



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011142747/15, 24.03.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.03.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.03.2009 US 61/162,996

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2013 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 27.04.2015 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2004/014418 A2, 19.02.2004. WESSELS M.R., et al., Antibody recognition of the type 14 pneumococcal capsule. Evidence for a conformational epitope in a neutral polysaccharide. J Exp Med. 1989 Jun 1;169(6): 2121-31. WO 2007/116028 A2, 18.10.2007. VAN DEN DOBBELSTEEN GP., et al., Immunogenicity of a combination vaccine containing pneumococcal (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 24.10.2011

(86) Заявка РСТ:
IB 2010/000735 (24.03.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/109325 (30.09.2010)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КОСТАНТИНО Паоло (ИТ)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС АГ (СН)

(54) КОМБИНАЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ САХАРИД ПНЕВМОКОККА СЕРОТИПА 14

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается адъювантной иммуногенной композиции, содержащей липоолигосахарид менингококка (LOS) и капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14 (CS14), где CS14 содержит тетрасахарид Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, а LOS не содержит тетрасахарид Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc. Группа изобретений

также касается способа индукции иммунного ответа у млекопитающего, включающего введение указанной композиции. Группа изобретений обеспечивает более сильный ответ на CS14 по сравнению с OMV дикого типа, включающего LNPt. 2 н. и 13 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

conjugates and meningococcal PorA OMVs. *Vaccine*. 2007 Mar 22;25(13):2491-6. Epub 2006 Sep 20.
TSAI CM., Molecular mimicry of host structures by lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*:
characterization of sialylated and nonsialylated lacto-N-neotetraose (Galbeta1-4GlcNAcbeta1-3Galbeta1-4Glc) structures in lipooligosaccharides using monoclonal antibodies and specific lectins. *Adv Exp Med Biol*. 2001;491:525-42

R U
2 5 4 9 4 3 8
C 2

R U
2 5 4 9 4 3 8
C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 549 438** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011142747/15, 24.03.2010**

(24) Effective date for property rights:
24.03.2010

Priority:

(30) Convention priority:
24.03.2009 US 61/162,996

(43) Application published: **27.04.2013** Bull. № 23

(45) Date of publication: **27.04.2015** Bull. № 12

(85) Commencement of national phase: **24.10.2011**

(86) PCT application:
IB 2010/000735 (24.03.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/109325 (30.09.2010)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

KOSTANTINO Paolo (IT)

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)

(54) COMBINATIONS CONTAINING SEROTYPE 14 PNEUMOCOCCAL SACCHARIDE

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine and concerns an adjuvant immunogenic composition containing meningococcal lipooligosaccharide (LOS) and serotype 14 pneumococcal capsular saccharide (CS14), wherein CS14 contains tetrasaccharide Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, while LOS is free from tetrasaccharide

Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc. The group of inventions also concerns a method for inducing the immune response in a mammal involving administering the above composition.

EFFECT: group of inventions provides the stronger immune response to CS14 A as compared to wild-type OMV containing LNnT.

15 cl, 4 dwg, 1 ex

Настоящая заявка претендует на приоритет предварительной заявки на патент США № 61/162996 (подана 24 марта 2009 г.), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к области комбинированных вакцин, в частности вакцин, содержащих капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14 и липоолигосахаридный компонент (например, из *Neisseria meningitis*).

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 *Streptococcus pneumoniae*, также известный как пневмококк, представляет собой грамположительную сферическую бактерию. Современные пневмококковые вакцины основаны на капсулярных сахарадах. Разрешенные к применению педиатрические вакцины представляют собой (a) PREVNAR™ - 7-валентную смесь конъюгированных сахаридов серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, (b) SYNFLORIX™ - десятивалентную смесь конъюгатов, также эффективную в отношении серотипов 1, 5 и 7F, и (c) PREVNAR 15 13™ - 13-валентную смесь конъюгатов, также эффективную в отношении серотипов 3, 6A и 19A. Также известны другие 9-, 10-, 11- и 13-валентные комбинации конъюгатов.

Neisseria meningitis, также известная как менингококк, представляет собой грамотрицательную сферическую бактерию. Современные менингококковые вакцины также основаны на капсулярных сахарадах. Эти вакцины включают моновалентные 20 конъюгатные вакцины против серогруппы C (MENJUGATE™, MENINGITEC™ и NEISVAC-C™) и 4-валентные смеси конъюгатов против серогрупп A, C, W135 и Y (MENACTRA™). В настоящее время нет разрешенной вакцины общего назначения против серогруппы B («MenB»). В текущих исследованиях, направленных на создание вакцины MenB, используются везикулы внешней мембраны (например, MENZB™, 25 HEXAMEN™, NONAMEN™) или очищенные компоненты внешней мембраны, такие как липоолигосахариды и белки внешней мембраны. В последнее время в фокус внимания попали вакцины MenB на основе везикул внешней мембраны, (OMV). Так, например, у Novartis Vaccines, GlaxoSmithKline и RIVM/NVI есть продукты на основе везикул.

30 В ссылке 1 раскрывается композиция для иммунизации против пневмококка и MenB, полученная путем комбинирования 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины («13vPnC»; PREVNAR 13™ производства Wyeth) с 9-валентной вакциной на основе везикул внешней мембраны MenB (NONAMEN™ производства NVI).

35 Существует потребность в новых улучшенных комбинированных вакцинах для защиты как от менингококка серогруппы B, так и пневмококка.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Автор обнаружил недостатки комбинированной вакцины согласно ссылке 1. Вакцина 13vPnC включает капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14 (CS14), а везикулы компонента MenB включают липоолигосахаридный компонент (LOS, также 40 обозначается LPS) внешней мембраны бактерии. Автор пришел к выводу, что LOS (по меньшей мере LOS менингококков иммунотипов L2, L3, L4 и L7) и CS14 содержат одну и ту же тетрасахаридную структуру Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc. Этот тетрасахарид, известный как лакто-N-неотетраоза (LNT), присутствует также у человека, в частности в грудном молоке, а также в виде концевой части лакто-N-неотетраозил церамида 45 (также известного как параглобозид), который является биосинтетическим предшественником гликофинголипидов групп крови ABH и P₁, а также некоторых ганглиозидов. Несмотря на то, что в человеческих тканях *in vivo* эпитоп LNT обычно закрыт концевым остатком сиаловой кислоты (также присутствует в MenB, но не в

CS14), в некоторых случаях (например, при пониженной температуре) он становится доступным для иммунной системы; связывание антитела с этим эпитопом ведет к гемолизу. Эта доступность приводит к аутоиммунной реакции, известной как болезнь холодowych агглютининов или АИНА (аутоиммунная гемолитическая анемия).

5 Автор пришел к выводу, что присутствие структуры L_{NnT} как в LOS MenB, так и в CS14 означает, что введение любого из этих антигенов пациенту потенциально может приводить к повышению уровня антител протв L_{NnT}. При одновременном введении этих двух антигенов существует риск очень сильного повышения уровня антител против L_{NnT}, особенно если антигены вводят вместе с адьювантом вакцины. Таким образом, 10 введение комбинированной вакцины, включающей как LOS MenB, так и CS14, несет в себе высокий риск индукции АИНА у пациентов, в особенности при введении вакцины в зимнее время. Изобретение направлено на снижение риска путем ограничения иммуногенного эффекта эпитопов L_{NnT} в таких вакцинах и представляет различные способы снижения риска продуцирования аутореактивных антител при одновременном 15 введении антигенов MenB и пневмококка.

В первом аспекте разрушают эпитоп L_{NnT} в составе LOS, или CS14, или в обоих. Таким образом, в изобретении представлена иммуногенная композиция, содержащая липоолигосахарид менингококка (LOS) и капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14 (CS14), где LOS и/или CS14 не включает (не включают) тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1- 20 3Gal β 1-4Glc. Иммуногенная композиция обычно также включает адьювант. Если эпитоп присутствует в составе одного из LOS и CS14, предпочтительно, если он отсутствует в составе LOS.

Во втором аспекте эпитоп L_{NnT} сохраняют в составе как LOS, так и CS14, но вакцина не содержит адьюванта. Таким образом, в изобретении представлена безадьювантная 25 иммуногенная композиция, содержащая липоолигосахарид менингококка (LOS) и капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14 (CS14), где как LOS, так и CS14 включают тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc. Например, может использоваться LOS менингококка иммунотипа L2 или L3 (или их смесь).

В третьем аспекте эпитоп L_{NnT} сохраняют в составе как LOS, так и CS14, однако их 30 дозировка уменьшена. Таким образом, в изобретении представлена иммуногенная композиция, содержащая липоолигосахарид менингококка (LOS) и капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14 (CS14), где (i) как LOS, так и CS14 включают тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, (ii) концентрация LOS меньше 5 мкг/мл, и (iii) концентрация CS14 меньше 5 мкг/мл.

35 В четвертом аспекте вакцину против MenB и пневмококка типа 14 получают с использованием L_{NnT}-содержащих LOS против MenB и белкового антигена против пневмококка. Таким образом, в настоящем изобретении представлена иммуногенная композиция, содержащая липоолигосахарид менингококка (LOS) и полипептидный антиген пневмококка, где (i) LOS включает тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, 40 (ii) полипептид пневмококка может вызывать иммунный ответ, эффективный против пневмококка серотипа 14, и (iii) композиция не включает капсулярного сахарада пневмококка.

В пятом аспекте вакцину против MenB и пневмококка типа 14 получают с использованием капсулярного сахарада CS14, содержащего L_{NnT}, и антигена против 45 MenB, отличного от LOS. Таким образом, в изобретении представлена иммуногенная композиция, содержащая полипептид менингококка и капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14, где (i) капсулярный сахарид включает тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, (ii) полипептид менингококка может вызывать иммунный ответ,

эффективный против менингококка серогруппы В, и (iii) композиция не включает липоолигосахарида менингококка.

В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные композиции включают не более одного сероподтипа PorA менингококка, например, они могут не включать белок внешней мембраны PorA.

Липоолигосахарид менингококка

LOS менингококка представляет собой глюкозаминный фосфолипид, находящийся во внешнем слое внешней мембраны бактерии. Он делится на липид А и коровый олигосахарид, причем липид А служит гидрофобным якорем в мембране. Гетерогенность олигосахаридного кора обеспечивает структурное и антигенное разнообразие различных штаммов менингококка, на основании которого штаммы делятся на 12 иммунотипов (L1-L12). На фигуре 1 показаны коровые сахараиды иммунотипа L3. α -Цепь, связанная с Нер^I (гептозой), содержит тетрасахарид L_{NnT} и кэп сиаловой кислоты. Такая же структура наблюдается у иммунотипов L7 и L9. Иммунотипы L2 и L4 содержат такую же α -цепь, как и L3, но другие β - и/или γ -цепи, связанные с Нер^{II}. Остаток KDO^I (2-кето-3-дезоксиктулозоновой кислоты) прикреплен к липиду А LOS и также часто связан со вторым остатком KDO (на фигуре 1 обозначен как KDO^{II}).

α -Цепи L2 и L3 содержат тетрасахарид L_{NnT}. При использовании в изобретении LOS, не содержащего тетрасахарида L_{NnT}, может использоваться LOS другого иммунотипа (например, L1, L4, L5, L6 или L8). Однако в некоторых воплощениях желательно сохранить эпитопы L2 и/или L3 (отличные от их эпитопов L_{NnT}). Этого можно достигнуть, используя мутантные штаммы, не способные синтезировать тетрасахарид L_{NnT} в составе α -цепи. Известно, что такого результата можно достигнуть с помощью нокаута ферментов, осуществляющих соответствующие присоединения в ходе биосинтеза (см., например, ссылки 2-7). Например, нокаут фермента LgtB предотвращает присоединение терминальной галактозы L_{NnT}, а также дальнейшее присоединение терминальной сиаловой кислоты к α -цепи. Нокаут фермента LgtA предотвращает присоединение N-ацетилглюкозамина L_{NnT} и все дальнейшие присоединения. Нокаут LgtA может сопровождаться нокаутом LgtC, если рассматриваемый штамм содержит ген *lgtC* (например, штамм MC58 менингококка серогруппы В с иммунотипом L3 состоит из *lgtA*, *lgtB* и *lgtE* и не содержит *lgtC* и *lgtD*). Сходным образом, нокаут LgtE и/или фермента GalE предотвращает присоединение внутренней галактозы, а нокаут LgtF предотвращает присоединение глюкозы к остатку Нер^I. Любой из этих нокаутов может использоваться по отдельности или в комбинации для разрушения тетрасахарида L_{NnT} в штамме иммунотипа L2, L3, L4, L7 или L9. Предпочтителен нокаут по меньшей мере LgtB, поскольку в результате его получается LOS, сохраняющий полезную иммуногенность, но не включающий эпитопа L_{NnT}.

Помимо мутаций, разрушающих эпитоп L_{NnT}, нокаут гена *galE* также приводит к образованию полезного модифицированного LOS, и сходным образом возможно нокаутировать ген трансферазы жирных кислот липида А [8]. От LOS можно отщепить по меньшей мере одну первичную О-связанную жирную кислоту [9]. Также можно использовать LOS с меньшим числом вторичных ацильных цепей на молекулу LOS [10]. Обычно LOS включает по меньшей мере структуру GlcNAc-Нер₂-фосфоэтаноламин-KDO₂-липид А [11]. LOS может включать трисахарид GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, но не включать тетрасахарид L_{NnT}.

Композиции согласно изобретению могут включать LOS в различных формах. LOS

может использоваться в очищенном виде сам по себе. Он может быть конъюгирован с белком-носителем. Он может присутствовать в составе везикул внешней мембраны менингококка. Он может быть конъюгирован с везикулами внешней мембраны менингококка.

Конъюгация LOS может осуществляться через липид A или через любую другую подходящую группу в его составе, например, через остатки KDO. Такое альтернативное связывание необходимо при отсутствии липида A в составе LOS. Техники конъюгации LOS известны, например, из ссылок 9, 11, 12, 13 и т.д. Предпочтительные белки-носители для этих конъюгатов представляют собой бактериальные токсины, такие как дифтерийный или столбнячный токсины, или их токсины, или мутанты. Они обычно используются в конъюгированных вакцинах. Пригоден мутант CRM₁₉₇ дифтерийного токсина [14]. Другие пригодные белки-носители включают белковый комплекс внешней мембраны *N. meningitidis* [15], синтетические пептиды [16, 17], белки теплового шока [18, 19], белки коклюша [20, 21], цитокины [22], лимфокины [22], гормоны [22], факторы роста [22], искусственные белки, содержащие множественные эпитопы CD4+ Т-клеток человека из различных антигенов патогенного происхождения [23], такие как N19 [24], белок D *H. influenzae* [25-27], пневмолизин [28] или его нетоксичные производные [29], поверхностный белок пневмококка PspA [30], белки усвоения железа [31], токсины A или B *C. difficile* [32], рекомбинантный экзопротеин A (rEPA) *Pseudomonas aeruginosa* [33] и т.д.

LOS могут находиться в составе везикулы. Такие везикулы включают любые протеолипосомные везикулы, полученные путем разрыва или блеббинга внешней мембраны менингококка с образованием везикул, включающих белковые компоненты и LOS внешней мембраны. Таким образом, термин включает OMV (иногда называемые «блебами»), микровезикулы («MV», [34]) и «нативные OMV» («NOMV», [35]).

MV и NOMV представляют собой природные мембранные везикулы, спонтанно образующиеся в процессе роста бактерий и высвобождаемые в культуральную среду. MV можно получать путем культивирования *Neisseria* в жидкой питательной среде, отделения целых клеток от меньших по размеру MV в жидкой питательной среде (например, с помощью фильтрации или центрифугирования на низкой скорости для осаждения только клеток, но не меньших по размеру везикул) и дальнейшего сбора MV из среды без клеток (например, с помощью фильтрации, дифференциальной преципитации или агрегации MV, с помощью центрифугирования на высокой скорости для осаждения MV). Штаммы, используемые для получения MV, могут в общем выбираться в зависимости от количества MV, продуцируемых в культуре, например, в ссылках 36 и 37 описана *Neisseria*, продуцирующая большое количество MV.

OMV, получаемые искусственно из бактерий, можно получать с использованием детергента (например, дезоксихолата) или без (см. например, ссылку 38). Техники образования OMV включают обработку бактерий детергентом на основе солей желчных кислот (например, солей литохолиевой кислоты, хенодезоксихолиевой кислоты, урсодезоксихолиевой кислоты, дезоксихолиевой кислоты, холиевой кислоты, урсохолиевой кислоты и т.д.; для обработки *Neisseria* предпочтителен дезоксихолат натрия [39 и 40] при значении pH, достаточно высоком, для того чтобы детергент не выпадал в осадок [41]. Другие техники могут применяться практически в отсутствие детергента [38] с использованием таких техник, как соникация, гомогенизация, микрофлюидизация, кавитация, осмотический шок, размалывание, френч-пресс, перемешивание и т.д. При использовании способов без детергента или с низкой концентрацией детергента могут сохраняться полезные антигены, такие как NspA [38].

Таким образом, в способе может использоваться буфер для экстракции OMV с 0,5% дезоксихолата или меньше, например примерно 0,2%, примерно 0,1%, <0,05% или 0.

Полезный процесс получения OMV, описанный в ссылке 42, включает ультрафильтрацию неочищенных OMV, а не центрифугирование на высокой скорости.

5 Процесс может включать стадию ультрацентрифугирования после ультрафильтрации.

Везикулы для использования в настоящем изобретении могут быть получены из любого штамма менингококка. Как правило, везикулы получают из штамма серогруппы В, однако возможно получить их и из серогрупп, отличных от В (например, в ссылке 41 описан процесс для серогруппы А), таких как А, С, W135 или Y. Штамм может
10 принадлежать к любому серотипу (например, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16 и т.д.), любому сероподтипу и любому иммунотипу (например, L1; L2; L3; L3,3,7; L10 и т.д.).

Менингококки могут принадлежать к любой подходящей линии, включая гиперинвазивные и гипервирулентные, например, к одному из следующих семи гипервирулентных линий: подгруппа I; подгруппа III; подгруппа IV-1; комплекс ET-5;
15 комплекс ET-37; кластер A4; линия 3. Эти линии определяют с помощью мультилокусного ферментативного электрофореза (MLEE), но также для классификации менингококков можно использовать мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) [43], например, комплекс ET-37 представляет собой комплекс ST-11 по данным MLST, комплекс ET-5 представляет собой комплекс ST-32 (ET-5), линия 3 представляет
20 собой ST-41/44 и т.д. Везикулы можно получать из штаммов одного из следующих подтипов: P1.2; P1.2,5; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.5,c; P1.5c,10; P1.7,16; P1.7,16b; P1.7h,4; P1.9; P1.15; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.21,16; P1.22,14.

Везикулы для использования в настоящем изобретении можно получать из штаммов менингококка дикого типа или мутантных штаммов менингококка. Например, в ссылке
25 44 описано получение везикул из *N. meningitidis* с модифицированным геном *fur*. В ссылке 51 показано, что одновременно с нокаутом *porA* и *cps* экспрессия *nspA* должна быть повышена. Дополнительные нокаутные мутанты *N. meningitidis* для получения OMV раскрыты в ссылках 3, 51 и 52. В ссылке 45 раскрыты везикулы с повышенным fHBP. В ссылке 46 раскрыто конструирование везикул из штаммов, модифицированных
30 для экспрессии различных подтипов PorA. В настоящем изобретении могут использоваться эти или другие мутанты.

Таким образом, штамм, используемый в настоящем изобретении, в некоторых воплощениях может экспрессировать более одного подтипа PorA. Ранее были сконструированы 6-валентные и 9-валентные штаммы в отношении PorA. Штамм может
35 экспрессировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 подтипов PorA: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1 и/или P1.18-1,3,6. Однако в других воплощениях может использоваться штамм с пониженной экспрессией PorA, например, в котором количество PorA уменьшено на по меньшей мере 20% (например, на $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$ и т.д.) относительно уровня дикого типа (например,
40 относительно штамма H44/76, или PorA может быть нокаутирован, как описано в ссылке 51).

