отрицательная
7	Opa P5.11	MF7-1-P5.11	Отрицательная	Отрицательная
8	Opc (P5.C)	B306-P5C	Положительная	Положительная
9	FHBP 1 (GNA1870)	JAR 4	Положительная	Положительная
10	Rmp	9F5	Положительная	Положительная
11	PorB P4	15-1-P4	Положительная	Положительная
12	PorA P1.14	MN21G3.17	Положительная	Положительная
13	PorA P1.15	MN3C5C	Положительная	Положительная
14	PorA P1.19	2-1-P1.19	Положительная	Положительная
15	TBP2	476C2G2	Положительная	Положительная
16	Полисахарид группы В	2-2-B	Отрицательная	Отрицательная
17	Окрашивание амидо черным	NA		

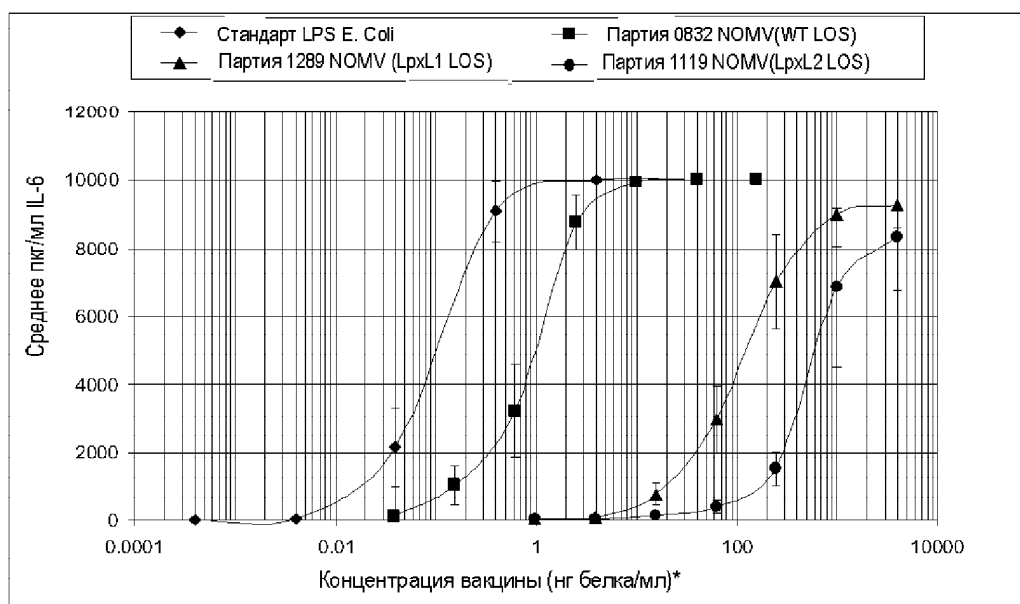
ФИГ.8

Среднее высвобождение TNF- α из цельной крови человека после инкубации с различными концентрациями вакцин NOMV (N=5)



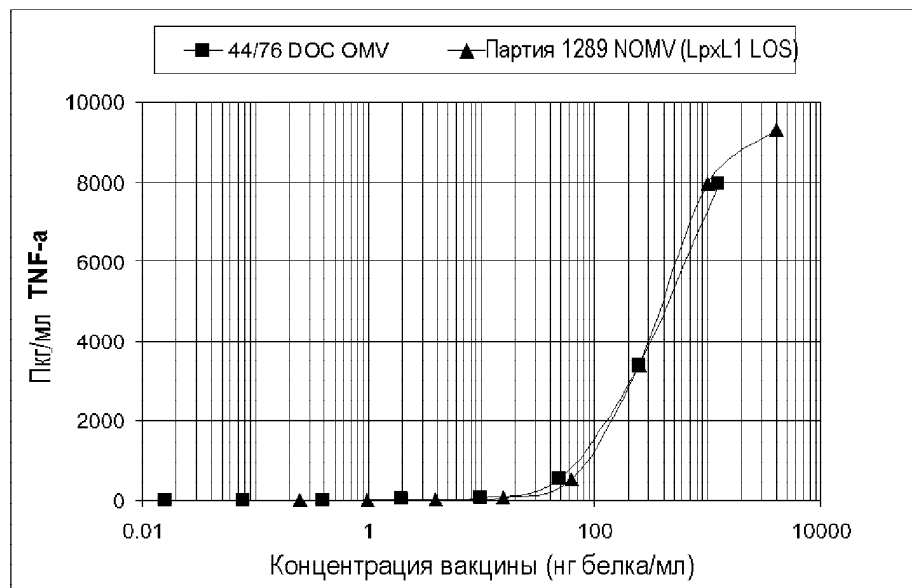
ФИГ.9

Высвобождение IL-6 из цельной крови человека после инкубации с различными концентрациями вакцин NOMV



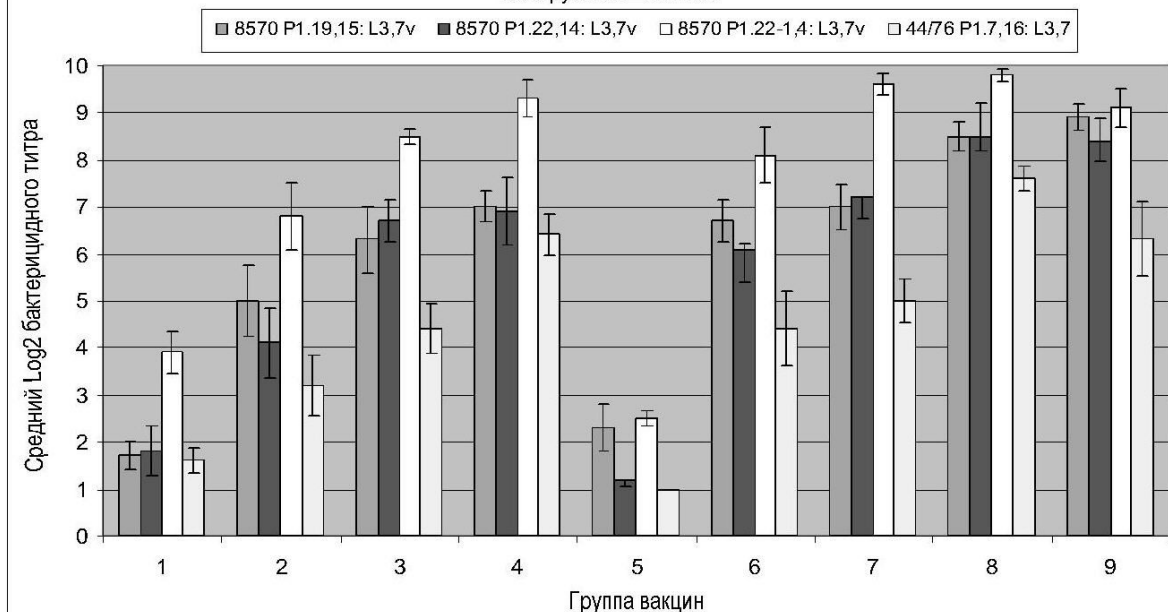
ФИГ.10

Высвобождение TNF- α из цельной крови человека после инкубации с различными концентрациями вакцины партии 1289 или с DOC-экстрагированными OMV из штамма 44/76



ФИГ.11

Ответ мышей в зависимости от дозы на вакцину 8570 HOPS-G партия № 1289 с и без адсорбции на Rehydragel LV. Сыворотку из конечного забора крови после трех доз тестировали по бактерицидной активности против четырех различных тестируемых штаммов.



Группа вакцин:

1) 0.1 мкг

2) 0.3 мкг

3) 1.0 мкг

4) 3.0 мкг

5) 0.1 мкг + Rehydragel LV

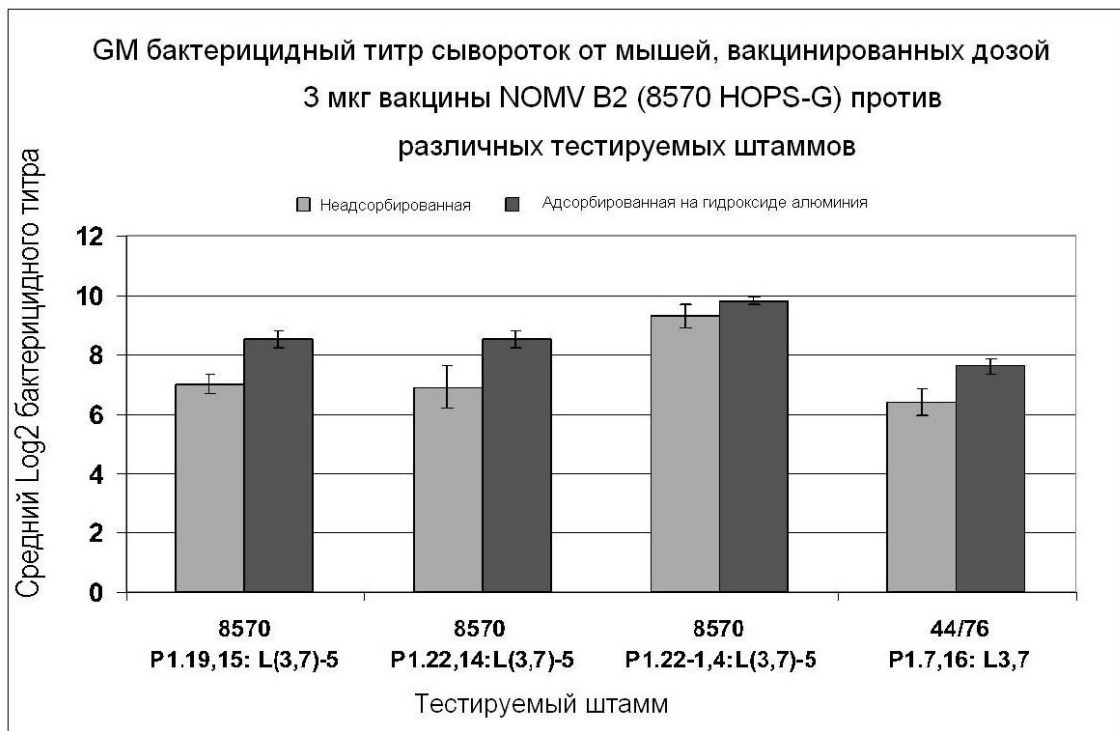
6) 0.3 мкг + Rehydragel LV

7) 1.0 мкг + Rehydragel LV

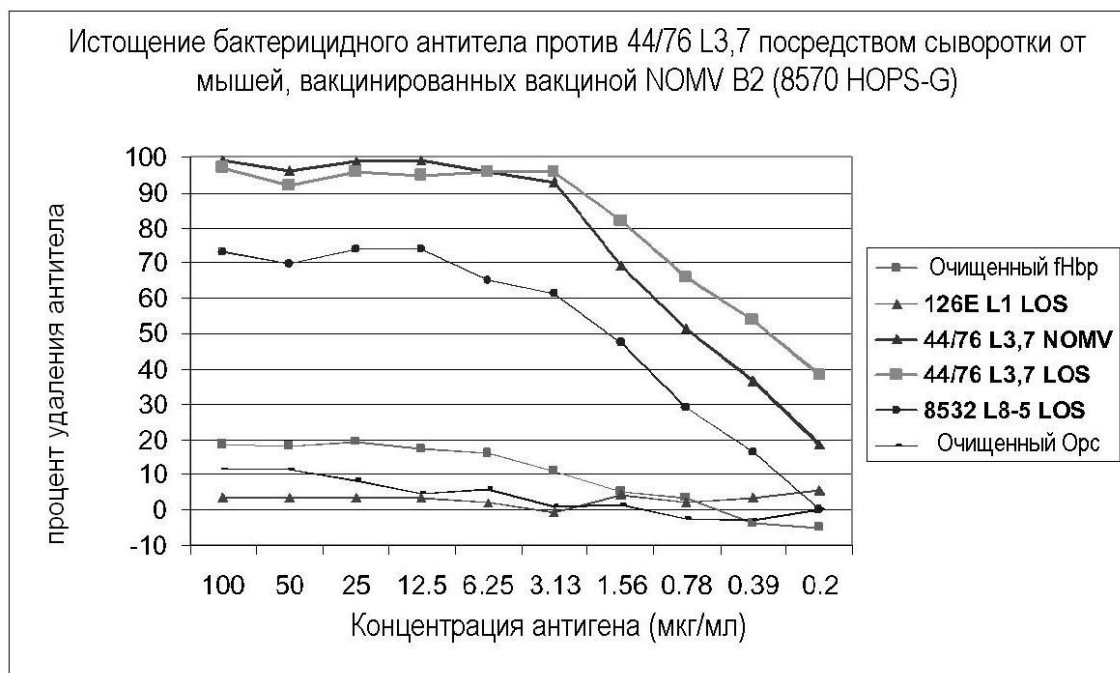
8) 3.0 мкг + Rehydragel LV