Предпочтительно, было показано, что везикулы, полученные из штамма менингококка LgtB^{ve}, усиливают ответ на CS14 в комбинированном препарате.

LOS могут быть получены из штамма (например, генетически сконструированного штамма менингококка), имеющего постоянный (т.е. без фазовой вариации) иммунотип
45 LOS, как описано в ссылке 47. Например, постоянными могут быть иммунотипы LOS L2 и L3. Такие штаммы могут менять свой иммунотип более чем в 2 раза реже (даже в 50 раз), чем исходный штамм дикого типа. В ссылке 47 раскрывается, как получить

такой результат путем модификации продуктов генов *lgtA* и/или *lgtC*.

В некоторых воплощениях у штамма может наблюдаться повышенная экспрессия определенных белков (относительно соответствующего штамма дикого типа). Например, у штамма может наблюдаться повышенная экспрессия *NspA*, белка 287 [48], *fHBP* [45], *TbpA* и/или *TbpB* [49], *Cu,Zn*-зависимой супероксиддисмутазы [49] и т.д.

В некоторых воплощениях штамм может содержать одну или более мутаций, приводящих к нокауту или повышенной экспрессии, описанных в ссылках 3 и 50-52. Гены, подходящие для даун-регуляции и/или для нокаута, включают: (a) *Cps*, *CtrA*, *CtrB*, *CtrC*, *CtrD*, *FrpB*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* и/или *TbpB* [50]; (b) *CtrA*, *CtrB*, *CtrC*, *CtrD*, *FrpB*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PhoP*, *PilC*, *PmrE*, *PmrF*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* и/или *TbpB* [51]; (c) *ExbB*, *ExbD*, *rmpM*, *CtrA*, *CtrB*, *CtrD*, *GalE*, *LbpA*, *LpbB*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* и/или *TbpB* [52]; и (d) *CtrA*, *CtrB*, *CtrD*, *FrpB*, *OpA*, *OpC*, *PilC*, *PorB*, *SiaD*, *SynA*, *SynB* и/или *SynC* [3].

При использовании мутантного штамма в некоторых воплощениях он может обладать одной или более или всеми следующими характеристиками, необязательно помимо мутаций, разрушающих *LNnT*: (i) повышенный *TbpA*; (ii) повышенный *NhhA*; (iii) повышенный *Omp85*; (iv) повышенный *LbpA*; (v) повышенный *NspA*; (vi) нокаутированный *PorA*; (vii) пониженный или нокаутированный *FrpB*; (viii) пониженный или нокаутированный *Opa*; (ix) пониженный или нокаутированный *Opc*; (x) делетированный комплекс генов *срх*.

Предпочтительно, если *LOS* в составе везикулы может быть обработан определенным образом с целью связывания *LOS* и белковых компонентов в везикуле («внутрипузырьковая» конъюгация [3]).

LOS может быть *O*-ацетилирован по остатку *GlcNAc*, присоединенному к его остатку гептозы II, например, для *L3* [53].

Иммуногенная композиция может включать более одного типа *LOS*, например, *LOS* менингококков иммунотипов *L2* и *L3*. Например, могут использоваться комбинации *LOS*, описанные в ссылке 54.

В некоторых воплощениях *LOS* может присутствовать в композиции в концентрации менее чем 5 мкг/мл, например, ≤ 4 мкг/мл, ≤ 3 мкг/мл, ≤ 2 мкг/мл, ≤ 1 мкг/мл. Такая низкая концентрация может использоваться, если в *CS14* сохраняется эпитоп *LNnT*.

Антиген *LOS* может предпочтительно индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

Капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14

Композиции согласно изобретению включают капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14 (*CS14*). В ссылке 55 показано, что *CS14* содержит повторяющуюся структуру, приведенную на фигуре 2.

Сахарид *CS14*, используемый в изобретении, обычно включает повторяющиеся единицы дикого типа, однако в некоторых воплощениях может быть модифицирован для исключения тетрасахарида $\text{Gal}\beta\text{-4GlcNAc}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Glc}$. Такая модификация может осуществляться путем нокаута одного или более значимых ферментов биосинтеза или химического и/или ферментативного воздействия на сахарид для модификации одного или более из четырех остатков в составе тетрасахарида. Например, эндо- β -галактозидаза, очищенная из культуральных супернатантов *Cytophaga keratolytica*, катализирует гидролиз связей галактоза $\beta(1\rightarrow4)$ глюкоза чувствительных полисахаридов, включая *CS14*.

CS14 может быть *N*-ацетилирован. Как описано в ссылке 56, например, он может

быть N-ацетилирован на более чем 50%, 60%, 70%, 80% или 90%.

Обычно CS14 включают в композицию в виде конъюгата. Подходящие белки-носители для таких конъюгатов описаны выше, например, бактериальные токсины, такие как дифтерийный или столбнячный токсины, или их токсиды или мутанты, такие как CRM₁₉₇, белковый комплекс внешней мембраны *N. meningitidis*, синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, включающие множественные эпитопы CD4⁺ Т-клеток различных антигенов патогенного происхождения, таких как N19, белок D *H. influenzae*, пневмолизин или его нетоксичные производные, поверхностный белок пневмококка PspA, белки усвоения железа, токсин А или В *C. difficile*, rEPA и т.д. Особенно пригодны в роли белков-носителей CS14: CRM197, токсид столбняка, токсид дифтерии и белок D *H. influenzae*. В особенности пригоден CRM197, как показано в PREVNAR™.

Молекула-носитель может быть ковалентно конъюгирована к CS14 напрямую или посредством линкера. Известны различные линкеры, например линкер на основе адипиновой кислоты, который может образовываться путем спаривания свободной группы -NH₂ (например, введенной в сахарид с помощью аминирования) с адипиновой кислотой (например, с использованием диимидной активации) и дальнейшего спаривания белка с полученным промежуточным продуктом сахарада-адипиновой кислоты [57, 58]. Другой предпочтительный тип связи представляет собой карбонильный линкер, который может образовываться посредством реакции свободной гидроксильной группы модифицированного сахарада с CDI [59, 60] с последующей реакцией с белком с образованием карбаматной связи. Другие линкеры включают β-пропионамидо [61], нитрофенил-этиламин [62], галоацил галидов [63], гликозидных связей [64], 6-аминокапроновой кислоты [65], N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)-пропионата (SPDP) [66], дигидразида адипиновой кислоты ADH [67], групп C₄-C₁₂ [68] и т.д. Также может использоваться карбодиимидная конденсация [69].

Может использоваться конъюгация CS14 путем восстановительного аминирования. Сахарид вначале может быть окислен периодатом для введения альдегидной группы, которая затем может образовывать прямую ковалентную связь с белком-носителем путем восстановительного аминирования, например, с ε-аминогруппой лизина. Если сахарид включает множественные альдегидные группы в одной молекуле, такая техника связывания может привести к образованию продукта с поперечными сшивками, где множественные альдегиды реагируют с множественными аминами носителя.

Сахарид CS14 может содержать полноразмерный интактный сахарид, полученный из пневмококка, и/или может содержать фрагменты полноразмерных сахаридов, т.е. более коротких сахаридов, чем нативные капсулярные сахариды, встречающиеся у бактерий. Таким образом, сахариды могут быть деполимеризованы, причем деполимеризация может происходить во время или после очистки сахарада, но до конъюгации. Деполимеризация уменьшает длину цепи сахаридов. Деполимеризация может использоваться для достижения длины цепи, оптимальной для иммуногенности, и/или для уменьшения длины цепи для физической управляемости сахаридов. Как видно из PREVNAR™, предпочтителен интактный CS14.

В некоторых воплощениях CS14 присутствует в композиции в концентрации менее чем 5 мкг/мл, например, ≤4 мкг/мл, ≤3 мкг/мл, ≤2 мкг/мл, ≤1 мкг/мл. Такая низкая концентрация может использоваться, если в CS14 сохраняется эпитоп L_{Nn}T. Удобна концентрация примерно 4 мкг/мл.

Антиген CS14 может предпочтительно индуцировать антикапсулярные антитела, связывающиеся с CS14, например индуцировать уровень антител против CS14 $\geq 0,20$ мг/мл [70]. Уровень антител можно оценить с помощью иммуоферментного анализа (EIA) и/или опсонофагоцитарной активности (OPA). Эффективность способа EIA была многократно подтверждена, и существует связь между концентрацией антител и эффективностью вакцины.

Альтернативные менингококковые антигены

В некоторых воплощениях настоящего изобретения композиция включает капсулярный сахарид CS14, содержащий LNT, и антиген против MenB, отличный от LOS. Альтернативы LOS включают полипептидные антигены, такие как fHBP, 287, NadA, NspA, HmbR, NhhA, App и/или Omp85. Полезно, если эти антигены присутствуют в виде очищенных полипептидов, например рекомбинантных полипептидов.

Менингококковый антиген может предпочтительно индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

Фактор fHBP (белок, связывающий фактор H)

Композиция согласно изобретению может содержать антиген fHBP. Антиген fHBP детально описан. Он также известен как белок «741» [SEQ ID NO:2535 и 2536 в ссылке 81], «NMB1870», «GNA1870» [ссылки 71-73], «P2086», «LP2086» или «ORF2086» [74-76]. Он представляет собой натуральный липопротейн и экспрессируется менингококками всех серогрупп. Структура С-концевого иммунодоминантного домена (fHbpC) была определена с помощью NMR [77]. Эта часть белка образует 8-нитевой β -бочонок, нити которого соединены петлями различной длины. Бочонку предшествует короткая α -спираль и гибкий N-концевой хвост.

Существуют три различных варианта антигена fHBP [78], и известно, что сыворотка против определенного семейства обладает бактерицидными свойствами против членов этого семейства, но не активна в отношении штаммов, экспрессирующих одно из двух других семейств, т.е. существует перекрестная защита внутри семейства, но не между семействами. В настоящем изобретении может использоваться единственный вариант fHBP, но полезно включать fHBP из двух или трех вариантов.

Если в изобретении используется один вариант fHBP, композиция может включать полипептид, содержащий: (а) аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на а% SEQ ID NO:1, и/или содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере х последовательных аминокислот из SEQ ID NO:1; или (b) аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на b% SEQ ID NO:2, и/или содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере у последовательных аминокислот из SEQ ID NO:2; или (с) аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на с% SEQ ID NO:3, и/или содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере z последовательных аминокислот из SEQ ID NO:3.

Если в изобретении используется fHBP из двух или трех вариантов, композиция может включать комбинацию двух или трех различных fHBP, выбираемых из: (а) первого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на а% SEQ ID NO:1, и/или содержащего аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере х последовательных аминокислот из SEQ ID NO:1; (b) второго полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на b% SEQ ID NO:2, и/или содержащего аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по

меньшей мере у последовательных аминокислот из SEQ ID NO:2; и/или (с) третьего полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на с% SEQ ID NO:3, и/или содержащего аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере z последовательных аминокислот из SEQ ID NO:3.

Если в изобретении используется fHBP из двух вариантов, композиция может включать как: (а) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на а% SEQ ID NO:1, и/или содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере х последовательных аминокислот из SEQ ID NO:1; так и (b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на b% SEQ ID NO:2, и/или содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере у последовательных аминокислот из SEQ ID NO:2. Первый и второй полипептиды имеют разные аминокислотные последовательности.

Если в изобретении используется fHBP из двух вариантов, композиция может включать как: (а) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на а% SEQ ID NO:1, и/или содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере х последовательных аминокислот из SEQ ID NO:1; так и (b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на с% SEQ ID NO:3, и/или содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере z последовательных аминокислот из SEQ ID NO:3. Первый и второй полипептиды имеют разные аминокислотные последовательности.

Параметр а равен по меньшей мере 85, например, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или более. Параметр b равен по меньшей мере 85, например, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или более. Параметр с равен по меньшей мере 85, например, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или более. Величины а, b и с не зависят друг от друга.

Параметр х равен по меньшей мере 7, например, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Параметр у равен по меньшей мере 7, например, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Параметр z равен по меньшей мере 7, например, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Величины х, у, и z не зависят друг от друга. Фрагменты SEQ ID NO:1, 2 и 3 предпочтительно содержат эпитоп соответствующей SEQ ID.

Пригодная композиция может включать полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% SEQ ID NO:3 (например, по меньшей мере на 93%), и/или содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из фрагмента из по меньшей мере 40 последовательных аминокислот из SEQ ID NO:3.

В некоторых воплощениях к полипептиду (полипептидам) fHBP могут быть присоединяться липиды, например, через N-концевой цистеин, обычно с образованием трипальмитоил-S-глицерилцистеина. В других воплощениях липиды могут не присоединяться.

Введение fHBP предпочтительно индуцирует антитела, способные связываться с полипептидом менингококка, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ

ID NO:1, 2 или 3. Предпочтительные антигены fHBP для использования в настоящем изобретении могут индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

Независимо от того, присутствует ли один или несколько полипептидов fHBP, общая
5 доза fHBP может лежать в пределах от 60 мкг на дозу до 200 мкг на дозу.

287

Композиция согласно изобретению может включать антиген 287. Антиген 287
включен в опубликованную последовательность генома штамма менингококка MC58
сероварии B [79] как ген NMB2132 (номер доступа в GenBank GI:7227388; SEQ ID NO:9
10 в настоящем документе). На сегодняшний день опубликованы последовательности
антигена 287 из многих штаммов. Например, аллельные формы 287 приведены на
фигурах 5 и 15 в ссылке 80 и в примере 13 и на фигуре 21 в ссылке 81 (SEQ ID NO:3179-
3184 в ней). Также были описаны различные иммуногенные фрагменты антигена 287.

Предпочтительные антигены 287 для использования в настоящем изобретении
15 содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более
(например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,
98%, 99%, 99,5% или более) SEQ ID NO:9; и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей
мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:9, где n равно или больше 7
(например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или
20 более). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:9.

Наиболее пригодные антигены 287 согласно изобретению могут индуцировать
антитела, которые после введения субъекту могут связываться с полипептидом
менингококка, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9.
Предпочтительные антигены 287 для использования в настоящем изобретении могут
25 индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

NadA (адгезин A Neisseria)

Композиция согласно изобретению может включать антиген NadA. NadA включен
в опубликованную последовательность генома штамма менингококка MC58 сероварии
B [79] как ген NMB1994 (номер доступа в GenBank GI:7227256; SEQ ID NO:10 в настоящем
30 документе). На сегодняшний день опубликованы последовательности антигена NadA
из многих штаммов и детально описана активность белка в качестве адгезина Neisseria.
Также были описаны различные иммуногенные фрагменты NadA.

Предпочтительные антигены NadA для использования в настоящем изобретении
содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более
35 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,
98%, 99%, 99,5% или более) SEQ ID NO:10; и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей
мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:10, где n равно или больше 7
(например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или
более). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:10.

Наиболее пригодные антигены NadA согласно изобретению могут индуцировать
антитела, которые после введения субъекту могут связываться с полипептидом
менингококка, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10.
Предпочтительные антигены NadA для использования в настоящем изобретении могут
индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.
45 SEQ ID NO:6 представляет собой один такой фрагмент.

NspA (поверхностный белок A Neisseria)

Композиция согласно изобретению может включать антиген NspA. NspA включен
в опубликованную последовательность генома штамма менингококка MC58 сероварии

В [79] как ген NMB0663 (номер доступа в GenBank GI:7225888; SEQ ID NO:11 в настоящем документе). Ранее антиген был описан в ссылках 82 и 83. На сегодняшний день опубликованы последовательности антигена NspA из многих штаммов. Также были описаны различные иммуногенные фрагменты NspA.

5 Предпочтительные антигены NspA для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более) SEQ ID NO:11; и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:11, где n равно или больше 7
10 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:11.

Наиболее пригодные антигены NspA согласно изобретению могут индуцировать антитела, которые после введения субъекту могут связываться с полипептидом менингококка, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11.

15 Предпочтительные антигены NspA для использования в настоящем изобретении могут индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

HmbR

Композиции согласно изобретению могут включать антиген HmbR менингококка.

Последовательность полноразмерного HmbR включена в опубликованную
20 последовательность генома штамма менингококка MC58 серогруппы B [79] как ген NMB1668 (SEQ ID NO:7 в настоящем документе). В ссылке 84 приведена последовательность HmbR из другого штамма (SEQ ID NO:8 в настоящем документе). SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8 различаются по длине на 1 аминокислоту и идентичны на 94,2%.

25 В изобретении может использоваться полипептид, соответствующий полноразмерной последовательности HmbR, однако часто может использоваться полипептид, соответствующий частичной последовательности HmbR. Таким образом, в некоторых воплощениях последовательность HmbR, используемая согласно изобретению, может включать аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на i%
30 SEQ ID NO:7, где i равно 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 или более. В других воплощениях последовательность HmbR, используемая согласно изобретению, может содержать фрагмент из по меньшей мере j последовательных аминокислот из SEQ ID NO:7, где j равно 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более. В других воплощениях последовательность HmbR, используемая согласно изобретению,
35 может включать аминокислотную последовательность, (i) идентичную по меньшей мере на i% SEQ ID NO:7 и/или (ii) содержащую фрагмент из по меньшей мере j последовательных аминокислот из SEQ ID NO:7.

Предпочтительные фрагменты из j аминокислот содержат эпитоп из SEQ ID NO:7. Такие эпитопы обычно содержат аминокислоты, расположенные на поверхности HmbR.

40 Полезные эпитопы включают эпитопы с аминокислотами, участвующими в связывании HmbR с гемоглобином, поскольку антитела, связывающиеся с этими эпитопами, могут препятствовать связыванию бактерии с гемоглобином хозяина. Топология HmbR и его ключевые функциональные остатки были исследованы в ссылке 85.

Наиболее полезные антигены HmbR согласно изобретению могут индуцировать
45 антитела, которые после введения субъекту могут связываться с полипептидом менингококка, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7. Предпочтительные антигены HmbR для использования в изобретении могут индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

В отличие от ссылки 31, антигены HmbR согласно изобретению обычно не конъюгируют с капсулярным сахаридным антигеном.

NhhA (гомолог hia Neisseria)

Композиция согласно изобретению может включать антиген NhhA. Антиген NhhA включен в опубликованную последовательность генома штамма менингококка MC58 серогруппы B [79] как ген NMB0992 (номер доступа в GenBank GI:7226232; SEQ ID NO: 12 в настоящем документе). На сегодняшний день опубликованы последовательности антигена NhhA из многих штаммов, см., например, ссылки 80 и 86, и также были описаны различные иммуногенные фрагменты NhhA. Он также известен как Hsf.

Предпочтительные антигены NhhA для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:12 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:12, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:12.

Наиболее полезные антигены NhhA согласно изобретению могут индуцировать антитела, которые после введения субъекту могут связываться с полипептидом менингококка, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

Предпочтительные антигены NhhA для использования в изобретении могут индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

App (белок адгезии и проникновения)

Композиция согласно изобретению может включать антиген App. Антиген App включен в опубликованную последовательность генома штамма менингококка MC58 серогруппы B [79] как ген NMB1985 (номер доступа в GenBank GI:7227246; SEQ ID NO: 13 в настоящем документе). На сегодняшний день опубликованы последовательности антигена App из многих штаммов. Также были описаны различные иммуногенные фрагменты App.

Предпочтительные антигены App для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:13 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:13, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:13.

Наиболее полезные антигены App согласно изобретению могут индуцировать антитела, которые после введения субъекту могут связываться с полипептидом менингококка, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13.

Предпочтительные антигены App для использования в изобретении могут индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

Omp85 (белок внешней мембраны 85 кДа)

Композиция согласно изобретению может включать антиген Omp85. Антиген Omp85 включен в опубликованную последовательность генома штамма менингококка MC58 серогруппы B [79] как ген NMB0182 (номер доступа в GenBank GI:7225401; SEQ ID NO: 14 в настоящем документе). На сегодняшний день опубликованы последовательности антигена Omp85 из многих штаммов. Дальнейшую информацию об Omp85 можно получить из ссылок 87 и 88. Также были описаны различные иммуногенные фрагменты Omp85.