9) 1.0 мкг + Rehydragel HPA

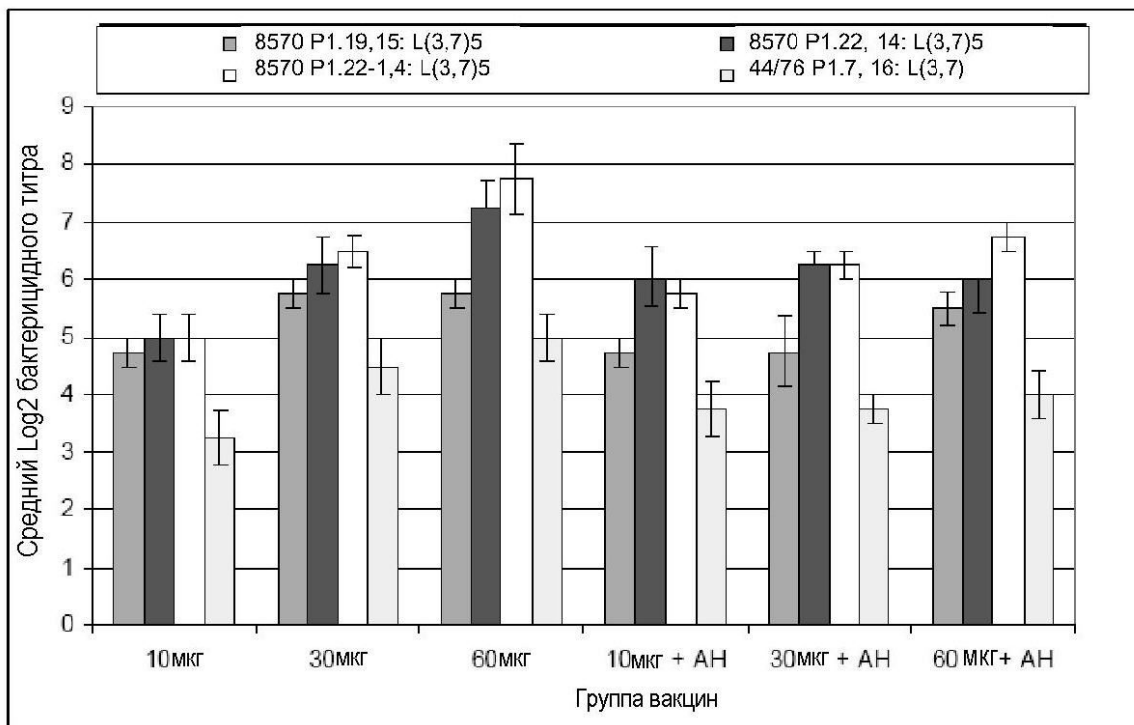
ФИГ.12



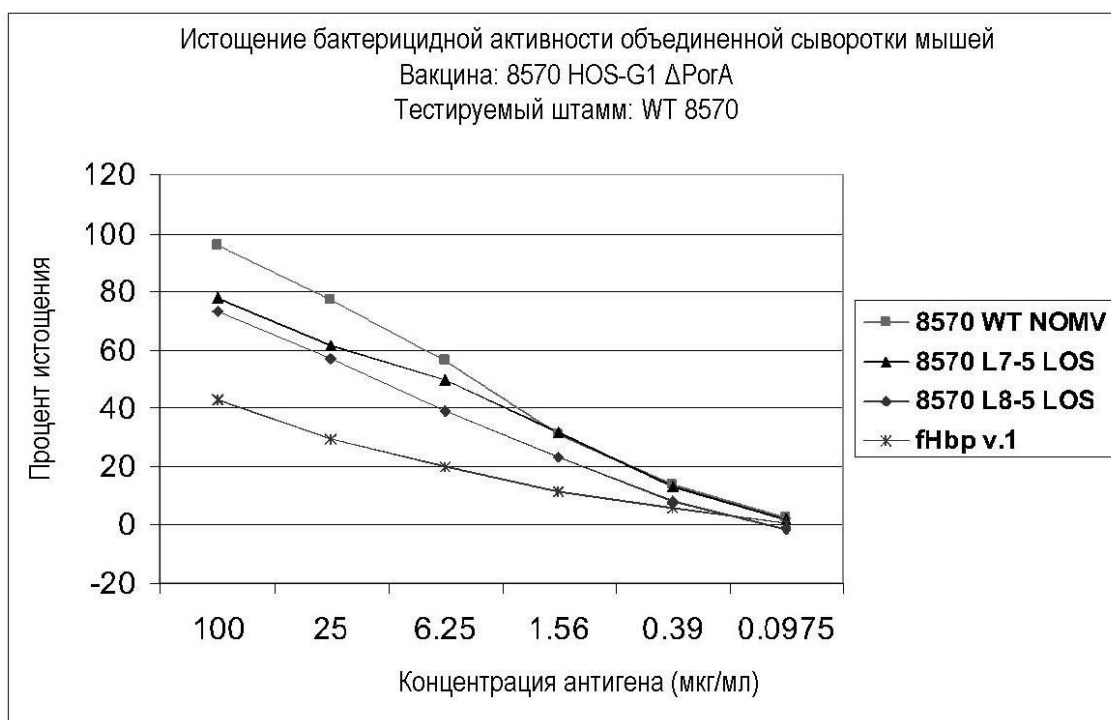
ФИГ.13



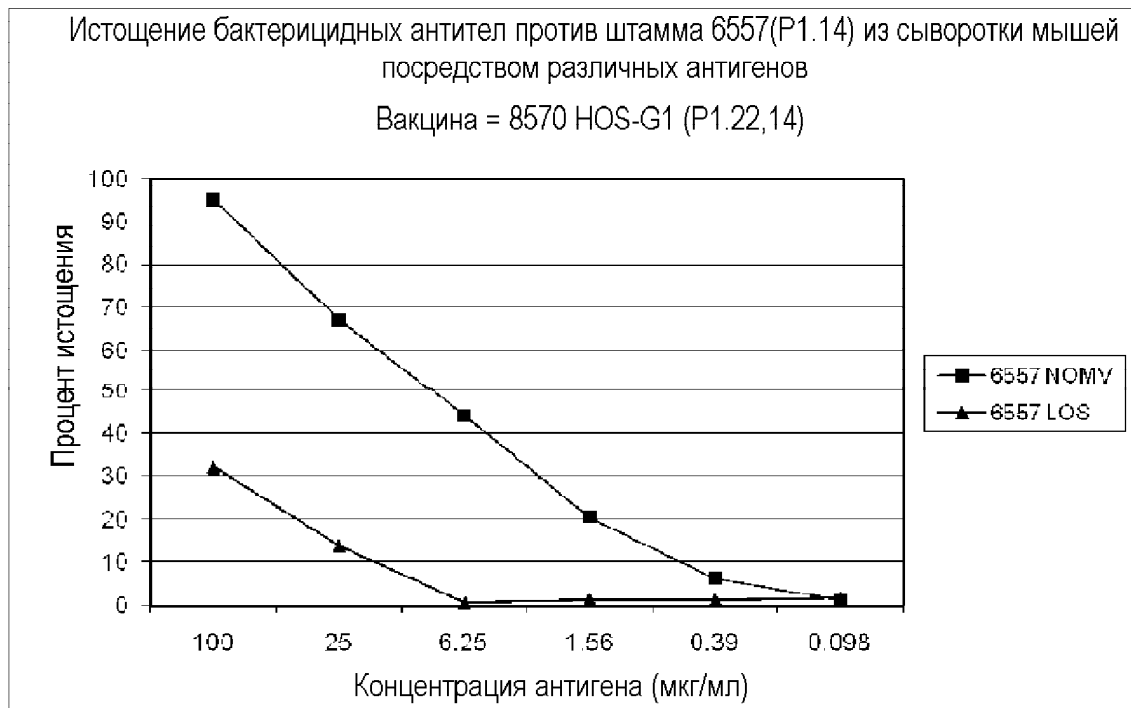
ФИГ.14



ФИГ.15



ФИГ.16



ФИГ.17

Штамм В1

Родительский
H44/76
B:15:P1.7.16:L3.7