Предпочтительные антигены Omp85 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:14 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:14, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:14.

Наиболее полезные антигены Omp85 согласно изобретению могут индуцировать антитела, которые после введения субъекту могут связываться с полипептидом менингококка, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14. Предпочтительные антигены Omp85 для использования в изобретении могут индуцировать бактерицидные антитела против менингококка после введения субъекту.

Альтернативные антигены пневмококка

Вместо CS14 в составе композиции в некоторых воплощениях вакцина включает LOS, содержащий LNaT, для защиты от MenB, но включает белковый антиген против пневмококка. Пептид пневмококка может индуцировать иммунный ответ, эффективный против пневмококка серотипа 14.

Композиция может включать один или более из: (1) антиген spr0057; (2) антиген spr0286; (3) антиген spr0565; (4) антиген spr1098; (5) антиген spr1345; (6) антиген spr1416; (7) антиген spr1418; (8) антиген spr0867; (9) антиген spr1431; (10) антиген spr1739; (11) антиген spr2021; (12) антиген spr0096; (13) антиген spr1433; и/или (14) антиген spr1707.

Композиция может включать один или более из: (1) полипептид PspA; (2) полипептид PsaA; (3) полипептид PspC; (4) полипептид LytA; (5) полипептид PhtA; (6) полипептид PhtA; (7) полипептид PhtA; и/или (8) полипептид PhtD.

Композиция может включать субъединицу фимбрии пневмококка, такую как RrgA, RrgB и/или RrgC.

Полипептидный антиген пневмококка может предпочтительно индуцировать защитные антитела после введения субъекту.

spr0057

Исходная последовательность «spr0057» была приведена в ссылке 89 как «Предшественник бета-N-ацетил-гексозаминидазы» (см. GI:15902101). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr0057 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:18.

Предпочтительные полипептиды spr0057 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:18 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:18, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr0057 включают варианты SEQ ID NO:18. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:18. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:18, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:18. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Один пригодный фрагмент, приведенный в SEQ ID NO:32, не содержит последовательность натурального лидерного пептида и последовательности, распознаваемые сортазой.

spr0286

Исходная последовательность «spr0286» была приведена в ссылке 89 как «Предшественник гиалуронат лиазы» (см. GI:15902330). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr0286 штамма R6 приведена

5 в настоящем документе как SEQ ID NO:19.

Предпочтительные полипептиды spr0286 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:19 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:19, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr0286 включают варианты SEQ ID NO:19. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:19. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:19, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:19. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Один пригодный фрагмент, приведенный в SEQ ID NO:33, не содержит последовательность натурального лидерного пептида и последовательности, распознаваемые сортазой. Другие пригодные фрагменты приведены в SEQ ID NO:34 и 35.

spr0565

Исходная последовательность «spr0565» была приведена в ссылке 89 как «Предшественник бета-галактозидазы» (см. GI:15902609). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr0565 штамма R6 приведена

25 в настоящем документе как SEQ ID NO:20.

Предпочтительные полипептиды spr0565 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:20 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:20, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr0565 включают варианты SEQ ID NO:20 (например, SEQ ID NO:66; см. ниже). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:20. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:20, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:20. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Один пригодный фрагмент, приведенный в SEQ ID NO: 36, не содержит последовательность натурального лидерного пептида и последовательности, распознаваемые сортазой. Другие пригодные фрагменты приведены в SEQ ID NO:37 и 38.

Вариантная форма spr0565 приведена в SEQ ID NO:39 настоящего документа. Использование этой формы для иммунизации описано в ссылке 90 (SEQ ID NO:178 в ней). Пригодные полипептиды spr0565 могут содержать аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:39 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n»

последовательных аминокислот из SEQ ID NO:39, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти полипептиды включают варианты SEQ ID NO:39 (например, SEQ ID NO:66, см. ниже). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:39. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:39, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:39. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Иммуногенные фрагменты SEQ ID NO:39 перечислены в таблице 1 ссылки 90.

Поскольку spr0565 представляет собой естественно длинный полипептид (>2000 аминокислот), экспрессия фрагментов может оказаться более удобной. Так, пригодная форма spr0565 для использования в настоящем изобретении может быть короче 1500 аминокислот (например, <1400, <1300, <1200, <1100 и т.д.). Такие короткие формы spr0565 включают «spr0565A» (SEQ ID NO:37) и «spr0565B» (SEQ ID NO:38).

spr1098

Исходная последовательность «spr1098» была приведена в ссылке 89 как «сортаза» (см. GI:15903141). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr1098 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:21.

Предпочтительные полипептиды spr1098 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:21 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:21, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr1098 включают варианты SEQ ID NO:21. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:21. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:21, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:21. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Один пригодный фрагмент, приведенный в SEQ ID NO:40, не содержит последовательность натурального лидерного пептида.

spr1345

Исходная последовательность «spr1345» была приведена в ссылке 89 как «гипотетический белок» (см. GI:15903388). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr1345 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:22.

Предпочтительные полипептиды spr1345 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:22 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:22, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr1345 включают варианты SEQ ID NO:22. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:22. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25

или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:22, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:22. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Один пригодный фрагмент, приведенный в SEQ ID NO:41, не содержит

5 последовательность натурального лидерного пептида и последовательности, распознаваемые сортазой.

spr1416

Исходная последовательность «spr1416» была приведена в ссылке 89 как «гипотетический белок» (см. GI:15903459). Для удобства ссылок аминокислотная
10 последовательность полноразмерного spr1416 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:23.

Предпочтительные полипептиды spr1416 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:23 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,
15 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:23, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr1416 включают варианты SEQ ID NO:23. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:23. Другие предпочтительные фрагменты
20 не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:23, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:23. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

spr1418

Исходная последовательность «spr1418» была приведена в ссылке 89 как «гипотетический белок» (см. GI:15903461). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr1418 штамма R6 приведена в настоящем
документе как SEQ ID NO:24.

Предпочтительные полипептиды spr1418 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:24 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,
30 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:24, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или
35 более). Эти белки spr1418 включают варианты SEQ ID NO:24. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:24. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,
40 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:24, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:24. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

spr0867

Исходная последовательность «spr0867» была приведена в ссылке 89 как «эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидаза» (см. GI:15902911). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr0867 штамма R6 приведена в настоящем
45 документе как SEQ ID NO:25.

Предпочтительные полипептиды spr0867 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:25 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:25, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr0867 включают варианты SEQ ID NO:25. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:25. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:25, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:25. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Один пригодный фрагмент, приведенный в SEQ ID NO:42, не содержит последовательность натурального лидерного пептида.

spr1431

Исходная последовательность «spr1431» была приведена в ссылке 89 как «1,4-бета-N-ацетилмурамидаза» (см. GI:15903474). Она также известна как «LytC», и ее использование для иммунизации описано в ссылке 104. Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr1431 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:26.

Предпочтительные полипептиды spr1431 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:26 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:26, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr1431 включают варианты SEQ ID NO:26. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:26. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:26, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:26. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Один пригодный фрагмент, приведенный в SEQ ID NO:43, не содержит последовательность натурального лидерного пептида.

spr1739

Полипептид «spr1739» представляет собой пневмолизин (см., например, GI:15903781). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr1739 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:27.

Предпочтительные полипептиды spr1739 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:27 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:27, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr1739 включают варианты SEQ ID NO:27. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:27. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:27, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:27. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Из уровня техники известны мутантные формы пневмолизина, используемые для

вакцинации [29, 91-96], и такие мутантные формы могут использоваться в настоящем изобретении. Детоксификации можно добиться путем укорочения С-конца (см., например, ссылку 97), например, путем делеции 34 аминокислот, 45 аминокислот, 7 аминокислот [98] и т.д. Дальнейшие мутации, пронумерованные согласно SEQ ID NO: 27, включают Pro325→Leu (например, SEQ ID NO:44) и/или Trp433→Phe (например, SEQ ID NO:45). Эти мутации можно комбинировать с укорочением С-конца, например, скомбинировать мутацию Pro325→Leu и укорочение на 7 аминокислот (например, SEQ ID NO:46).

spr2021

Исходная последовательность «spr2021» была приведена в ссылке 89 как «белок общего стресса GSP-781» (см. GI:15904062). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr2021 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:28.

Предпочтительные полипептиды spr2021 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:28 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:28, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr2021 включают варианты SEQ ID NO:28. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:28. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:28, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:28. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Один пригодный фрагмент, приведенный в SEQ ID NO:47, не содержит последовательность натурального лидерного пептида.

В ссылке 90 spr2021 описывается как секретируемый белок массой 45 кДа, гомологичный GpbM, а также раскрывается его использование в качестве иммуногена (SEQ ID NO:243 в ссылке; SP2216). Иммуногенные фрагменты spr2021 приведены в таблице 1 ссылки 90 (стр. 73). Еще один полезный фрагмент spr2021 раскрывается как SEQ ID NO:1 в ссылке 90 (аминокислоты 28-278 SEQ ID NO:28 в ссылке).

spr0096

Исходная последовательность «spr0096» была приведена в ссылке 89 как «гипотетический белок» (см. GI:15902140). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr0096 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:29.

Предпочтительные полипептиды spr0096 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:29 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:29, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr0096 включают варианты SEQ ID NO:29 (например, SEQ ID NO:40; см. ниже). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:29. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:29, но

содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:29. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Вариантная форма spr0096 со вставкой в районе С-конца относительно SEQ ID NO: 29 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:48. Использование этого фрагмента для иммунизации описано в ссылке 90 (SEQ ID NO:150 в ней), где он обозначен как белок, содержащий домен LysM. Таким образом, spr0096 для использования в настоящем изобретении может содержать аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:48 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:48, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти полипептиды включают варианты SEQ ID NO:48. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:48. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:48, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:48. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. Иммуногенные фрагменты SEQ ID NO:48 приведены в таблице 1 ссылки 90.

Полипептид spr0096 может использоваться в форме димера, например, гомодимера. *spr1433*

Исходная последовательность «spr1433» была приведена в ссылке 89 как «гипотетический белок» (см. GI:15903476). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr1433 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:30.

Предпочтительные полипептиды spr1433 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:30 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:30, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr1433 включают варианты SEQ ID NO:30. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:30. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:30, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:30. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

spr1707

Исходная последовательность «spr1707» была приведена в ссылке 89 как «субстрат-связывающий белок ABC транспортера - олигопептидный транспорт» (см. GI:15903749). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr1707 штамма R6 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:31.

Предпочтительные полипептиды spr1707 для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (а) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:31 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:31, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или

более). Эти белки spr1707 включают варианты SEQ ID NO:31 (например, SEQ ID NO: 100; см. ниже). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:31. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:31, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:31. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Вариантная форма spr1707, отличающаяся от spr1707 на 4 аминокислоты, приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:49. Использование SEQ ID NO:49 для иммунизации описано в ссылке 90 (SEQ ID NO:220 в ней). Таким образом, полипептид spr1707 для использования в настоящем изобретении может содержать аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:49 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:49, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти полипептиды включают варианты SEQ ID NO:49. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:49. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:49, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:49. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Иммуногенные фрагменты SEQ ID NO:49 приведены в таблице 1 ссылки 90.

PspA

PspA представляет собой поверхностный белок A. Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного PspA приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:50. В геноме R6 PspA обозначен как spr0121 [89].

Предпочтительные полипептиды PspA для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:50 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:50, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки PspA включают варианты SEQ ID NO:50. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:50. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:50, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:50. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Использование PspA для иммунизации описано, в числе прочих, в ссылке 100. Он может предпочтительно вводиться в комбинации с PspC.

PsaA

PsaA представляет собой поверхностный адгезин пневмококка. Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного PsaA приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:51.

Предпочтительные полипептиды PsaA для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:51 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:51, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки PsaA включают варианты SEQ ID NO:51. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:51. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:51, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:51. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Полезный фрагмент PsaA раскрыт как SEQ ID NO:3 в ссылке 99 (соответствует аминокислотам 21-519 SEQ ID NO:51 в настоящем документе).

Использование PsaA для иммунизации описано в ссылке 101. Он может использоваться в комбинации с PspA и/или PspC.

PspC

PspC представляет собой поверхностный белок С пневмококка [102], и он также известен как холин-связывающий белок А (CbpA). Его использование для иммунизации описано в ссылках 103 и 104. В штамме R6 он называется spr1995, и Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного spr1995 приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:52.

Предпочтительные полипептиды PspC для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:52 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:52, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки spr1995 включают варианты SEQ ID NO:52 (например, SEQ ID NO:27; см. ниже). Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:52. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:52, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:52. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Вариант PspC известен как «Hic». Как показано на фигуре 1 ссылки 105, он сходен с PspC; там же указано, что он связывается с фактором H (fH). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного Hic приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:53. Белок Hic может использоваться в настоящем изобретении в дополнение или вместо полипептида PspC.

Предпочтительные полипептиды Hic для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:53 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:53, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки Hic включают варианты SEQ ID NO:53. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:53. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:53, но содержат по меньшей мере один эпитоп из

SEQ ID NO:53. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

PspC и/или Hic могут предпочтительно использоваться в комбинации с PspA и/или PsaA.

LytA

5 LytA представляет собой N-ацетилмурамоил-L-аланин-амидазу (аутолизин). Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного LytA приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:54. В геноме R6 LytA называется spr1754 [89].

Предпочтительные полипептиды LytA для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:54 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:54, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки LytA включают варианты SEQ ID NO:54. Предпочтительные 15 фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:54. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:54, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:54. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. 20 Использование LytA для иммунизации описано в ссылке 106, в особенности в форме, включающей холин-связывающий домен LytA, слитый с гетерологичным универсальным эпитопом Т-хелперов.

PhtA

PhtA представляет собой белок А гистидиновой триады пневмококка. Для удобства 25 ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного предшественника PhtA приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:55. В геноме R6 PhtA называется spr1061 [89].

Предпочтительные полипептиды PhtA для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:55 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:55, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки PhtA включают варианты SEQ ID NO:55. Предпочтительные 35 фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:55. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:55, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:55. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка. 40 Использование PhtA для иммунизации описано в ссылках 107 и 108.

PhtB

PhtB представляет собой белок В гистидиновой триады пневмококка. Для удобства 45 ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного предшественника PhtB приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:56. Аминокислота Хаа в положении 578 может представлять собой лизин.

Предпочтительные полипептиды PhtB для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:56 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:56, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки PhtB включают варианты SEQ ID NO:56. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:56. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:56, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:56. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Использование PhtB для иммунизации описано в ссылках 107, 108 и 109.

PhtD

PhtD представляет собой белок D гистиридиновой триады пневмококка. Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного предшественника PhtD приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:57. В геноме R6 PhtD называется spr0907 [89].

Предпочтительные полипептиды PhtD для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:57 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:57, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки PhtD включают варианты SEQ ID NO:57. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:57. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:57, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:57. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Использование PhtD для иммунизации описано в ссылках 107, 108 и 110.

PhtE

PhtE представляет собой белок E гистиридиновой триады пневмококка. Для удобства ссылок аминокислотная последовательность полноразмерного предшественника PhtE приведена в настоящем документе как SEQ ID NO:58. В геноме R6 PhtE называется spr0908 [89].

Предпочтительные полипептиды PhtE для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность: (a) идентичную на 50% или более SEQ ID NO:58 (например, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более); и/или (b) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот из SEQ ID NO:58, где n равно или больше 7 (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Эти белки PhtE включают варианты SEQ ID NO:58. Предпочтительные фрагменты (b) содержат эпитоп из SEQ ID NO:58. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:58, но содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO:58. Другие фрагменты не содержат один или более доменов белка.

Использование PhtE для иммунизации описано в ссылках 107 и 108.

Гибридные полипептиды

Если в изобретении используются гибридные антигены пневмококка или

менингококка, они могут присутствовать в составе композиции в виде отдельных индивидуальных полипептидов. Однако, если используется более одного такого антигена, они могут не присутствовать в виде отдельных полипептидов. Вместо этого по меньшей мере два (например, 2, 3, 4, 5 или более) антигена могут экспрессироваться в виде единой полипептидной цепи («гибридный» полипептид), как раскрыто в ссылке 111 для антигенов менингококка. Гибридные полипептиды имеют два больших преимущества: во-первых, если определенный полипептид нестабилен или слабо экспрессируется сам по себе, добавление подходящего партнера по гибриду может решить эти проблемы; во-вторых, использование одной процедуры экспрессии и очистки для получения двух полипептидов, пригодных в качестве антигенов, упрощает процесс коммерческого производства.

Гибридный полипептид может включать две или более последовательностей полипептидов менингококка или пневмококка, как раскрыто выше. Пригодны гибриды, состоящие из аминокислотных последовательностей двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти антигенов. Особенно предпочтительны гибриды, состоящие из аминокислотных последовательностей двух, трех, четырех или пяти антигенов, например двух или трех антигенов.

Гибридные полипептиды могут описываться формулой $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L-}\}_n\text{-B-COOH}$, где X - аминокислотная последовательность альтернативного антигена пневмококка или менингококка, как описано выше; L - необязательная линкерная аминокислотная последовательность; A - необязательная N-концевая аминокислотная последовательность; B - необязательная C-концевая аминокислотная последовательность; n - целое число, равное или больше 2 (например, 2, 3, 4, 5, 6 и т.д.). Обычно n равно 2 или 3.

Если группа -X- включает последовательность лидерного пептида дикого типа, эта последовательность может включаться или не включаться в гибридный белок. В некоторых воплощениях удаляют все лидерные пептиды, кроме включенного в группу -X-, расположенную на N-конце гибридного белка, т.е. сохраняют лидерный пептид X_1 и удаляют лидерные пептиды $X_2 \dots X_n$. Это эквивалентно удалению всех лидерных пептидов и использованию лидерного пептида X_1 в качестве группы -A-.

Для каждого n сочетаний $\{-\text{X-L-}\}$ линкерная аминокислотная последовательность может присутствовать или отсутствовать. Например, при $n=2$ гибрид может описываться формулами $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$ и т.д. Линкерная аминокислотная последовательность (последовательности) -L- обычно короткая (например, 20 или менее аминокислот, т.е. 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают короткие пептидные последовательности, облегчающие клонирование, полиглициновые линкеры (т.е. включающие Gly_n , где $n=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ или более) и гистиридиновые метки (т.е. His_n , где $n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ или более). Специалисту в области техники очевидны другие пригодные линкерные аминокислотные последовательности. Пригодным линкером является GSGGGG (SEQ ID NO:15) или GSGSGGGG (SEQ ID NO:16), где дипептид Gly-Ser образуется из сайта рестрикции BamHI, что облегчает клонирование и манипуляцию, а также тетрапептид $(\text{Gly})_4$, представляющий собой типичный полиглициновый линкер. Другие пригодные линкеры, в особенности для использования в качестве конечного L_n , представляют собой дипептид Leu-Glu или SEQ ID NO:59.

-A- представляет собой необязательную N-концевую аминокислотную

последовательность. Она обычно короткая (например, 40 или меньше аминокислот, т.е. 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают лидерные последовательности для направления трафика белков, или короткие пептидные последовательности, облегчающие клонирование или очистку (например, гистиридиновые метки, т.е. His_n, где n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более). Специалисту в области техники очевидны другие пригодные N-концевые аминокислотные последовательности. Если у X₁ отсутствует свой N-концевой метионин, -А- предпочтительно представляет собой олигопептид (например, состоящий из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот), поставляющий N-концевой метионин, например, Met-Ala-Ser, или единственный остаток Met.

-В- представляет собой необязательную С-концевую последовательность. Она обычно короткая (например, 40 или меньше аминокислот, т.е. 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают последовательности, направляющие белковый трафик, короткие белковые последовательности, облегчающие клонирование или очистку (например, содержащие гистиридиновые метки, т.е. His_n, где n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более, такие как SEQ ID NO:17), или последовательности, улучшающие стабильность белка. Специалисту в области техники очевидны другие пригодные С-концевые аминокислотные последовательности.

В особенности пригодная комбинация полипептидных антигенов менингококка раскрыта в ссылках 111 и 112, и композиция согласно настоящему изобретению может, таким образом, включать 1, 2, 3, 4 или 5 из: (1) белок «NadA»; (2) белок «936»; (3) белок «953»; (4) белок «287» и (5) белок fHBP. Например, композиция может включать: (i) полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4; (ii) второй полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5; и (iii) третий полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6.

Адъювант

Композиции согласно изобретению могут включать иммунологический адъювант. Так, например, они могут включать адъювант, такой как соль алюминия или эмульсию «масло в воде» (например, эмульсию сквалена в воде). Также могут использоваться другие адъюванты.

Пригодные соли алюминия включают гидроксиды (например, оксигидроксиды), фосфаты (например, гидроксифосфаты, ортофосфаты) (см., например, главы 8 и 9 ссылки 113) или их смеси. Соли могут быть в любой пригодной форме (например, гель, кристаллы, аморфное вещество и т.д.), с типичной адсорбцией антигена к соли.

Концентрация Al⁺⁺⁺ в композиции для введения пациенту предпочтительно ниже 5 мг/мл, например, ≤4 мг/мл, ≤3 мг/мл, ≤2 мг/мл, ≤1 мг/мл и т.д. Предпочтительный разброс концентраций составляет 0,3-1 мг/мл. Предпочтительный максимум составляет 0,85 мг на дозу. Предпочтительным адъювантом-солью алюминия для использования с CS14 и антигенами менингококка является фосфат алюминия.

Известны различные адъюванты-эмульсии «масло в воде», обычно включающие по меньшей мере одно масло и по меньшей мере одно поверхностно активное вещество, где масло (масла) и поверхностно активное вещество (вещества) биоразлагаемы (метаболизируемы) и биосовместимы. Капли масла в составе эмульсии предпочтительно меньше 5 мкм в диаметре и могут даже иметь субмикронный диаметр; такие малые размеры достигаются использованием микрофлюидизер для получения стабильных эмульсий. Предпочтительны капли размером менее 220 нм, так как их можно

стерилизовать с помощью фильтрации.

Изобретение может использоваться с маслами, такими как масла животного (например, рыбы) или растительного происхождения. Источники растительных масел включают орехи, семена и зерна. Примеры ореховых масел включают арахисовое
 5 масло, соевое масло, кокосовое масло и оливковое масло, как наиболее распространенные масла. Можно использовать масло жожоба, например, полученное из бобов жожоба. Масла из семян включают сафлоровое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло и т.д. В группе зерновых наиболее распространено кукурузное масло, однако может использоваться масло семян других
 10 злаков, таких как пшеница, овес, рожь, рис, тэфф, тритикале и т.д. Не содержащиеся в маслах из семян 6-10-углеродные эфиры жирных кислот и глицерина или 1,2-пропандиола могут быть получены путем гидролиза, сепарации и этерификации пригодных материалов из масел орехов и семян. В практике настоящего изобретения могут использоваться жиры и масла из молока млекопитающих, поскольку они усвояемы.
 15 Процедуры сепарации, очистки, омыления и другие способы, необходимые для получения чистых масел из животных источников, хорошо известны из уровня техники. Многие рыбы содержат усвояемые масла, которые можно легко утилизировать. Например, в число примеров масел рыб, которые могут использоваться в настоящем изобретении, входят масло печени трески, масло печени акулы и китовый жир, такой как спермацет.
 20 Некоторые масла с разветвленной цепью синтезируют биохимическим путем в 5-углеродных изопреновых единицах; такие масла обычно называют терпеноидами. Масло печени акулы содержит разветвленные ненасыщенные терпеноиды, известные как сквален, 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен, в особенности предпочтительный в настоящем изобретении. Сквалан, насыщенный аналог сквалена,
 25 также является предпочтительным маслом. Масла рыб, включая сквален и сквалан, имеются в продаже или могут быть получены с помощью способов, известных из уровня техники. Другие предпочтительные масла представляют собой токоферолы. Могут использоваться смеси масел.

Если композиция включает токоферол, может использоваться любой из α -, β -, γ -, δ -,
 30 ϵ - или ζ -токоферолов, однако предпочтительны α -токоферолы. Токоферол может принимать несколько форм, например различные соли и/или изомеры. Соли включают органические соли, такие как сукцинат, ацетат, никотинат и т.д. Может использоваться как D- α -токоферол, так и DL- α -токоферол. Предпочтительный токоферол представляет собой DL- α -токоферол, а предпочтительная соль этого токоферола представляет собой
 35 сукцинат.

Поверхностно-активные вещества можно классифицировать по их HLB (гидрофильно-липофильному балансу). Предпочтительные поверхностно-активные вещества согласно изобретению имеют HLB по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 15, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 16. Изобретение может использоваться
 40 с поверхностно-активными веществами, включающими, но не ограничивающимися ими: поверхностно-активные вещества на основе полиоксиэтилен-сорбитановых сложных эфиров (обычно называемых Tween), в особенности полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), продаваемые под торговой маркой DOWFAX™, такие как линейный
 45 блок-сополимер EO/PO; октоксинолы, у которых может варьировать количество повторяющихся (окси-1,2-этандиоловых) групп, среди которых представляет особый интерес октоксинол-9 (Triton X-100, трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как

фосфатидилхолин (лецитин); жирные эфиры полиоксиэтилена, полученные из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известные как поверхностно-активными веществами Brij), такие как триэтиленгликоль монолауроловый эфир (Brij 30); и сорбитановые сложные эфиры (также известные как SPAN), такие как сорбитан триолеат (Span 85) и сорбитан монолаурат.

Предпочтительными поверхностно-активными веществами для включения в эмульсию являются Tween 80 (полиоксиэтилен сорбитан моноолеат), Span 85 (сорбитан триолеат), лецитин и Triton X-100.

Можно использовать смеси поверхностно-активных веществ, например, смеси Tween 80/Span85. Также пригодна комбинация полиоксиэтилен-сорбитанового сложного эфира, такого как полиоксиэтилен сорбитан моноолеата (Tween 80), и октоксинала, такого как трет-октилфеноксиполиэтоксизтанол (Triton X-100). Другая пригодная комбинация включает лаурет-9, а также полиоксиэтилен-сорбитановый сложный эфир и/или октоксинал.

Предпочтительные количества поверхностно-активных веществ (массовые доли) составляют: полиоксиэтилен-сорбитановые сложные эфиры (такие как Tween 80) - 0,01-1%, в особенности примерно 0,1%; октил- или нонилфеноксиполиоксиэтанола (такие как Triton X-100 или другие детергенты из серии Triton) - 0,001-0,1%, в особенности 0,005-0,02%; полиоксиэтиленовые эфиры (такие как лаурет 9) - 0,1-20%, предпочтительно 0,1-10%, и в особенности 0,1-1% или примерно 0,5%.

Конкретные адъюванты-эмульсии «масло в воде», пригодные к использованию в настоящем изобретении, включают, но ими не ограничиваются, следующее:

Субмикронная эмульсия сквалена, Tween 80 и Span 85. Объемные доли в эмульсии могут составлять примерно 5% сквалена, примерно 0,5% полисорбата 80 и примерно 0,5% Span 85. В массовых долях эти соотношения составляют 4,3% сквалена, 0,5% полисорбата 80 и 0,48% Span 85. Этот адъювант известен как «MF59» [114-116] и описан более подробно в главе 10 ссылки 113 и главе 12 ссылки 117. Эмульсия MF59 может включать ионы цитрата, например 10 мМ натрий-цитратного буфера.

Эмульсия сквалена, токоферола и полисорбата 80 (Tween 80). Эмульсия может включать физиологический раствор на фосфатном буфере. Она также может включать Span 85 (например, 1%) и/или лецитин. Такие эмульсии могут содержать от 2 до 10% сквалена, от 2 до 10% токоферола и от 0,3 до 3% Tween 80, где соотношение массы сквалена к массе токоферола предпочтительно ≤ 1 , поскольку в этом случае эмульсия более стабильна. Соотношение объемов сквалена и Tween 80 может составлять примерно 5:2, или их соотношение масс может составлять примерно 11:5. Одну такую эмульсию можно получить, если растворить Tween 80 в PBS до концентрации 2%, далее смешать 90 мл этого раствора со смесью (5 г DL- α -токоферола и 5 мл сквалена) и далее микрофлюидизировать смесь. Полученная эмульсия может содержать субмикронные капельки масла, например, со средним диаметром 100-250 нм, предпочтительно примерно 180 нм. Эмульсия может также включать 3-де-О-ацилированный монофосфорил липид А (3d-MPL). Другая пригодная эмульсия такого типа может содержать, на дозу для человека, 0,5-10 мг сквалена, 0,5-11 мг токоферола и 0,1-4 мг полисорбата 80 [118].

Эмульсия сквалена, токоферола и детергента Triton (например, Triton X-100). Эмульсия может также включать 3d-MPL. Эмульсия может включать фосфатный буфер.

Эмульсия, включающая полисорбат (например, полисорбат 80), детергент Triton (например, Triton X-100) и токоферол (например, α -токоферол сукцинат). Соотношение масс этих трех компонентов в эмульсии может составлять примерно 75:11:10 (например,

750 мкг/мл полисорбата 80, 110 мкг/мл Triton X-100 и 100 мкг/мл α -токоферола сукцината), и эти концентрации должны учитывать вклад этих компонентов из антигенов. Эмульсия также может включать сквален. Эмульсия также может включать 3d-MPL. Водная фаза также может включать фосфатный буфер.

5 Эмульсия сквалана, полисорбата 80 и полоксамера 401 («Pluronic™ L121»). Эмульсия может быть составлена в физиологическом растворе на фосфатном буфере, pH 7,4. Эта эмульсия, пригодная для доставки мурамиловых дипептидов, использовалась вместе с треонил-MDP в составе адъюванта «SAF-1» [119] (0,05-1% Thr-MDP, 5% сквалана, 2,5% Pluronic L121 и 0,2% полисорбата 80). Она также может использоваться без Thr-MDP, как, например в составе адъюванта «AF» [120] (5% сквалана, 1,25% Pluronic L121
10 и 0,2% полисорбата 80). Предпочтительна микрофлюидизация.

Эмульсия, содержащая сквален, водный растворитель, полиоксиэтилен алкилэфирное гидрофильное неионное поверхностно активное вещество (например, полиоксиэтилен (12) цетостеариловый эфир) и гидрофобное неионное поверхностно-активное вещество
15 (например, сложный эфир сорбитана или маннида, такой как сорбитан монолеат или «Span 80»). Эмульсия предпочтительно термообратима и/или содержит по меньшей мере 90% капелек масла (по объему) размером менее 200 нм [121]. Эмульсия может также включать один или более из криопротекторного агента (например, сахара, такого как додецилмальтозид и/или сахароза) и/или алкилполигликозида. Такие эмульсии
20 можно лиофилизировать.

Эмульсия, содержащая 0,5-50% масла, 0,1-10% фосфолипида и 0,05-5% неионного поверхностно-активного вещества. Как описано в ссылке 122, предпочтительные фосфолипидные компоненты представляют собой фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерин,
25 фосфатидная кислота, сфингомиелин и кардиолипин. Предпочтительны субмикронные размеры капель.

Субмикронная эмульсия «масло в воде» неусвояемого масла (такого как легкое минеральное масло) и по меньшей мере одного поверхностно активного вещества (такого как лецитин, Tween 80 или Span 80). Эмульсия может включать добавки, такие
30 как сапонин QuilA, холестерин, сапонин-липофильный конъюгат (такой как GPI-0100, описанный в ссылке 123, получаемый при присоединении алифатического амина к дезацилсапонину через карбоксильную группу глюкуроновой кислоты), диметидиоктадециламмония бромид и/или N,N-диокадецил-N,N-бис(2-гидроксиэтил) пропандиамин.

35 Эмульсия, содержащая минеральное масло, неионный липофильный этоксилированный жирный спирт и неионное гидрофильное поверхностно активное вещество (например, этоксилированный жирный спирт и/или блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена) [124].

Эмульсия, содержащая минеральное масло, неионный липофильный
40 этоксилированный жирный спирт и неионное липофильное поверхностно-активное вещество (например, этоксилированный жирный спирт и/или блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена) [124].

Эмульсия, в которой сапонин (например, QuilA или QS21) и стерин (например, холестерин) ассоциированы в спиралевидные мицеллы [125].

45 Эмульсии «масло в воде» можно использовать в качестве адъювантов сами по себе или в качестве носителей для дальнейших иммуностимулирующих соединений, например иммуностимулирующих олигонуклеотидов, 3d-MPL и т.д.

Фармацевтические композиции

В изобретении представлены фармацевтические композиции для введения пациенту. Такие композиции обычно включают фармацевтически приемлемый носитель. Детальное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей представлено в ссылке 126.

Объемы эффективных доз могут определяться обычными способами, однако для внутримышечной инъекции человеку обычная доза композиции имеет объем примерно 0,5 мл. Такой объем дозы характерен для продукта PREVNAVTM, вакцины RIVM на основе OMV и MeNZBTM. Такие объемы доз типичны для внутримышечных инъекций, однако сходные объемы могут использоваться для других способов введения, например интраназальная вакцина на основе OMV для атомизации может иметь объем примерно 100 мкл или примерно 130 мкл на распыление, когда для введения полной дозы объемом примерно 0,5 мл делается четыре распыления.

pH композиции обычно находится в интервале от 6 до 8, более предпочтительно от 6,5 до 7,5 (например, примерно 7); pH вакцины RIVM на основе OMV равен 7,4 [127], и для композиций согласно настоящему изобретению предпочтителен pH < 7,5. В вакцине RIVM на основе OMV pH поддерживается за счет 10 mM Tris/HCl буфера, и стабильный pH композиций согласно изобретению может поддерживаться с помощью буфера, например Tris-буфера, цитратного буфера, фосфатного буфера или гистидинового буфера. Таким образом, композиции согласно изобретению обычно включают буфер.

Композиция может быть стерильной и/или не содержать пирогенов. Композиции согласно изобретению могут быть изотоническими для человека.

Композиции согласно изобретению для введения пациентам являются иммуногенными и более предпочтительно являются вакцинными композициями. Вакцины согласно изобретению могут быть профилактическими (т.е. для предотвращения инфекции) или терапевтическими (т.е. для лечения инфекции), но обычно они являются профилактическими. Иммуногенные композиции, используемые как вакцины, включают иммунологически эффективное количество антигена (антигенов), а также, по необходимости, любые другие компоненты. Под «иммунологически эффективным количеством» понимается, что введение этого количества субъекту, в одной дозе или как часть серии введений, эффективно для лечения или профилактики. Это количество варьирует в зависимости от здоровья и физического состояния субъекта, подвергающегося лечению, возраста, таксономической принадлежности субъекта, подвергающегося лечению (например, примат-не человек, примат и т.д.), способности иммунной системы субъекта синтезировать антитела, желаемой степени защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других значимых факторов. Ожидается, что количество может находиться в достаточно широком интервале, который определяется в ходе стандартных испытаний. Содержание антигена в композициях согласно изобретению обычно выражается в виде количества белка на дозу. Типичная доза для интраназальных вакцин на основе OMV составляет примерно 0,9 мг белка на мл.

Менингококки и пневмококки поражают различные области тела, и, таким образом, композиции согласно изобретению могут готовиться в виде различных жидких форм. Например, композиции могут готовиться для инъекции, в виде растворов или суспензий. Композиция может готовиться для введения в легкие, например, с помощью ингалятора, в виде мелкодисперсного спрея. Композиция может готовиться для назального, ушного или глазного введения, например, в виде спрея или капель. Обычно используются формы для внутримышечных инъекций.

Композиции согласно изобретению могут включать противомикробный агент, в особенности, если используется упаковка для многократного введения. Вакцины обычно

содержат противомикробные агенты, такие как тиомерсал и 2-феноксиэтанол, однако предпочтительно использовать консервант, не содержащий ртути, или вообще не использовать консерванта.

Композиции согласно изобретению могут содержать детергент, например Tween (полисорбат), такой как Tween 80. Детергенты обычно присутствуют в малых количествах, например <0,01%.

Композиции согласно изобретению могут включать соли натрия (например, хлорид натрия) для тоничности. Типичная концентрация составляет 10 ± 2 мг/мл NaCl, например примерно 9 мг/мл.

10 Способы лечения

В настоящем изобретении также представлен способ индукции иммунного ответа у млекопитающего, содержащий введение млекопитающему композиции согласно изобретению. Иммунный ответ предпочтительно защищает как от менингококков, так и от пневмококков (от по меньшей мере иммунотипа (иммунотипов) менингококка и серотипа (серотипов) пневмококка, включая серотип 14, представленных в композиции) и предпочтительно включает антитела. Этот способ также может вызывать бустерный эффект у пациента, ранее подвергнутого первичному воздействию антигена.

Млекопитающее предпочтительно представляет собой человека. Если вакцина предназначена для профилактического использования, человек предпочтительно представляет собой ребенка (например, ребенок дошкольного возраста или младенец) или подростка; если вакцина предназначена для терапевтического использования, человек предпочтительно представляет собой взрослого. Вакцина, предназначенная для детей, также может вводиться взрослым, например, для оценки ее безопасности, дозировки, иммуногенности и т.д.

В изобретении также представлены композиции для использования в виде лекарственного препарата. Лекарственный препарат предпочтительно используют, как описано выше, для индукции иммунного ответа у млекопитающего (т.е. это иммуногенная композиция) и более предпочтительно, если лекарственный препарат представляет собой вакцину.

В изобретении также представлено использование: (i) LOS менингококка, а также CS14, где LOS и/или CS14 не включает (не включают) тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; (ii) LOS менингококка, а также CS14 без адъюванта, где как LOS, так и CS14 содержат тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; (iii) LOS менингококка и полипептидный антиген пневмококка, где LOS включает тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, а полипептид пневмококка может вызывать иммунный ответ, эффективный в отношении пневмококка серотипа 14; или (iv) полипептид менингококка и CS14, где CS14 содержит тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, а пептид менингококка может вызывать иммунный ответ, эффективный в отношении менингококка серогруппы В, в производстве лекарственного препарата для индукции иммунного ответа у млекопитающего.

Эти применения и способы предпочтительно направлены на профилактику и/или лечение заболевания, вызываемого *N. meningitides* и/или *S. pneumoniae*, например бактериального (или, конкретно, менингококкового и/или пневмококкового) менингита или септицемии.

Один способ проверки эффективности терапии включает отслеживание менингококковой и/или пневмококковой инфекции после введения композиции согласно изобретению. Один способ проверки эффективности профилактики включает отслеживание иммунных ответов после введения композиции. Иммуногенность

композиций согласно изобретению можно определять путем ее введения тестируемым субъектам (например, детям 12-16 месяцев или экспериментальным животным [128]) и последующего определения стандартных параметров, включая уровни бактерицидных антител в сыворотке (SBA) и титров ELISA (GMT) для менингококка. Эти иммунные
 5 ответы обычно анализируют через примерно 4 недели после введения композиции и сравнивают со значениями, полученными до введения композиции. Предпочтительно повышение уровня SBA по меньшей мере в 4 или 8 раз. Если вводится более одной дозы композиции, может проводиться более одного анализа после введения.

Композиции согласно изобретению обычно вводят напрямую пациенту. Прямое
 10 введение обычно осуществляют путем парентеральной инъекции (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно или в интерстициальное пространство ткани) или любым другим удобным способом. Изобретение может использоваться для индукции системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек.

Предпочтительно внутримышечное введение в бедро или в плечо. Инъекция может
 15 осуществляться посредством иглы (например, иглы для подкожного введения), но альтернативно может использоваться безыгольная инъекция. Обычная внутримышечная доза составляет 0,5 мл.