Клон ET-5
PorB3
TbpB изотип II

Штамм В2

Родительский
8570
B:4:P1.19.15:L(3.7)-5
Клон ET-5
PorB3
TbpB изотип II

Штамм В3

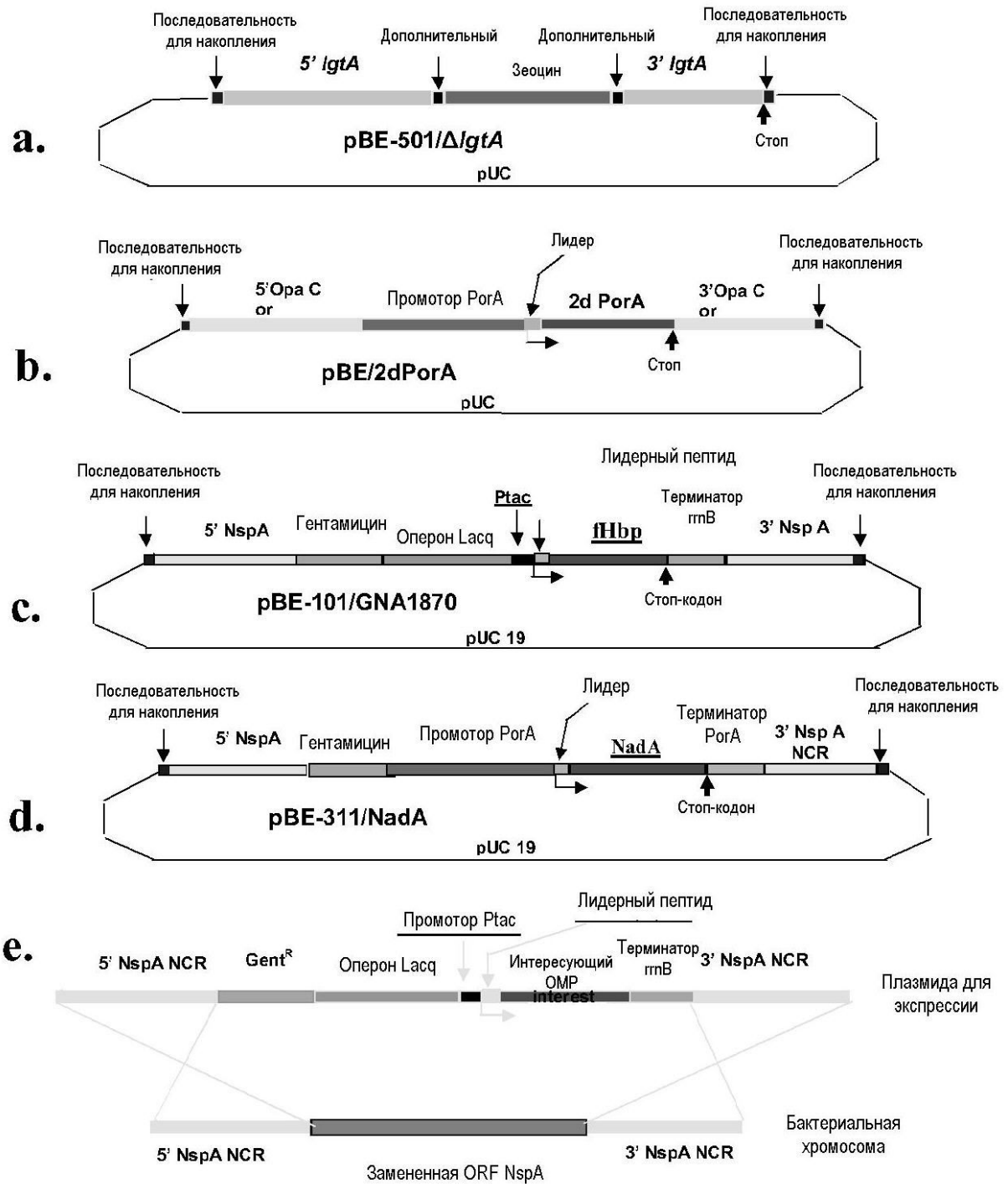
Родительский
B16B6
B:2a:P1.5.2:L2
Клон ET-37
PorB2
TbpB изотип II

Мутации
делеция synX
делеция lpxL1
Добавление 2-го PorA (P1.7-1.1)
Сверхэкспрессия NadA
Стабильная экспрессия L8-3
LOS и Oprс

Мутации
делеция synX
делеция lpxL1
Добавление 2-го PorA (P1.22,14)
Сверхэкспрессия fHbp (v.1)
Стабильная экспрессия L8-5
LOS и Oprс

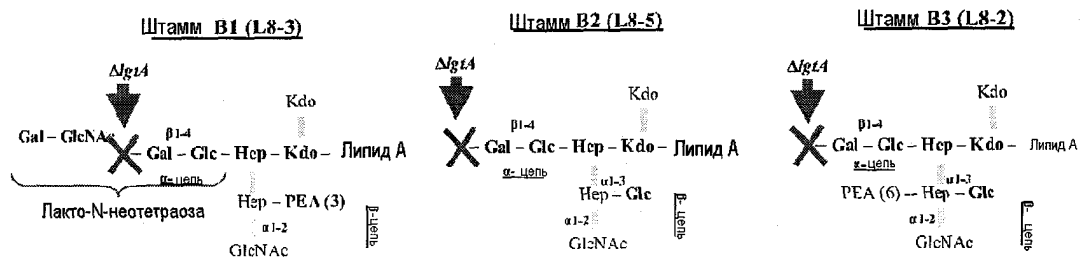
Мутации
делеция synX
делеция lpxL1
Добавление 2-го PorA (P1.22-1,4)
Сверхэкспрессия fHbp (v.2)
Стабильная экспрессия L8-2

ФИГ.18

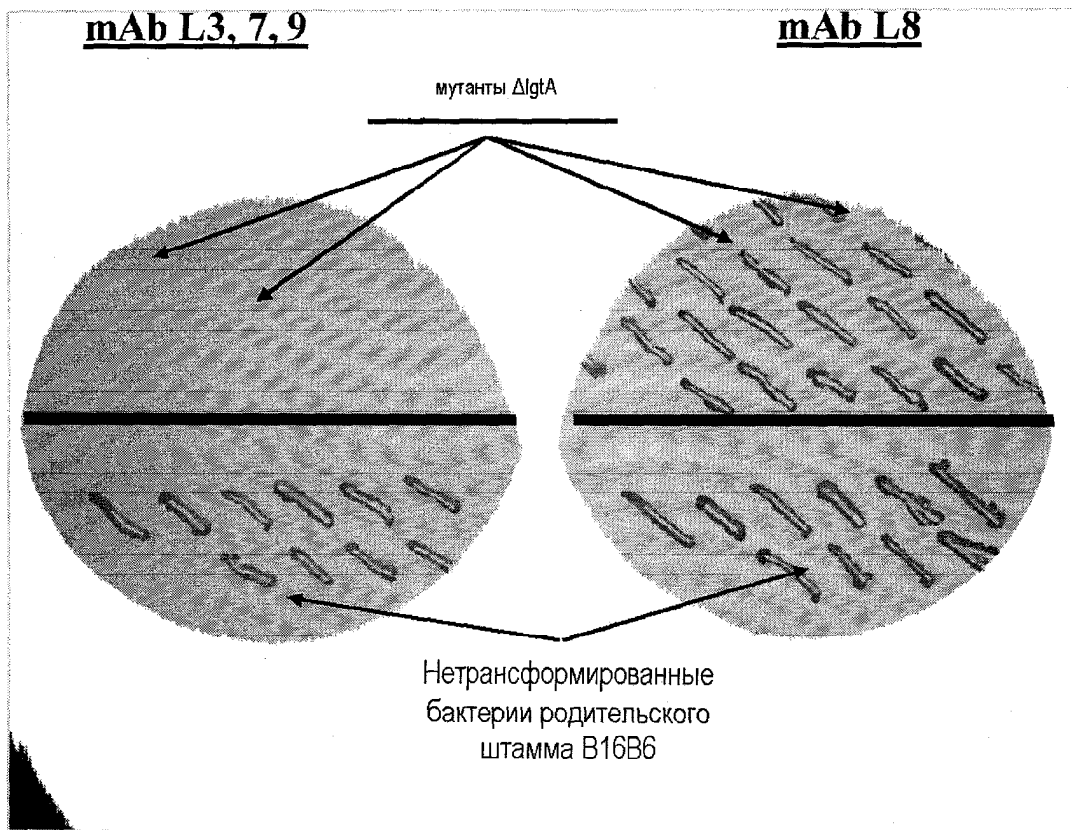


ФИГ.19

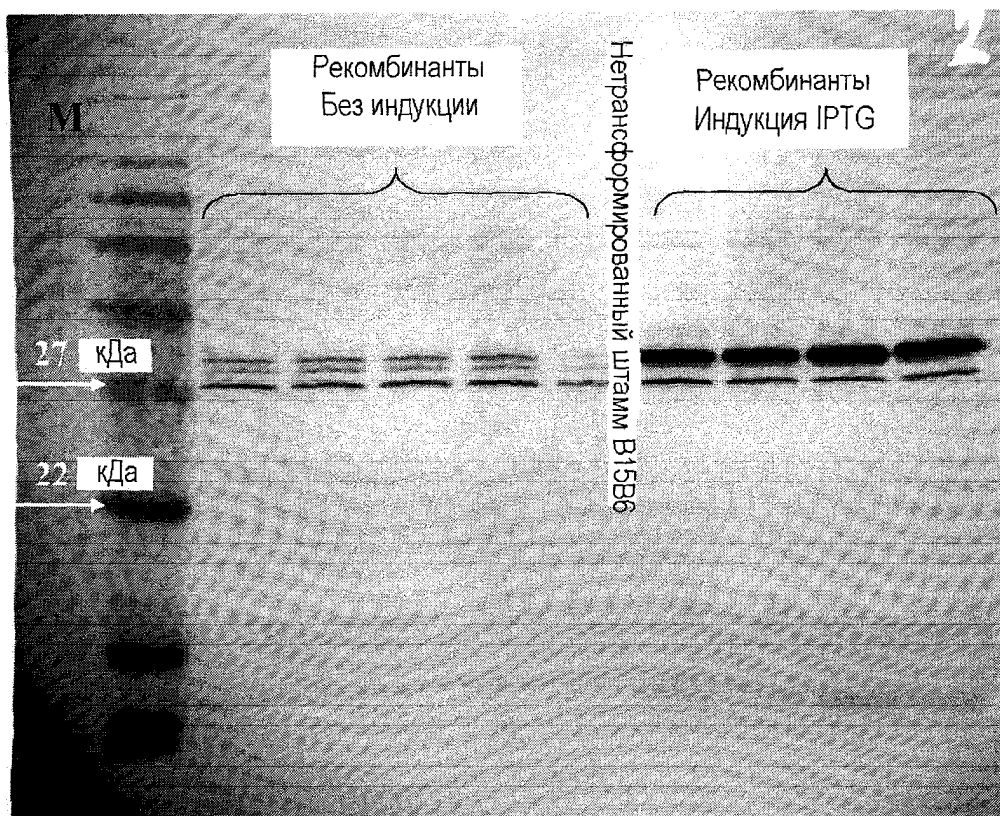
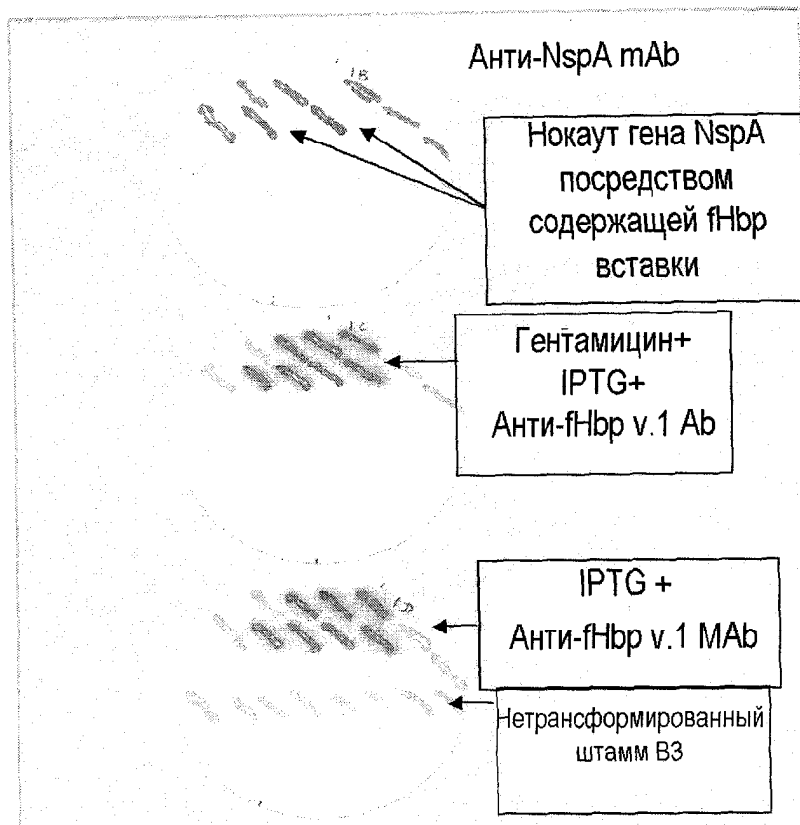
A.



B.



ФИГ.20



ФИГ.21