Дозировка может включать одну или несколько доз. Множественные дозы могут использоваться для первичной иммунизации и/или для бустерной иммунизации.

Бустерная иммунизация может следовать за первичной иммунизацией. Подходящую
 20 разницу во времени между первичными введениями (например, 4-16 недель), а также между первичной и бустерной иммунизацией можно определить стандартными способами.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения антигены пневмококка и
 25 менингококка могут вводиться совместно, но отдельно, т.е. два антигена могут предназначаться для одновременного, отдельного или последовательного введения. Обычно эти два антигена смешивают для одновременного комбинированного введения.

Дополнительные антигены

Помимо антигенов менингококка и пневмококка, как описано выше, композиции
 30 могут включать антиген (антигены) против дополнительного патогена (патогенов). Например, композиция может содержать один или более следующих дополнительных антигенов:

- антиген вируса гепатита В, такой как поверхностный антиген HBsAg;
- антиген *Bordetella pertussis*, такой как коклюшный голотоксин (РТ) и филаментозный
- 35 гемагглютинин *B. pertussis*, необязательно также в комбинации с пертактином и/или агглютиногенами 2 и 3;
- дифтерийный антиген, такой как дифтерийный токсид;
- столбнячный антиген, такой как столбнячный токсид;
- сахаридный антиген *Haemophilus influenzae* В (Hib), обычно конъюгированный;
- 40 - антигены инактивированного полиовируса.

Если композиция включает дифтерийный антиген, предпочтительно, если она также
 включает столбнячный антиген и коклюшный антиген. Сходным образом, если композиция включает столбнячный антиген, предпочтительно, если она также включает
 45 дифтерийный и коклюшный антигены. Сходным образом, если композиция включает коклюшный антиген, предпочтительно, если она также включает дифтерийный и столбнячный антигены. Таким образом, предпочтительны комбинации КДС.

Кроме того, композиция может включать дополнительные антигены менингококка или пневмококка.

Помимо антигена CS14, например, композиция может включать капсулярные сахараиды одного или более других серотипов (серотипа) пневмококка. Таким образом, помимо серотипа 14 композиция может включать капсулярный сахараид одного или более следующих серотипов пневмококка: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и/или 33F. Композиция может включать множественные серотипы, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или более серотипов. Из области техники известны 7-валентные, 9-валентные, 10-валентные, 11-валентные и 13-валентные конъюгированные комбинации, а также 23-валентная неконъюгированная комбинация. Например, 10-валентная комбинация может включать сахараиды серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F. 11-Валентная комбинация может далее включать сахараид серотипа 3. В 12-валентной комбинации к 10-валентной смеси могут быть добавлены: серотипы 6A и 19A; 6A и 22F; 19A и 22F; 6A и 15B; 19A и 15B; или 22F и 15B. В 13-валентной комбинации к 11-валентной смеси могут быть добавлены: серотипы 19A и 22F; 8 и 12F; 8 и 15B; 8 и 19A; 8 и 22F; 12F и 15B; 12F и 19A; 12F и 22F; 15B и 19A; 15B и 22F; 6A и 19A и т.д. Пригодная 13-валентная комбинация включает капсулярные сахараиды серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19, 19F и 23F, например, все конъюгированные по отдельности с CRM197, полученные, как описано в ссылках 129, 130 и 131. Одна такая комбинация включает сахараид серотипа 6B в концентрации примерно 8 мкг/мл и другие 12 сахаридов в концентрациях примерно по 4 мкг/мл. Другая такая комбинация включает сахараиды серотипов 6A и 6B в концентрациях примерно по 8 мкг/мл и остальные 11 сахаридов в концентрациях примерно по 4 мкг/мл.

Если композиция включает более одного пневмококкового конъюгата, в каждом конъюгате может использоваться один и тот же белок-носитель или разные белки-носители. В ссылке 132 описаны потенциальные преимущества использования разных белков-носителей в мультивалентных пневмококковых конъюгированных вакцинах.

Если композиция включает сахараидные антигены более одного серотипа, предпочтительно, если их получают и конъюгируют по отдельности, а затем комбинируют.

Помимо менингококкового LOS или полипептидного антигена композиция может включать менингококковый капсулярный сахараид, который обычно конъюгируют с белком-носителем. Композиция согласно изобретению может включать один или более конъюгатов капсулярных сахаридов 1, 2, 3 или 4 серогрупп менингококка A, C, W135 и Y, например, A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, A+W135+Y, A+C+W135+Y и т.д. Идеальны компоненты, включающие сахараиды всех четырех серогрупп A, C, W135 и Y.

Капсулярный сахараид менингококка серогруппы A представляет собой гомополимер, состоящий из N-ацетил-D-маннозамин-1-фосфатов, связанных ($\alpha 1 \rightarrow 6$), с частичным O-ацетилированием в положениях C3 и C4. Ацетилирование в положении C-3 может составлять 70-95%. Условия очистки сахаридов могут приводить к де-O-ацетилированию (например, щелочные условия), но полезно сохранять OAc в положении C-3. В некоторых воплощениях по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) остатков маннозамина в сахарадах серогруппы A O-ацетилированы в положении C-3. Ацетильные группы могут заменяться блокирующими группами для предотвращения гидролиза [133], и такие модифицированные сахараиды по-прежнему считаются сахараидами серогруппы A в контексте настоящего изобретения.

Капсулярный сахараид серогруппы C представляет собой гомополимер сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминная кислота или "NeuNAc"), связанной ($\alpha 2 \rightarrow 9$). Сахаридная

структура записывается как $\rightarrow 9)$ -Neu *p* Nac 7/8 OAc-($\alpha 2 \rightarrow$). Большинство штаммов серогруппы С имеют О-ацетильные группы в положении С-7 и/или С-8 остатков сиаловой кислоты, однако примерно 15% клинических изолятов не содержат этих О-ацетильных групп [134, 135]. Присутствие или отсутствие групп ОАс формирует уникальные эпитопы, и специфичность связывания антитела с сахаридом может влиять на его бактерицидную активность в отношении О-ацетилованных (ОАс+) и де-О-ацетилованных (ОАс-) штаммов [136-138]. Сахариды серогруппы С, используемые в настоящем изобретении, можно получать из штаммов ОАс+ или ОАс-. Утвержденные конъюгированные вакцины против MenС включают сахариды как ОАс- (NEISVAC-С™), так и ОАс+ (MENJUGATE™ и MENINGITEС™). В некоторых воплощениях штаммы для продукции конъюгатов серогруппы С представляют собой штаммы ОАс+, например, серотипа 16, сероподтипа Р1.7а,1 и т.д. Таким образом, могут использоваться штаммы ОАс+ С:16:Р1.7а,1. Также пригодны штаммы ОАс+ сероподтипа Р1.1, такие как штамм С11.

Сахарид серогруппы W135 представляет собой полимер из дисахаридных единиц сиаловой кислоты-галактозы. Как и для сахараида серогруппы С для него характерно переменное О-ацетилирование, но по положениям 7 и 9 сиаловой кислоты [139]. Структура записывается следующим образом: $\rightarrow 4)$ -D-Neu*p*5Ac(7/9OAc)- α -(2 $\rightarrow$ 6)-D-Gal- α (1 $\rightarrow$).

Сахарид серогруппы Y сходен с сахаридом серогруппы W135, за исключением того, что в повторяющуюся дисахаридную единицу входит глюкоза вместо галактозы. Как и для сахараида серогруппы W135, для него характерно переменное О-ацетилирование, по положениям 7 и 9 сиаловой кислоты [139]. Структура сахараида серогруппы Y записывается следующим образом: $\rightarrow 4)$ -D-Neu*p*5Ac(7/9OAc)- α -(2 $\rightarrow$ 6)-D-Glc- α (1 $\rightarrow$).

Сахариды, используемые согласно изобретению, могут быть О-ацетилованы, как описано выше (т.е. иметь такой же паттерн ацетилирования, как и нативные капсулярные сахариды), или они могут быть частично или полностью де-О-ацетилованы по одному или более положению сахаридных колец, или они могут быть гипер-О-ацетилованы относительно нативных капсулярных сахаридов.

Сахаридные группы в конъюгатах могут содержать полноразмерные сахариды, полученные из менингококков, и/или могут включать фрагменты полноразмерных сахаридов, т.е. сахариды могут быть короче нативных капсулярных сахаридов бактерий. Таким образом, сахариды могут быть деполимеризованы, причем деполимеризация может происходить до или после очистки сахаридов, но до конъюгации.

Деполимеризация уменьшает длину цепи сахаридов. Один способ деполимеризации включает использование перекиси водорода. Перекись водорода добавляют к сахариду (например, до конечной концентрации H₂O₂ 1%), и смесь затем инкубируют (например, при примерно 55°C) до достижения желаемой длины цепи. Другой способ деполимеризации включает кислый гидролиз. Из уровня техники известны и другие способы полимеризации. Сахариды, используемые для получения конъюгатов для использования согласно изобретению, могут быть получены с помощью любого из этих способов деполимеризации. Деполимеризацию можно использовать для достижения оптимальной длины цепи для иммуногенности и/или для уменьшения длины цепи для лучшей физической управляемости сахаридов. В некоторых воплощениях сахариды имеют следующий интервал средних степеней полимеризации (Dp): A=10-20; C=12-22; W135=15-25; Y=15-25. В переводе на молекулярный вес, пригодные интервалы равны, для всех серогрупп: <100 кДа; 5 кДа-75 кДа; 7 кДа-50 кДа; 8 кДа-35 кДа; 12 кДа-25 кДа; 15 кДа-22 кДа.

В некоторых воплощениях средний молекулярный вес сахаридов каждой из серогрупп

менингококка А, С, W135 и Y может быть более 50 кДа, например ≥ 75 кДа, ≥ 100 кДа, ≥ 110 кДа, ≥ 120 кДа, ≥ 130 кДа и т.д. [140], и даже до 1500 кДа, в особенности при определении с помощью MALLS. Например: молекулярный вес сахараида MenA может находиться в интервале 50-500 кДа, например 60-80 кДа; молекулярный вес сахараида MenC может находиться в интервале 100-210 кДа; молекулярный вес сахараида MenW135 может находиться в интервале 60-190 кДа, например 120-140 кДа; и/или молекулярный вес сахараида MenY может находиться в интервале 60-190 кДа, например 150-160 кДа.

Масса сахараида менингококка каждой серогруппы в композиции обычно составляет от 1 мкг до 20 мкг, например от 2 до 10 мкг на серогруппу, или примерно 4 мкг, или примерно 5 мкг, или примерно 10 мкг. Если композиция включает конъюгаты более одной серогруппы, их масса может практически не отличаться между серогруппами, например масса сахараида каждой серогруппы может находиться в пределах $\pm 10\%$ друг от друга. В качестве альтернативы равному соотношению может использоваться в 2 раза большая масса сахараида серогруппы А. Таким образом, вакцина может включать сахараид MenA в количестве 10 мкг, а сахараиды MenC, W135 и Y - по 5 мкг.

Выше обсуждаются полезные белки-носители и линкеры различной природы. Полезные носители включают дифтерийный токсин, столбнячный токсин и CRM197.

Могут использоваться конъюгаты с соотношением по массе сахарид:белок от 1:5 (т.е. с избытком белка) до 5:1 (т.е. с избытком сахараида), например с соотношением от 1:2 до 5:1 и с соотношением от 1:1,25 до 1:2,5. Как описано в ссылке 141, конъюгаты различных серогрупп менингококка в смеси могут иметь разные соотношения сахарид:белок, например, один может иметь соотношение от 1:2 до 1:5, а другой - от 5:1 до 1:1,99.

Как описано в ссылке 142, смесь может включать один конъюгат с прямой связью сахараида с белком и другой конъюгат со связью через линкер. Это имеет значение особенно при использовании конъюгатов сахаридов различных серогрупп менингококка, например, сахараиды MenA и MenC можно конъюгировать через линкер, а сахараиды MenW135 и MenY можно конъюгировать с белком-носителем напрямую.

Общие положения

В практике настоящего изобретения используются, если не указано иначе, общепринятые способы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, доступные специалисту в области техники. Такие техники полностью описаны в литературе. См., например, ссылки 143-149 и т.п.

Термин «содержать» охватывает «включать» и «состоять из», т.е. композиция, «содержащая» X, может состоять полностью из X или может включать дополнительные компоненты, например X+Y.

Термин «примерно» относительно числовой величины x необязателен и означает, например, $x \pm 10\%$.

Если в изобретении идет речь об «эпитопе», этот эпитоп может представлять собой В-клеточный эпитоп и/или Т-клеточный эпитоп, но обычно представляет собой В-клеточный эпитоп. Такие эпитопы определяют опытным путем (например, с помощью PERSCAN [150, 151] или подобных способов) или предсказывают (например, с использованием антигенного индекса Джеймсона-Вульфа [152], матричных подходов [153], MARITORE [154], TERITORE [155, 156], нервных сетей [157], OptiMer и EpiMer [158, 159], ADEPT [160], Tsites [161], гидрофильности [162], антигенного индекса [163], или способов, раскрытых в ссылках 164-186 и т.д.). Эпитопами называются части антигена, которые распознаются и связываются с антиген-связывающими сайтами Т-клеточных рецепторов, они также могут называться «антигенными детерминантами».

Если в изобретении используется «очищенный» антиген, этот антиген отделен от его естественной среды. Например, антиген практически не будет содержать других компонентов менингококка, кроме любых других очищенных антигенов, которые также присутствуют. Смесь очищенных антигенов обычно получают путем очистки каждого антигена по отдельности и дальнейшего их комбинирования, даже если два антигена естественно присутствуют в смеси.

Ссылки на процент идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями означают процент одинаковых аминокислот в этих последовательностях при их выравнивании. Это выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей можно определить с помощью программного обеспечения, известного из уровня техники, например описанного в разделе 7.7.18 ссылки 169. Предпочтительное выравнивание определяют с помощью алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана, с использованием аффинного поиска делеций, штрафа за открытие делеции, равного 12, и штрафа за продолжение делеции, равного 2, матрицы BLOSUM62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана раскрыт в ссылке 170.

Термин «практически» не исключает «полностью», например, композиция, «практически не содержащая» Y, может быть полностью свободной от Y. При необходимости, термин «практически» в определении изобретения может опускаться.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фигуре 1 представлены коровые сахараиды иммунотипа L3.

На фигуре 2 представлена повторяющаяся структура CS14 из ссылки 55.

На фигуре 3 представлены титры антител против LNnT у групп животных. Сходным образом, на фигуре 4 представлены титры IgG против CP14. На обеих фигурах представлены величины GMT, выраженные в относительных единицах люминесценции на мл.

СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Мышей иммунизировали (i) вакциной PREVNAR™ по 0,4 мкг на дозу; (ii) везикулами внешней мембраны, полученными из штамма дикого типа MC58 менингококка серогруппы B по 10 мкг на дозу, в сочетании с PREVNAR™; или (iii) везикулами внешней мембраны, полученными из штамма дикого типа MC58 менингококка серогруппы B с нокаутом Δ lgtB по 10 мкг на дозу, в сочетании с PREVNAR™. Все композиции составляли с добавлением гидроксида алюминия в качестве адъюванта.

Сыворотки анализировали с помощью теста Lumindex на антитела против, в числе других, капсулярного сахараида пневмококка серотипа 14 и эпитопа LNnT.

На фигуре 3 представлены ответы на LNnT для трех групп на 34 день после иммунизации на 2 и 21 день. Вакцина PREVNAR™ сама по себе вызывала ответ против LNnT примерно в два раза выше пустого контроля (0,2 против 0,12). Добавление OMV, содержащих LOS, приводило к усилению ответа (0,7), но для OMV LgtB^{-ve} усиление было не так ярко выражено (0,5). Усиление в группе (iii) относительно группы (ii) может объясняться возможным адъювантным эффектом OMV (ср. с ссылкой 51).

На фигуре 4 приведены ответы против CS14 на 34 день. Оба препарата OMV усиливали ответ на CS14; предпочтительно наблюдали большее усиление при использовании OMV LgtB^{-ve}.

Несмотря на то, что приведенные данные неполные и не вполне убедительные и на то, что тест против LNnT давал только слабый сигнал, данные показывают, что CS14 и OMV LgtB^{-ve} можно комбинировать для получения лучших результатов, чем

комбинирование CS14 и OMV дикого типа.

Следует понимать, что настоящее изобретение описано исключительно с помощью примеров и что могут использоваться его модификации без изменения сущности и объема изобретения.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] van den Dobbelsteen *et al.* (2007) *Vaccine* 25:2491-6.
- 5 [2] Ram *et al.* (2003) *J Biol Chem* 278:50853-62.
- [3] WO2004/014417.
- [4] WO96/10086.
- [5] US-5705161.
- [6] WO2005/107798.
- 10 [7] US 6,531,131.
- [8] WO98/53851
- [9] US-6531131
- [10] WO00/26384.
- [11] US-6645503
- [12] WO03/070282.
- 15 [13] WO94/08021
- [14] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002)
- [15] EP-A-0372501.
- [16] EP-A-0378881.
- [17] EP-A-0427347.
- 20 [18] WO93/17712
- [19] WO94/03208.
- [20] WO98/58668.
- [21] EP-A-0471177.
- [22] WO91/01146
- 25 [23] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [24] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
- [25] EP-A-0594610.
- [26] Ruan *et al.* (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
- [27] WO00/56360.
- 30 [28] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [29] Michon *et al.* (1998) *Vaccine*. 16:1732-41.
- [30] WO02/091998.
- [31] WO01/72337
- [32] WO00/61761.
- [33] WO00/33882
- 35 [34] WO02/09643.
- [35] Katial *et al.* (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
- [36] US patent 6,180,111.
- [37] WO01/34642.
- [38] WO2004/019977.
- 40 [39] European patent 0011243.
- [40] Fredriksen *et al.* (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
- [41] WO01/91788.
- [42] WO2005/004908.
- [43] Maiden *et al.* (1998) *PNAS USA* 95:3140-3145.
- 45 [44] WO98/56901.
- [45] WO2006/081259.

- [46] Claassen *et al.* (1996) 14(10):1001-8.
 [47] WO2004/015099.
 [48] WO01/52885.
 5 [49] WO00/25811.
 [50] WO01/09350.
 [51] WO02/09746.
 [52] WO02/062378.
 [53] WO2007/144316.
 10 [54] WO2007/144317.
 [55] Wessels & Kasper (1989) *J Exp Med* 169:2121-31.
 [56] WO2007/116028.
 [57] *Mol. Immunol.*, 1985, **22**, 907-919
 [58] EP-A-0208375
 15 [59] Bethell G.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 2572-4
 [60] Hearn M.T.W., *J. Chromatogr.*, 1981, **218**, 509-18
 [61] WO00/10599
 [62] Gevert *et al.*, *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
 [63] US patent 4,057,685.
 20 [64] US patents 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
 [65] US patent 4,459,286.
 [66] US patent 5,204,098
 [67] US patent 4,965,338
 [68] US patent 4,663,160.
 25 [69] WO2007/000343.
 [70] Jodar *et al.* (2003) *Vaccine* 21:3265-72.
 [71] Massignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
 [72] Welsch *et al.* (2004) *J Immunol* 172:5605-15.
 [73] Hou *et al.* (2005) *J Infect Dis* 192(4):580-90.
 30 [74] WO03/063766.
 [75] Fletcher *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100.
 [76] Zhu *et al.* (2005) *Infect Immun* 73(10):6838-45.
 [77] Cantini *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281:7220-7227
 [78] WO2004/048404
 35 [79] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
 [80] WO00/66741.
 [81] WO99/57280
 [82] Martin *et al.* (1997) *J Exp Med* 185(7):1173-83.
 [83] WO96/29412.
 40 [84] US-5,698,438.
 [85] Perkins-Balding *et al.* (2003) *Microbiology* 149:3423-35.
 [86] WO01/55182.
 [87] WO01/38350.
 [88] WO00/23595.
 45 [89] Hoskins *et al.* (2001) *J.Bacteriol.* 183:5709-5717.
 [90] WO2004/092209.
 [91] Kirkham *et al.* (2006) *Infect Immun.* 74(1):586-93.

- [92] WO2005/108580.
- [93] Berry *et al.* (1999) *Infect Immun* 67(2):981-5.
- [94] US-6716432.
- 5 [95] WO90/06951.
- [96] WO99/03884.
- [97] Baba *et al.* (2002) *Infect Immun* 70: 107-113.
- [98] US-7217791
- [99] WO2008/061953.
- 10 [100] Briles *et al.* (2000) *J Infect Dis* 182:1694-1701.
- [101] Talkington *et al.* (1996) *Microb Pathog.* 21(1):17-22.
- [102] WO99/53940.
- [103] WO02/22168.
- [104] WO02/22167.
- [105] WO02/08426.
- 15 [106] WO2003/104272.
- [107] WO00/37105.
- [108] Adamou *et al.* (2001) *Infect Immun.* 69(2):949-58.
- [109] Ogunniyi *et al.* (2007) *Infect Immun.* 75(1):350-7.
- [110] WO98/18930.
- 20 [111] Giuliani *et al.* (2006) *PNAS USA* 103:10834-9.
- [112] WO2004/032958.
- [113] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [114] WO90/14837.
- [115] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [116] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- 25 [117] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [118] WO2008/043774.
- [119] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [120] Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- 30 [121] US-2007/0014805.
- [122] WO95/11700.
- [123] US patent 6,080,725.
- [124] WO2006/113373.
- [125] WO2005/097181.
- 35 [126] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [127] RIVM report 000012 003.
- [128] WO01/30390.
- [129] US-2007/0231340.
- [130] US-2007/0184072.
- [131] US-2006/0228380.
- 40 [132] WO2007/071707
- [133] WO03/080678.
- [134] Glode *et al.* (1979) *J Infect Dis* 139:52-56
- [135] WO94/05325; US patent 5,425,946.
- [136] Arakere & Frasch (1991) *Infect. Immun.* 59:4349-4356.
- 45 [137] Michon *et al.* (2000) *Dev. Biol.* 103:151-160.

- [138] Rubinstein & Stein (1998) *J. Immunol.* 141:4357–4362.
- [139] WO2005/033148
- [140] WO2007/000314.
- 5 [141] WO2007/000341.
- [142] WO2007/000342.
- [143] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [144] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [145] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 10 [146] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [147] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).
- [148] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press)
- 15 [149] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [150] Geysen *et al.* (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [151] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
- [152] Jameson, BA *et al.* 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- 20 [153] Raddrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
- [154] Bublil *et al.* (2007) *Proteins* 68(1):294-304.
- [155] De Lalla *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [156] Kwok *et al.* (2001) *Trends Immunol* 22:583-88.
- [157] Brusic *et al.* (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30
- [158] Meister *et al.* (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
- 25 [159] Roberts *et al.* (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
- [160] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
- [161] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
- [162] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
- [163] Welling *et al.* (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
- 30 [164] Davenport *et al.* (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
- [165] Tsurui & Takahashi (2007) *J Pharmacol Sci.* 105(4):299-316.
- [166] Tong *et al.* (2007) *Brief Bioinform.* 8(2):96-108.
- [167] Schirle *et al.* (2001) *J Immunol Methods.* 257(1-2):1-16.
- [168] Chen *et al.* (2007) *Amino Acids* 33(3):423-8.
- 35 [169] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30
- [170] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

Формула изобретения

1. Адъювантная иммуногенная композиция, содержащая липоолигосахарид менингококка (LOS) и капсулярный сахарид пневмококка серотипа 14 (CS14), где CS14
40 содержит тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, а LOS не содержит тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc.
2. Композиция по п. 1, где LOS получен из штамма менингококка, не содержащего ферментативной активности LgtB.
3. Композиция по п. 1, где LOS получен из штамма менингококка, не содержащего ферментативной активности GalE.
- 45 4. Композиция по п. 1, где LOS получен из штамма менингококка, не содержащего ферментативной активности LgtA и/или LgtE.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где LOS содержит трисахарид 4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc и не содержит тетрасахарид Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc.

6. Композиция по п. 1, где LOS присутствует в везикулах внешней мембраны менингококка.

5 7. Композиция по п. 6, где LOS конъюгирован с белками везикул.

8. Композиция по п. 6 или 7, где везикулы получены из менингококка с повышенной экспрессией TbrA.

9. Композиция по любому из пп. 1-4, где LOS конъюгирован с белком-носителем.

10 10. Композиция по п. 9, где конъюгация может осуществляться через липид А в составе LOS или через остаток KDO.

11. Композиция по п. 1, где CS14 конъюгирован с белком-носителем.

12. Композиция по п. 11, где белок-носитель представляет собой CRM197, столбнячный токсин, дифтерийный токсин или белок D H. influenzae.

15 13. Композиция по п. 1, дополнительно включающая соль алюминия в качестве адъюванта.

14. Композиция по п. 13, где соль алюминия представляет собой фосфат алюминия.

15. Способ индукции иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение композиции по любому из пп. 1-14 млекопитающему.

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 (fHBP)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEV
 DGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDD
 AGGKLTYYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSA
 EVKTVNGIRHIGLAQKQ

SEQ ID NO: 2 (fHBP)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEV
 DGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDA
 GGKLTYYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSAT
 VKIGIEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 3 (fHBP)

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDIPQNGTLTSLAQAQGAEKTFKAGDKDNLNTGKLKNDKISRDFVQK
 IEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSS
 DDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAG
 SATVKIGIEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 4

MASPDVKSADTLSPAAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSQAQGGQDMAAVSEENTGNGGAAATDKPKNEDEGAQ
 NDMPQNAADTDSLTPNHTPASNMMPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMAANTADGMQGGDPSAGGENAGNTAAQGTNQA
 ENNQTAGSQNPASSTNPSATNSGGDFGRTNVGNSSVIDGPSQNTLTHCKGDCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSDAD
 KISNYKKDGKNDGKNDKFLVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPSTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDG
 EAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLTGYAEKLPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPSPSRGRFAA
 KVDGFGSKSVGDIIDSGDGLHMGTKFKAIDGNGFKGTWTENGDDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGFGFV
 FAGKKEQDGGSGGGGATYKVDEYHANARFAIDHFNSTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHFT
 DHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFGKKLVSVDGNLTMHGKTAPVKLKAKEFNQYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDR
 TKWGVLDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID NO: 5

MVSAVIGSAAVGAKSADVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGVDRLHLLLGQVATEGEK
 QFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATRARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQ
 AQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQ
 AEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQF
 RIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHA
 VISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAQKQ

SEQ ID NO: 6 (Nada fragment)

ATNDDDVKKAAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNEN
 KQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDK
 HAAAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAACKVTD
 IKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEXSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETR
 QGLAEQAALSGLFQPYNVG

SEQ ID NO: 7 (HmbR)

MKPLQMLPIAALVGSIFGNPVLAADEAATETTPVKAEIKAVRVKGQRNAPAAVERVNLNRIKQEMIRDNDLVRYST
 DVGLSDSGRHQKGFVARGVEGNRVGVSIDGVNLPDSEENSLYARYGNFNSSRLSIDPELVRNIEIVKGADSFNTGSG
 ALGGGVNYQTLQGRDLLDDRRQFGVMMKNGYSTRNREWTNTLGFGVSNDRVDAALLYQRRGHETESAGNRGYAVEG
 EGSANIRGSARGIPDSSKHYNHHALGKIAYQINDNHRIGASLNGQQGHNYTVEESYNLTASSWREADDVNRNRNA
 NLFYEWMPDSNWLSSLKADFDYQKTKVAVNNKGSFPMDYSTWTRNYNQDLDEIYNRSMDFRKRFTLRLDLHPLQ
 LGGGRHRLSFKTFVSRDFENLNRDDYFSGRVVRTSSIQHPVKTTNYGFSLSDDQIQWNVFSSRAGIRYDHTKMT
 PQELNAECHACDKTPPAANTYKGSFGVGLAQLNQAWRVGYDITSGYRVPNASEVYFTYNHSGSNWLPNPNLKAER
 STHTLSLQGRSEKGMLDANLYQSNYRNFLSEEQKLTTSGTPGCTEENAYYGICSDPYKEKLDWQMKNIDKARIRGI
 ELTGRLNVDKVASFVPEGWKLFGSLGYAKSKLSGDNLSLLSTQPLKVIAGIDYESPSEKGVFSRLTYLGAKVKVDAQ
 YTVYENKVGWGTPLQKKVKDYPWLNKSAYVFDMYGFYKPAKNLTLRAGVYNLFNRKYTTWDSLRGLYSYSTTNAVDRD
 GKGLDRYRAPGRNYAVSLEWKF

SEQ ID NO: 8 (HmbR)

MKPLQMLPIAALVGSIFGNPVFAADEAATETTPVKAIEVKAVRVKQQRNAPAAVERVNLNRIKQEMIRDNDLVRYST
 DVGLSDSGRHQKGFVARGVEGNRVGVSIDGVNLPDSEENSLYARYGNFNSSRLSIDPELVRNIDIVKGADSFNTGSG
 ALGGGVNYQTLQGRDLLLPERQFGVMMKNGYSTRNREWTNTLGFVGSNDRVDAALLYSQRRGHETESAGKRGYPVEG
 AGSGANIRGSARGIPDPSQHKYNHHLGKIAYQINDNHRIGASLNGOQGHNYTVEESYNLLASYWREADDVNRNRNT
 NLFYEWTPESDRLSMVKADVDYQKTKVSAVNYKGSFPIEDSSTLTRNYNQKDLDEIYNRSMDFRKRITLRLDSHPL
 QLGGGRHRLSEKTFASRRDFENLNRDDYYFSGRVVRTTSSIQHPVKTTNYGFSLSDDQIQWNDVFSSRAGIRYDHTKM
 TPQELNAECHACDKTPPAANTYKGWSGFVGLAAQLNQAWRVGYDITSGYRVPNASEVYFTYNHSGSNWLPNPNLKAE
 RTTHTLTLQGRSEKGTLDANLYQSNYRNLSEEQKLTTSGDVSTQMNYYYGMCNPNPYSEKLEWQMNDKARIRG
 IELTGRNLVDKVASFVPEGWKLFGSLGYAKSKLSGDNLSLSTQPLKVIAGIDYESPSEKGWVFSRLTYLGAKKVKDA
 QYTVYENKGWGTPLQKKVKDYPWLNKSAYVFDMYGFYKPVKNLTLAGVYNVFNRYTTWDSLRGLYSYSTNSVDR
 DGKGLDRYRAPSRNYAVSLEWKF

SEQ ID NO: 9 (287)

MFKRSVIAMACIFALSACGGGGGGSPDVKSADTLKSPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGGQAPSAQGSQDMAAVSE
 ENTGNGGAVTADNPKNEDVAQNNDMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMAAADGMQ
 GDDPSAGGQONAGNTAAQGANQAGNNQAAGSSDPIPASNPAPANGGSNFRVLDLANGVLIDGPSQNTLTHCKGSDCS
 GNNFLDEEVQLKSEFEKLSADAKISNYKKDKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIIFYKPKPTSFAFRRSARSRRSLP
 AEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNRYRLTYGAELPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGAAVYNGEVL
 HFHTENGRPYPTRGRFAAKVDFGSKSVDDGIIDSGDDLHMGTOQKFKAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEV
 AGKYSYRPTDAEKGFGVFAGKKEQD

SEQ ID NO: 10 (NadA)

MSMKHFPSKVLTTAILATFCGALAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAGETIYDIGEDGTITQKDATAAD
 VEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETINALNKLGENITT
 FAETTKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAETAAG
 KAEAAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQAALSLGLFQPYNV
 GRFNVTAAVGGYKSESAAVIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAHYHGVNYEW

SEQ ID NO: 11 (NspA)

MKKALATLIALALPAAALAEASGFYVQADAAHAKASSSLGSAKGFSPRISAGYRINDLRFVADYTRYKNYKAPSTD
 FKLYSIGASAIYDFDTQSPVKPYLGLARLSLNRASVDLGGSDSFSQTSIGLGLVTGVSAYVTPNVDLADAGRYNYIGK
 VNTVKNVRSGELSAGVRVKF

SEQ ID NO: 12 (NhhA)

MNKIYRIIWNALNAWVVSELTRNHTKRASATVKTAVLATLLFATVQASANNEEQEEDLYLDPVQRTVAVLIVNSD
 KEGTGEKEKVEENSDWAVYFNEKGVLTAAREITLKAGDNLKIKNQNGTNFTYSLKDDLTDLTSVGTEKLSFSANGNKVN
 ITSDTKGLNFAKETAGTNGDTTVHLNGIGSTLTDLTLLNTGATTNVTNDNVTDDEKKRAASVKDVLNAGWNKGVKPG
 TTASDNVDFVRTYDTEFLSADTKTTTVNVESKDNKGKTEVKIGAKTSVIKEKDGLVTGKDKGENGSSTDEGEGLV
 TAKEVIDAVNKAGWRMKTTTTANGQTGQADKFETVTSGTNVTFASGKGTATVSKDDQGNITVMYDVNVGDALNVNQL
 QNSGWNLDKAVAGSSGKVISGNVSPSKGMDVTNINAGNNIEITRNGKNIDIATSMTPQFSSVSLGAGADAPTLS
 VDGDALNVGSKKDNKPVRIITNVAPGVKEGDVTNVAQLKGVAQNLLNNRIDNVGDNARAGIAQAIATAGLVQAYLPKGS
 MMAIGGGTYRGEAGYAIGYSSISDGGNWIIGKTASGNSRGHFGASASVGYQW

SEQ ID NO: 13 (App)

MKTTDKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYQYYRDFAEKNGKFVAVGAKDIEVYNKK
 GELVGKSMTKAPMIDFSVVSRRNGVAALVGDQYIVSAHNGGYNNVDFGAEGRNPDQHRFTYKIVKRNRYKAGTKGHP
 YGGDYHMPRLHKEFVTDAEPVEMTSYMDGRKYIDQNNYSDPRVIGAGRQYWRSEDEPNNRESSYHIASAYSWLVGGN
 TFAQNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGFLLPTGGSFSGDPMFTYDAQKQKWLINGVLQTNPNYIGKSNQFQVLRKDFW
 YDEIFAGDTHSVFYEPRQNGKYSFNDDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYHAAGGVNSY
 RPRLNNGENISFIDEKGKELILTSNINQAGGLYFQGDFTVSPENNETWQAGVHISEDSTVTWKVNGVANDRLSKI
 GKGTLHVQAKGENQGSISVGDGTVILDQOADDKGGKQAFSEIGLVSGRGTVQLNADNQFNPDKLYFGFRGGRDLNLG
 HSLSFHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTITGNKDIAATTGNNSLDSKKEIAYNGWFGKEDTTKTNGRLNLVYQPA
 EDRTLLLSGGTNLNGNITQTNGKLFFSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIWDNDWINRTFKAENFQIKGGQAV
 VSRNVAKVKGDWHLNHAQAVFGVAPHQSHTICTRSDWTGLTNCVEKITITDDKVIASLTKTDISGNVDLADHAHLNL
 TGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGNTSASGNASFNLSDHAVQNGSLTSLGNAKA
 NVSHSALNGNVSLADKAVFHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDEWTLPSGTTELGNLNLNLDNATITLNSAYRHDAAGAQ
 TGSATDAPRRRSRRSRLSLSVTPPTSVESRFNTLTVNGKINGQCTFRFMSELEFGYRSDKLKLAESSEGYTLAVNN

TGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLFNLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGFRHLNPNVKEQELSDKLGAFAKQAEK
DNAQSLDALIAAGRAVEKTESVAEPARQAGGENVGIMQAEKKRVQADKDTALAKQREAE TRPATTAFFRARRAR
RDLPLQLQPQPQPQQRDLISRYANGLSEFSATLNSVFAVQDELDRVFAEDRRNAVWTS GIRD TKHYRSQDFRAYRQ
QTDLRQIGMQKNLGSGRVGLFSHNRTENTFDDGIGNSARLAHGA VFGQY GIDRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGK
IRRVLHYGIQARYRAGFGGFGIEPHIGATRYFVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQHISITPY
LSLSYTDAAASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAAAAGKPQLEAQHSAGIKLGYRW

SEQ ID NO: 14 (Omp85)

MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTPESTVFNYLPVKVGDYNDTHGSAIIKS LYATGFFDDVRVE
TADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQSQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLN IQITPKV
TKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIEFEGNQVYS DRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRSNQFNEQKFAQDMEKVTDFYQN
NGYDFRILDTDIQTNEDKTKQTIKITVHEGGREFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYERQQMTAVLGEI
QNRMGSA GAYSEISVQPLPNAETKTVD FVLHIEPGRKIYVNEIHITGN NKTRDEVVRREL RQMESAPYDTSKLQRS
KERVELLGYFDNVQF DAVPLAGTPDKVDL NMSLTERSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLF GTGKSAALRASR
SKTTLNGLSLSFTDPYFTADGVSLGYDVYGKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVN
TYNKAPKHYADFIKKYKGT DGT DGSFKGWLYKGT VGWGRNKTD SALWPTRGYLTGVNAEIALPGSKLQYYSATHNQ
WFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGR TK EIPFFENFYGGGLGSVRGYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAEL
LFPMPGA KDARTVRLSLFADAGSVWDGKTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPM
KFSYAYPLKKKPEDEIQR FQFQLGTTF

SEQ ID NO: 15

GSGGGG

SEQ ID NO: 16

GSGSGGGG

SEQ ID NO: 17

HHHHHH

SEQ ID NO: 18

MKHEKQQRFSIRKYAVGAASVLIGFAFQAQTVAADGVTPTTTENQPTIHTVSDSPQSSSENRTETPKAELOPEAPKT
VETETPATDKVASLPKTEEKQEEVSSTPSDKAEVVTPTSAEKETANKKEEEASPKKEEAK EVD SKESNTDKTDKDK
PAKKDEAKAEADKPETETGKERAATVNEKLAKKIVSIDAGRKYFSPEQLKEIIDKAKHYGYTDLHLLVGNDGLREM
LDDMSITANGKTYASDDVKRAIEKGTNDYNDPNGNH LTESQMTDLIN YAKDKGIGLIPTVNSPGHMDAILNAMKEL
GIQNP NFSYFGKKSARTVDLDNEQAVAF TKALIDKYAAYFAK KTEIFNIGLDEYANDATDAKGWSVLQADKYYPNEG
YPVKGYEKFIAYANDLARI VKSHGLKPMAFNDGIYNSDTSFGSFDKDIIVSMWTGGWGGYDVASSKLLAEKGHQIL
NTNDAWCYVLGRNADQGWNLDQGLNGIKNTPTTSVPKTEGADIPIIGGMVAAWADTPSARYSPSHLFKLMRHFAN
ANAEYFAADYESAEQALNEVPKDLNRYTAESVAAVKEAEKAIRSLDSNLSRAQQD TIDQAI AKLOETVNNLTLTPEA
QKEEEAKREVEKLAKNKVISIDAGRKYFTLDQLKRIVDKASELGYS DVHLLLGNDGLRFLNDMTITANGKTYASDD
VKKAIIEGT KAYYDDPNGTALTQAEVTELIEYAKSKDIGLIPAINSPGHMDAMLVAMEKLG IKNPQAHFDKVS KTTM
DLKNEAMNFKALIGKYMDF FAGTKIFNFGTDEYANDATSAQGWYYLKWYQLYGKFAEYANTLAAMAKERGLQPM
AFNDGFYYEDKDDVQFDKDVLSYWSKGWWGYNLASPOYLASKGYKFLNTNGDWYYVIGNHKQDEAYPLSKAVENSG
KVPFNQLASTKYPEVDLPTVGSMLS IWADRP SAEYKEEIEFELMTAFADHNKDYFRANYNALREELAKIPTNLEGYS
KESLEALDAAKTALNYNLNRNKQAE LDTLVANLKAALQGLKPAATHSGSLDENEVAANVETRPELITRTEEIPFEVI
KKENPNLPAGQENIITAGVKGERTHYISVLTENGKTTETVLD SQVTKEVINQVVEVGSPVTHKGDESGLAPTTEVKP
RLDIQEEETPTT VTRENPLLLKGKTQVITKGVNGHRSNFYSVSTSADGKEVKT LVNSVVAQEAVTQIVEVGT MVTH
VGDENGQAAIAEEKPKLEIPSQAPSTAPAEESKALPQDPAPVVTEKKLPETGTHDSAE LVVAGLMSTLAAYGLTKR
KED

SEQ ID NO: 19

MILQYVYVSVYMQTKTKKLIVSLSSLVLSGFLNHYMTVGAEETTTNTIQQSQKEVQYQQRDTKNLVENGDFGQTED
GSSPWTGSKAQGWSAWVDQKNSSADASTRVIEAKDGATISSPEKLRAAVHRMVPIEAKKKYKLRFKIKTDNKVGIA
KVRIIEESGKDKRLWNSATTSGTKDWQTI EADYSPTLDVDKIKLELFYETGTGTVSFKDIELVEADQPS EDSQTDK
QLEEKIDLPIGKKHVFSLADYTYKVENPDVASVKN GILEPLKEGTTNVIVSKDGKEVKKIPLKILASVKD TYTDRLD
DWNIGIAGNQYYDSKNEQMAKLNQELEGKVADSLSSISSQADRIYLWEKFSNYKTSANLTATYRKLEEMAKQVTNPS
SRYQDET VVRTVRDSMEWMHKHVYNSEKSI VGNWWDYEIGTPRAINNTLSLMKEYFSDEEIKKYTDVIEKFVPDPE
HFRKTTDNPFKALGGNLVDMGRVKVIAGLLRKDDQEISSTIRSIEQVFKLVDQEGGFYQDGSYIDHTNVAYTGAYGN
VLIDGLSOLLPV IQTKNPIDKDKMQTMYHWIDKSFAPLLVNGELMDMSRGRSISRANSEGHVAAEVLRGIHRIAD

MSEGETKQRLQSLVKTIVQSDSYDVFKNLKTYKDISLMQSLSDAGVASVPRTSYLSAFNKMDKTAMYNAEKGFGF
GLSLFSSRTLNYEHMNKENKRGWYTS DGMFYLNGDL SHYSDGYWPTVNPYKMPGTTETDAKRADSDTGKVLPSAFV
GTSKLDANATATMDFTNWNQTLTAHKSWMFLKDKIAFLGSNIQNTSTDTAATTIDQRKLESSNPYKVYVNDKEASL
TEQEKDYPETQSVFLESSDSKKNIGYFFFKSSISMSKALQKGAWKDINEGQSDKEVENEFLLTISQAHKQNGDSYGY
MLIPNVDRATFNQMIKELESSLIENNETLQSVYDAKQGVWGVVYDDSVSTISNQFQVLKRGVYTIKKEGDEYKIAY
YNPETQESAPDQEVFKKLEQAAQPVQNSKEKEKSEEEKNHSDQKNLPQTGEGQSLASLGFLLLGAFYLFRRGKNN

SEQ ID NO: 20

MGKGHWNRKRVSIRKFAVGACSVMITGCAVLLGNGIAGESVYYADETLITHAEKPKEEKMIVEEKADKALETKNV
VERTEQSEPSSTEAIASEKKEDEAVTPKEEKVSAPPEEKAPRIESQASSQEKPLKEDAKAVTNEEVNQMIENRKVDF
NQNWYFKLNANSKEAIKPDADVSTWKKLDLPYDWSIFNDFDHESPAQNEGGQLNGGEAWYRKTFKLDEKDLKKNVRL
TFDGVYMSQVYVNGQLVGHYPNGYNQFSYDITKYLYKDGRENVIHAVNKPSSRWYSGSGIYRDVTLQVTDKVVH
VEKNGTTILTPKLEEQQHGKVETHVTSKIVNTDDKHDLVAEYQIVERGGHAVTGLVRTASRTLKAHESTSLDAILE
VERPKLWTVLNDKPALYELITRVYRDGQLVDAKKDLFGYRYHWTPEGFSLNGERIKFHGVSLLHHDHGAEGAEENY
KAEYRRLKQMKEMGVNSIRTTNHPASEQTLQIAAELGLLVQEEAFDTWYGGKKPYDYGRFFEKDATHPARKGEKWS
DFDLRTMVERGKNNPAIFMWSIGNEIGEANGDAHSLATVKRLVKVIKDVDTTRYVTMGADKFRFGNGSGGHEKIADE
LDAVGFNYSIEDNYKALRAKHPKWLIIYGETSSATRTGSSYRPERELKHSNGPERNYEQSDYGNDRVWGKTATASW
TFDRDNAGYAGQFIWTGTDYIGEPTPWHNQNTPVKSSYFGIVDTAGIPKHDFLYQSQWVSVKKKPMVHLLPHWNW
ENKELASKVADSEGKIPVRAYSNASSVELFLNGKSLGLKTFNKKQTS DGRTYQEGANANELYLEWKVAYQPGTLEAI
ARDESGKEIARDKITTAGKPAAVRLIKEDHAIADGKDLTYIYYEIVDSQGNVPTANNLVRFLQHGQQLVGVNDG
EQASRERYKAQADGWSIRKAFNGKGVAVIKSTEQAGKFTLTAHSDLLKSNQVTVFTGKKEGQEKTVLGTEVPKVQTI
IGEAPEMPTTVPFVYSDGSRAPERVTVSLVDVSKPGIVTVKGMADGREVEARVEVIALKSELPPVKRIAPNTNLNSV
DKSVSYVLTDGVSQVEYEVDKWEIAEEDKAKLAIPGSRQATGYLEGQPIHATLVVEEGNPAAPVPTVTVGGEAVTG
LTSRQPMQYRTLSYGAQLPEVTASAENADVTVLQASAANGMRASIFIQPKDGGPLQTYAIIQFLEEAPKIAHLSLQVE
KADSLKEDQTVKLSVRAHYQDGTQAVLPADKVTFTSSEGEVVAIRKGMLELHKPGAVTLNAEYEGAKQVELTIQAN
TEKKIAQSIRPVNVVTDLHQEPSLPATVTVEYDKGFPKTHKVTWQAIPEKCLDSYQIFEVLGKVEGIDLEARAKVSV
EGIVSVEEVSVTTPIAEAPQLPESVRTYDSNGHVSSAKVAWDAIRPEQYAKEGVFTVNGRLEGTQLTTKLHVRVSAQ
TEQGANIISDQWTGSELPLAFASDSNPSPVSNVNDKLISYNNQPANRWTNWNRSNPEASVGVLFSDGSLSKRSVDN
LSVGFHEDHGVGAPKSYVIEYYVGKTVPTAPKNPSFVGNEDHVFNDSANWKPVTNLKAPAQLKAGEMNHFSFDKVE
YAIRIRMVKADNKRGT SITEVQIFAKQVAAKQGGQTRI QVDGKDLANFNPDLDYYLESVDGKVPVAVTANVSNGLA
TVVPSVREGEFVRVIAKAENG DILGEYRLHFTKDKNLLSHKPVAAVKQARLLQVGQALELPTKVPVYFTGKDG YETK
DLTVEWEEVPAENLTAKAGQFTVRGRVLGSNLVAEVTVRVTDKLGETLSDNPNYDENS NQAFASATNDIDKNSHDRV
YLNDDGHSNRRWTNWSPTPSSNPEVSAGVIFRENGKIVERTVAQAKLHFFADSGTDAPSKLV LERYVGPFGFEVPTY
YSNYQAYESGHFPNNPENWEAVPYRADKDIAAGDEINVTFAVKAKVMRWRMERKADKSGVAMIEMTFLAPSEL PQE
STQSKILVDGKELADFAENRQDYQITYKGQRPKVSVEENNQVASTVVDSDGEDSLPVLVRLVSESGKQVKEYRIQLTK
EKPVS AVQEDLPKLEFVEKDLAYKTVEKKDSTLYLGETRVEQEGKVGERIFTVINPDGSKEEKLREVVEVPTDRIV
LVGTPVQAQEAKKPVSEKADTKPIDSS EADQTNKAQLPNTGSAASQAAVAAGLALLGLSAGLVVTKGKKED

SEQ ID NO: 21

MSQKNNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKLEENQDTEGNDFDSDVKAI
SSEAVLTSQWDAQKLPIVIGGIAIPELEMNLPFIKGLDNVNLFYGAGTMKREQVMGEGNYS LASHHIFGVDNANKMLF
SPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYEIREVKRVT PDRVDEVDDRGVNEITLVTCEDLAATERIIVKGDLKETKDYSQT
SDEILTAFNQPYKQFY

SEQ ID NO: 22

MVPKTATSTETKITRIIHYVDKVTNQNVEDVVPVTL SRTKTENKVTGCVVTYGEWTTGNWDEVISGKIDKYKDPD
IPTVESQEVTS DSSDKBITVRYDRLSTPEKPI PQPNPEHPSVPTPNPELPNQETPTPDKPTPEPGTPKTETPVNPDP
EVPTYETGKREELPNTGTEANATLASAGIMTLLAGLGLGFFKKKEDEK

SEQ ID NO: 23

MEKDMNLKREQEFVSQYHFDARNFEWENENGAPETKVDVNFQLLQHDQENQVTSLIVILSFMIVFDKFVISGTISQV
NHIDGRIVNEPNELNQEEVETLARPCLNMLNRLTYEVTEIALDLPGINLEF

SEQ ID NO: 24

MKKNLSLYIISSLFFACVLFFVYATATNFQNSTSARQVKTEYTNVTNVPIDIRYNSDKYFISGFASEVSVVLTGANR
LSLASEMQESTRKFKVTADLT DAGVGTIEVPLSIEDLPNGLTAVATPQKITVKIGKKAQKDKVKIVPEIDPSQIDSR
VQIENVMVSDKEVSITSQDETLDRIDKIIAVLPTSERITGNYSGSVPLQAIDRNGVVLPAVITPFDTIMKVTTPKPA
PSSSTNSSTSSSSETSSSTKATSSKTN

SEQ ID NO: 25

MNLGEFWYNKINKNRGRRLMKKVRFI FLALLFFLASPEGAMASDGTWQKGQYLKEDGSQAANEWVFDTHYQSWFYIK
 ADANYAENEWLKQGGDYFYLKSGGYMAKSEWVEDKGAFYYLDQDGKMKRNAWVGTSYVGATGAKVIEDWVYDSQYDA
 WFYIKADGQHAKEWLQIKGKDYFKSGGYLLTSQWINQAYVNASGAKVQQGWLFDKQYQSWFYIKENGNADKEWI
 FENGHYIYLLKSGGYMAANEWIWDKESWFLKFDGKIAEKWVYDSHSQAWYYFKSGGYMAANEWIWDKESWFLKFD
 GKMAEKWVYDSHSQAWYYFKSGGYMTANEWIWDKESWFLKSDGKIAEKWVYDSHSQAWYYFKSGGYMTANEWIW
 DKESWFLKSDGKMAEKWVYDSHSQAWYYFKSGGYMAKNETVDGYQLGSDGKWLGGKATNKNAAYYQVVPVTANVY
 DSDGEKLSYISQGSVWLDKDRKSDDKRLAITISGLSGYMKTEDLQALDASKDFIPYYESDGHREFYHYVAQNASIPV
 ASHLSMEVGGKYYSDAGLHFDGFKLENPFLFKDLTEATNYSAEELDKVFSLLNINNSLLENKGATFKEAEHHYHIN
 ALYLLAHSALSNWGRSKIADKKNFFGITAYDTTPYLSAKTFDDVDKGILGATKWIKENYIDRGRTFLGNKASGMN
 VEYASDPYWGKIASVMMKINEKLGGKD

SEQ ID NO: 26

MSVTFFIGEERLKIKIGLASICLLGLATSHVAANETEVAKTSQDTTASSSSSEQNQSSNKTQTSAEVQTNAAYWDG
 DYYVKDDGSKAQSEWIFDNYYKAWFYINSDGRYSQNEWHGNYYLKSGGYMAQNEWIYDSNYKSWFLKSDGAYAHQE
 WQLIGNKWWYFKKGYMAKSQWQGSYFLNGQGAMIQNEWLYDPAYSAYFYLKSDGTANQEWQKVGKWWYFKKGY
 MARNEWQGNYYLTGSGAMATDEVIMDGARYIFAASGELKEKKDLNVGWVHRDGKRYFFNNREEQVQTEHAKKIIDIS
 EHNGRINDWKKVIDENKVDGVIIVRLGYSKGEDKELAHNIKELNRLGIPYGVYLYTYAENETDAENDAKQTIELIKKY
 NMNLSYPIYYDVENWEYVNVKSKRAPSDTDWVKIINKYMDTMKQAGYQNVYVYSYRSLLOTRLKHPDILKHVNWVAA
 YTNALEWENPYYSGEKGWQYTSSEYMKGIQGRVDVSVWY

SEQ ID NO: 27

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLV
 VDETLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYQGVNNVPARMQYEKIT
 AHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPGDVFQDVTVEDLKQRGISAE
 RPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVD
 MVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSLFRDNVATFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWDELSYD
 HQKKEVLTPKAWDRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPVLRKRTISIWGTTLYP
 QVEDKVEND

SEQ ID NO: 28

MKKKILASLLSTVMVSQVAVLTTAHAETDDDKIAAQDNKISNLTAQQQEAQKQVDQIQEQVSAIQAEQSNLQAEND
 RLQAESKKLEGEITELSKNIVSRNQSLEKQARSQNTGAVTSYINTIVNSKSITEAISRVAAMSEIVSANNKMLEQQ
 KADKKAISEKQVANNDAINTVIANQQKLADDAQALTTQAEKAAELSLAAEKATAEGEKASLLEQKAAAEAEARAA
 AVAEAAAYKEKRASQQQSVLASANTNLTAQVQAVSESAAAPVRKVRPTYSTNASSYPIGECTWGVKTLAPWAGDYWG
 NGAQWATSAAAAGFRTGSTPQVGAIACWNDGGYGHVAVVTAVESTTRIQVSESNYAGNRTIGNHRGWFNPTTTSEGF
 VTYIYAD

SEQ ID NO: 29

MKSITKKIKATLAGVAALFAVFAPSFVSAQESSTYTVKEGDTLSEIAETHNTTVEKLAENNHIDNIHLIYVDQELVI
 DGPVAPVATPAPATYAAPAAQDETVSAPVAETPVVSETVSVSTVSGSEAEAKEWIAQKESGGSYTATNGRYIGRYGSW
 TAAKNFWLNGWY

SEQ ID NO: 30

MTYLDAFKSGTLVLPSALLLHFKEFLPSSDDFLVWQFFYLQNTTGLEEMSPSQIAERIGKEISDVNQSISNLTERGL
 LQYRTIELNGEIELLEDASLALERLDDLFGAVHSSSDQLTSQNQLKDLVETFQQELGRLLTPFEIEDLTKTLKEDGT
 SADLIKEALREAVLNGKPNWKYIQAILRNWRHEGIKVAQIEAKRAEREASNPQLTQVSADFRNAMDLWKD

SEQ ID NO: 31

MKKNRVFATAGLVLLAAGVLAACSSSKSSDSSAPKAYGYVYTADPETLDYLSRKNSTTVVTSNGIDGLFTNDNYGN
 LAPAVAEDWEVSKDGLTYTYKIRKGVKWFTSDGEEYAEVTAKDFVNLKHAADKKSEAMYLAENSVKGLADYLSGTS
 TDFSTVGKAVDDYTLQYTLNQPEPFWNSKLTYSIFWPLNEEFETSKGSDFAKPTDPTSLLYNGPFLLKGLTAKSSV
 EFVKNEQYWDKENVHLDITNLAYYDGSQESLERNFTSGAYSARLYPTSSNYSKVAEEYKDNIIYTTQSGSGIAGLG
 VNIDRQSYNYTSKTTDSEKVAATKALLNKDFRQALNFALDRSAYSQAINGKDGAAALAVRNLFVKPDFVSAGEKTFGD
 LVAAQLPAYGDEWKGVNLADGQDGLFNADKAKAEFAKAKKALEADGVQFPPIHLDVVPVDQASKNYISRIQSFKQSVET
 VLGVENVVVDIQQMTSDEFLNITYAANASSEDWDVSGGVSWSGPDYQDPSTYLDILKTTSETTKTYLGFDPNPNPS
 VVQVGLKEYDKLVDEAAKETSIDLNVRYEKYAAAQAWLTDSSLFIPAMASSGAAPVLSRIVPFTGASAQTGSKGSDVY
 FKYLKLQDKAVTKEEYEKAREKWLKEAESNEKAQKELASHVK

SEQ ID NO: 32

ADGVTPTTTTENQPTIHTVSDSPQSENRTETPKAELQPEAPKTVETETPATDKVASLPKTEEKPOEEVSSTPSDKA
 EVVTPTSAAKETANKKEEEASPKKEEAKEVDSKESNTDKTDKDKPAKKDEAKAEADKPETETGKERAATVNEKLAKK
 KIVSIDAGRKYFSPEQLKEIIDKAKHYGYTDLHLLVGNDGLRFLMDMSITANGKTYASDDVKRAIEKGTNDYNDP
 NGNHLTESQMTDLINYAKDKGIGLIPVNSPGHMDAILNAMKELGIQNPNSYFGKKSARTVDLDNEQAVAFATKALI
 DKYAAFYFAKKEIFNIGLDEYANDATDAKGWSVLQADKYYPNEGYPVKGYEKFIAANDLARIKSHGLKPMFANDG
 IYYNSDTSFGSFDKDIIVSMWTGGWGGYDVASSKLLAEKGHQLINTNDAWCYVLGRNADGQGWYNLDQGLNGIKNTP
 ITSVPKTEGADIPIIGGMVAAWADTPSARYSPSHLFKLMRHFANANAAYFAADYESAEQALNEVPKDLNRYTAESVA
 AVKEAEKAIRSLDSNLSRAQQDTIDQAIKLOETVNNLTLPPEAQKEEEAKREVEKLAKNKVISIDAGRKYFTLDQL
 KRIVDKASELGYSDVHLLLGNDGLRFLNDMTITANGKTYASDDVKKAIIEGKAYYDDPNGTALTQAEVTELEIYA
 KSKDIGLIPAINSPGHMDAMLVAMEKLGIKNPQAHFDKVSKTMDLKNEEAMNFVKALIGKYMDFAGKTKIFNFGT
 DEYANDATSAQGWYLYKQYLYGKFAEYANTLAAMAKERGLQPMFANDGFYEDKDDVQFDKDVLSYWSKGWGWYN
 LASPQYLASKGYKFLNTNGDWYVIGNHKQDEAYPLSKAVENSGKVPFNQLASTKYPEVDLPTVGSMLSIWADRPSA
 EYKEEIEFELMTAFADHNKDYFRANYNALREELAKIPTNLEGYSKESLEALDAAKTALNYNLRNKAELDTLVANL
 KAALQGLKPAATHSGSLDENEVAANVETREPELITRTEEIPFEVIKKENPNLPAGQENIITAGVKGERTHYISVLTEN
 GKTETVLDSSQVTKEVINQVVEVGSPTHKGDESLAPTTEVVKPRLDIQEEEIPFTTVTRENPLLLKGKTQVITKGV
 NGRHSNFYSVSTSADGKEVKTLVNSVVAQEAVTQIVEVGTMTVTHVGDENGQAIAEKKPKLEIPSQPAPSTAPAEES
 KALPQDPAPVVTEKK

SEQ ID NO: 33

GAEETTTNTIQQSQKEVQYQQRDTKNLVENGDFGQTEDGSSPWTGSKAQGWSAWVDQKNSSADASTRVIEAKDGAIT
 ISSPEKLRAAVHRMVPPIEAKKKYKLRFKIKTDNKVGIKAVRIIEESGKDKRLWNSATTSGTKDWQTI EADYSPTLDV
 DKIKLELFYETGTGTVSFKDIELVEVADQPSQSDTKQLEEKIDLPIGKKHVFSLADYTYKVENPDVASVKNIGILE
 PLKEGTTNVIIVSKDGKEVKKIPKILASVKDITYDRLDDWNGIIAGNQYYDSKNEQMAKLNQELEGKVADSLSSISS
 QADRIYLWEKFSNYKTSANLTATYRKLEEMAKQVTNPSSRYQDET VVRTVRDSMEWMHKKHVYNSEKSI VGNWWDYE
 IGTPRAINNTLSLMKEYFSDEEIKKYTDVIEKFVPDPEHFRKTTDNPFKALGGNLVDMGRVKVIAGLLRKDDQEISS
 TIRSIEQVFKLVQDQEGFYQDGSYIDHTNVAYTGAYGNVLIDGLSOLLPVIOKTKNPIDKDKMQTMYHWIDKSFAPL
 LVNGELMDMSRGRSISRANSEGHVAAVEVLRGHRIADMSEGETKQRLQSLVKTIVQSDSYDVFKNLKTYKDISLM
 QSLSDAGVASVPRTSYLSAFNMKDKTAMYNAEKGFGLSLFSSRTLNYEHMNKENKRGWYTS DGMFYLYNGDL SH
 YSDGYWPTVNPYKMPGTTTETDAKRADSDTGKVLPSAFVGT SKLDDANATATMDFTNWNQTLTAHKSWMFLKDKIAFL
 GSNIQNTSTD TAATTIDQRKLESSNPYKVYVNDKEASLTEQEKDYPETQSVFLESSDSKKNIGYFFFKSSISMSKA
 LQKGAWKDINEGQSDKEVENEFLTISQAHKQNGDSYGYMLIPNVDRATFNQMIKELESSLIENNETLQSVYDAKQGV
 WGI VKYDDSVSTISNQFQVLKRGVYTIRKEGDEYKIAAYNPETQESAPDQEVFKKLEQAAQPVQVQNSKEKEKSEEEK
 NHSDQKN

SEQ ID NO: 34

GAEETTTNTIQQSQKEVQYQQRDTKNLVENGDFGQTEDGSSPWTGSKAQGWSAWVDQKNSSADASTRVIEAKDGAIT
 ISSPEKLRAAVHRMVPPIEAKKKYKLRFKIKTDNKVGIKAVRIIEESGKDKRLWNSATTSGTKDWQTI EADYSPTLDV
 DKIKLELFYETGTGTVSFKDIELVEVADQPSQSDTKQLEEKIDLPIGKKHVFSLADYTYKVENPDVASVKNIGILE
 PLKEGTTNVIIVSKDGKEVKKIPKILASVKDITYDRLDDWNGIIAGNQYYDSKNEQMAKLNQELEGKVADSLSSISS
 QADRIYLWEKFSNYKTSANLTATYRKLEEMAKQVTNPSSRYQDET VVRTVRDSMEWMHKKHVYNSEKSI VGNWWDYE
 IGTPRAINNTLSLMKEYFSDEEIKKYTDVIEKFVPDPEHFRKTTDNPFKALGGNLVDMGRVKVIAGLLRKDDQEISS
 TIRSIEQVFKLVQDQEGFYQDGSYIDHTNVAYTGAYGNVLIDGLSOLLPVIOKTKNPIDKDKMQTMYHWIDKSFAPL
 LVNGELMDMSRGRSISRANSEGHVAAVEVLRGHRIADMSEGETKQRLQSLVKTIVQSDSYDVFKNLKTYKDISLM
 QSLSDAGVASV

SEQ ID NO: 35

ANSEGHVAAVEVLRGHRIADMSEGETKQRLQSLVKTIVQSDSYDVFKNLKTYKDISLMQSLSDAGVASVPRTSY
 LSAFNMKDKTAMYNAEKGFGLSLFSSRTLNYEHMNKENKRGWYTS DGMFYLYNGDL SHYSDGYWPTVNPYKMPGT
 TETDAKRADSDTGKVLPSAFVGT SKLDDANATATMDFTNWNQTLTAHKSWMFLKDKIAFLGSGNIQNTSTD TAATTID
 QRKLESSNPYKVYVNDKEASLTEQEKDYPETQSVFLESSDSKKNIGYFFFKSSISMSKALQKGAWKDINEGQSDKE
 VENEFLTISQAHKQNGDSYGYMLIPNVDRATFNQMIKELESSLIENNETLQSVYDAKQGVWGI VKYDDSVSTISNQF
 QVLKRGVYTIRKEGDEYKIAAYNPETQESAPDQEVFKKLEQAAQPVQVQNSKEKEKSEEEKNHSDQKN

SEQ ID NO: 36

DET LITHTAEKPKEEKMIVEEKADKALETKNVVERTEQSEPSSTEAIASEKKEDAEVTPKEEKVSAPKEEKAPRIES
 QASSQEKPLKEDAKAVTNEEVNQMIENRKVDNFQNWYFKLNANSKEAIKPDADVSTWKKLDLPYDWSIFNDFDHESP
 AQNEGQQLNGGEAWYRKTFKLDEKDLKKNVRLTFDGVYMDSQVYVNGQLVGHYPNGYNQFSYDITKYLYKDGRENVI
 AVHAVNKQPSSRWYSGSGIYRDVTLQVTDKVHVEKNGTTLTPKLEEQQHGVETHVTSKIVNTDDKDHVLA EYQI

VERGGHAVTGLVRTASRTLKAHESTSLDAILEVERPKLWTVLNDKPALYELITRVYRDGQLVDAKKDLFGYRYHHWT
 PNEGFSLNGERIKFHGVSLLHHDHGALGAEENYKAEYRRLKQMKEMGVNSIRTTNHPASEQTLQIAAELGLLVQEEAF
 DTWYGGKKPYDYGRFFEKDATHPARKGEKWSDFDLRTMVERGKNNPAIFMWSIGNEIGEANGDAHSLATVKRLVKV
 IKDVKTRYVTMGADKFRFGNGSGGHEKIADELDAVGFNYSYEDNYKALRAKHPKWLIIYGSETSSATRTGRSYYRPER
 ELKHSNGPERNYEQSDYGNDRVWGKTATASWTFDRDNAGYAGQFIWTGTDIYIGEPTPWHNNQNTPVKSSYFGIVDT
 AGIPKHDFYLYQSQWVSVKKKPMVHLLPHWNWENKELASKVADSEGKIPVRAYSNASSVELFLNGKSLGLKTFNKKQ
 TSDGRITYQEGANANELYLEWKVAYQPGTLEAIARDESSEKGIARDKITTAGKPAAVRLIKEDHAIADGKDLTYIYYE
 IVDSQGNVPTANNLVRFLHGGQQLVGVNDGEQASRERYKAQADGSWIRKAFNGKGVAVIKSTEQAGKFTLTAHSD
 LLKSNQVTVFTGKKEGQEKTVLGTVEVPKVQTIIGEAPEMPTTVPFVYSDGSRAERPVTWSLVDVSKPGIVTVKGMAD
 GREVEARVEVIALKSELPPVKRIAPNTNLNSVDKSVSYVLTGDSVQEYEVDKWEIAEEDKAKLAIPGSRIQATGYLE
 GQPIHATLVVEEGNPAAPVVPVTVTVGGEAVTGLTSRQPMQYRTLSYGAQLPEVTASAENADVTVLQASAANGMRASI
 FIQPKDGGPLQTYAIQFLEEAPKIAHLSLQVEKADSLKEDQTVKLSVRAHYQDGTQAVLPADKVTFTSTSGEGEVAIR
 KGMLELHKPGAVTLNAEYEGAKQVELTIQANTEKKIAQSIRPVNVVTDLHQEPSPATVTVVEYDKGFPKTHKVTWQ
 AIPKEKLDYSYQIFEVLGKVEGIDLEARAKVSVEGIVSVEEVSVTTPIAEAPQLPESVRTYDSNGHVSSAKVAWDAIR
 PEQYAKEGVFTVNGRLEGTQLTTKLHVRVSAQTEQGANISDQWTGSELPLAFASDSNPSDPVSNVNDKLISYNNQPA
 NRWTNWNRSNPEASVGVLFSDGILSKRSVDNLVSGFHEDHGVGAPKSYVIEYYVGKTVPTAPKNPSFVGNEDHVEN
 DSANWKPVTNLKAPQLKAGEMNHFSFDKVETAYAIRIRMVKADNKRGTSTITEVQIFAKQVAAKQGGQTRIQVQDGKDL
 ANFNPDLDYYLESVDGKVPVAVTANVSNNGLATVVPVSVREGEPPVRVIAKAENGDIILGEYRLHFTKDKNLLSHKPVA
 VKQARLLQVGQALELPTKVPVYFTGKDGYESKDLTVEWEEVPAENLTAKAGQFTVRGRVLGSLNVAEVTVRVTDKLG
 TLDNPNYDENSNOAFASATNDIDKNSHDRVLDYLDGHDHSENRRWTNWSPTSSNPEVSAGVIFRENGKIVERTVAQ
 AKLHFFADSGTDAPSKLVRLERYVGPGEVPTYYSNYQAYESGHPFNPNPENWEAVPYRADKDIAAGDEINVTFFKAVKA
 KVMRWRMERKADKSGVAMIEMTFLAPSELPESTQSKILVDGKELADFAENRQDYQITYKGQRPKVSVEENNQVAST
 VVDSGEDSLPVLVRLVSESGKQVKEYRIQLTKEKPVSAVQEDLPKLEFVEKDLAYKTVEKKDSTLYLGETRVEQEGK
 VGKERIFTVINPDGSKEEKLREVVEVPTDRIVLVGTKPVAQEAKKPQVSEKADTKPIDSSEADQTNKAQ

SEQ ID NO: 37

DETLITHTAEKPKEEKMIVEEKADKALETKNVVERTEQSEPSSTEAIASEKKEDEAVTPKEEKVSAPKEEKAPRIES
 QASSQEKPLKEDAKAVTNEEVNQMIENRKVDNFQNWYFKLNANSKEAIKPDADVSTWKKDLDPYDWSIFNDFHESP
 AQNEGGQLNGGEAWYRKTFKLDEKDLKKNVRLTFDGVYMDSQVYVNGQLVGHYPNGYNQFSYDITKYLYKDGRENVI
 AVHAVNKQPSRWYSGSGIYRDVTLQVTDKVHVEKNGTTILTPKLEEQQHGKVETHVTSKIVNTDDKDHELVAEYQI
 VERGGHAVTGLVRTASRTLKAHESTSLDAILEVERPKLWTVLNDKPALYELITRVYRDGQLVDAKKDLFGYRYHHWT
 PNEGFSLNGERIKFHGVSLLHHDHGALGAEENYKAEYRRLKQMKEMGVNSIRTTNHPASEQTLQIAAELGLLVQEEAF
 DTWYGGKKPYDYGRFFEKDATHPARKGEKWSDFDLRTMVERGKNNPAIFMWSIGNEIGEANGDAHSLATVKRLVKV
 IKDVKTRYVTMGADKFRFGNGSGGHEKIADELDAVGFNYSYEDNYKALRAKHPKWLIIYGSETSSATRTGRSYYRPER
 ELKHSNGPERNYEQSDYGNDRVWGKTATASWTFDRDNAGYAGQFIWTGTDIYIGEPTPWHNNQNTPVKSSYFGIVDT
 AGIPKHDFYLYQSQWVSVKKKPMVHLLPHWNWENKELASKVADSEGKIPVRAYSNASSVELFLNGKSLGLKTFNKKQ
 TSDGRITYQEGANANELYLEWKVAYQPGTLEAIARDESSEKGIARDKITTAGKPAAVRLIKEDHAIADGKDLTYIYYE
 IVDSQGNVPTANNLVRFLHGGQQLVGVNDGEQASRERYKAQADGSWIRKAFNGKGVAVIKSTEQAGKFTLTAHSD
 LLKSNQVTVFTGKKEGQEKTVLGTVEVPKVQTIIGEAPEMPTTVPFVYSDGSRAERPVTWSLVDVSKPGIVTVKGMAD
 GREVEARVEVIALKSELPPVKRIAPNTNLNSVDKSVSYVLTGDSVQEYEVDKWEIAEEDKAK

SEQ ID NO: 38

IAEEDKAKLAIPGSRIQATGYLEGQPIHATLVVEEGNPAAPVVPVTVTVGGEAVTGLTSRQPMQYRTLSYGAQLPEVT
 ASAENADVTVLQASAANGMRASIFIQPKDGGPLQTYAIQFLEEAPKIAHLSLQVEKADSLKEDQTVKLSVRAHYQDG
 TQAVLPADKVTFTSTSGEGEVAIRKGMLELHKPGAVTLNAEYEGAKQVELTIQANTEKKIAQSIRPVNVVTDLHQEP
 SLPATVTVVEYDKGFPKTHKVTWQAIPKEKLDYSYQIFEVLGKVEGIDLEARAKVSVEGIVSVEEVSVTTPIAEAPQLP
 ESVRTYDSNGHVSSAKVAWDAIRPEQYAKEGVFTVNGRLEGTQLTTKLHVRVSAQTEQGANISDQWTGSELPLAFAS
 DSNPSDPVSNVNDKLISYNNQPANRWTNWNRSNPEASVGVLFSDGILSKRSVDNLVSGFHEDHGVGAPKSYVIEYY
 VGKTVPTAPKNPSFVGNEDHVFNDSANWKPVTNLKAPQLKAGEMNHFSFDKVETAYAIRIRMVKADNKRGTSTITEVQ
 IFAKQVAAKQGGQTRIQVQDGKDLANFNPDLDYYLESVDGKVPVAVTANVSNNGLATVVPVSVREGEPPVRVIAKAENG
 ILGEYRLHFTKDKNLLSHKPVAAVKQARLLQVGQALELPTKVPVYFTGKDGYESKDLTVEWEEVPAENLTAKAGQFTV
 RGRVLGSLNVAEVTVRVTDKLGGETLSDNPNYDENSNOAFASATNDIDKNSHDRVLDYLDGHDHSENRRWTNWSPTSS
 NPEVSAGVIFRENGKIVERTVAQAKLHFFADSGTDAPSKLVRLERYVGPGEVPTYYSNYQAYESGHPFNPNPENWEAV
 PYRADKDIAAGDEINVTFFKAVKAKVMRWRMERKADKSGVAMIEMTFLAPSELPESTQSKILVDGKELADFAENRQD
 YQITYKGQRPKVSVEENNQVASTVVDSGEDSLPVLVRLVSESGKQVKEYRIQLTKEKPVSAVQEDLPKLEFVEKDLA
 YKTVEKKDSTLYLGETRVEQEGKVGERIFTVINPDGSKEEKLREVVEVPTDRIVLVGTKPVAQEAKKPQVSEKADT
 KPIDSSEADQTNKAQ

SEQ ID NO: 39

MGKGHWNKRKRVYSIRKFAVGACSVMIGTCAVLLGGNIAGESVVYADETLITHTAEKPKEEKMIVEEKADKALETKNI
 VERTEQSEPSSTEAIASEKKEDEAVTPKEEKVSAPKEEKAPRIESQASNQEKPLKEDAKAVTNEEVNQMIEDRKVDF
 NQNWYFKLNANSKEAIKPDADVSTWKKLDLPYDWSIFNDFDHESPAQNEGGQLNGGEAWYRKTFKLDEKDLKKNVRL
 TFDGVYMDSQVYVNGQLVGHYPNGYNQFSYDITKYLQKDGRENVIHAVNKKQSSRWYSGSGIYRDVTLQVTDKVVH
 VEKNGTTILTPKLEEQQHGKVEHVTSKIVNTDDKDHELVAEYQIVERGGHAVTGLVRTASRTLKAHESTSLDAILE
 VERPKLWTVLNDKPALYELITRVYRDGQLVDAKKDLFGYRYHWTNNEGFSLNGERIKFHGVSLLHHDHGALEENY
 KAEYRRLKQMKEMGVNSIRTTNHPASEQTLQIAAELGLLVQEEAFDTWYGGKKPYDYGREFEKDATHPEARKGEKWS
 DFDLRTMVERGKNNPAIFMWSIGNEIGEANGDAHSLATVKRLVKVIKDVDKTRYVTMGADKFRFGNGSGGHEKIADE
 LDAVGFNYSIEDNYKALRAKHPKWLIIYGSETSSATRTRGSYYRPERELKHSNGPERNYEQSDYGNDRVWGWTATASW
 TFDNRDAGYAGQFIWTGTDIYGEPTPWHNQNTPVKSSYFGIVDTAGIPKHDIFYLYQSQWVSVKKKPMVHLLPHWNW
 ENKELASKVADSEGKIPVRAYSNAASSVELFLNGKSLGLKTFNKKQTSDBGRTYQEGANANELYLEWKVAYQPGTLEAI
 ARDESGKEIARDKITTAGKPAAVRLIKEDHAIADGKDLTYIYYEIVDSQGNVPTANNLVRFLHGQGGQLVGVNDG
 EQASRERYKAQADGWSIRKAFNGKGVAVIKSTEQAGKFTLTAHSDLLKSNQVTVFTGKKEGQEKTVLGTVEVPKVQTI
 IGEAPEMPTTVPFVYSDGSRAERPVTWSSVDVSKPGIIVTVKGMADGREVEARVEVIALKSELPPVKRIAPNTDLNSV
 DKSVSIVLIDGSVEEYEVDKWEIAEEDKAKLAIPGSRIQATGYLEGQPIHATLVVEEGNPAAPAVPTVTVGGEAVTG
 LTSQKPMQYRTLAYGAKLPEVTASAKNAAVTVLQASAANGMRASIFIQPKDGGPLQTYAIQFLEEAPKIAHLSLQVE
 KADSLKEDQTVKLSVRAHYQDGTQAVLPADKVTFTSTSGEVEAIRKGMLELHKPGAVTLNAEYEGAKDQVELTIQAN
 TEKKIAQSIRPVNVVTDLHQEPSLPATVTVEYDKGFPKTHKVTWQAIPEKLDYQTFEVLGKVEGIDLEAKVSV
 EGIVSVEEVSVTTPIAEAPQLPESVRTYDSNGHVSSAKVAWDAIRPEQYAKEGVFTVNGRLEGTQLTTKLHVRVSAQ
 TEQGANISDQWTGSELPLAFASDSNPSDPVSNVNDKLISYNNQPANRWTNWNRTNPEASVGVLFSGSILSKRSVDN
 LSVGFHEDHGVGVPKSYVIEYYVGKTVPTAPKNPSFVGNEDHVFNDSANWKPVTNLKAPAQKAGEMNHFSFDKVT
 YAVRIRMVKADNKRGTSITEVQIFAKQVAAKQGGQTRIQVDGKDLANFNPDLDYYLESDVKVPVAVTASVSNGLA
 TVVPSVREGEPPVRVIAKAENGDIILGEYRLHFTKDKSLLSHKPVAAVKQARLLQVGQALELPTKVPEVYFTGKDGKETK
 DLTVEWEEVPAENLTKAGQFTVRGRVLGSNLVAEITVRVTDKLGETLSDNPNYDENSNOAFASATNDIDKNSHDRV
 YLNDGDHSENRRWTNWSPTPSSNPEVSAGVIFRENGKIVERTVTQGVQFFADSGTDAPSKVLERYVGPFEFVPTY
 YSNYQAYDADHFPNNPENWEAVPYRADKDIAAGDEINVTFAIKAKAMRWRMERKADKSGVAMIEMTFLAPSELPOE
 STQSKILVDGKELADFAENRQDYQITYKQRPKVSVEENNQVASTVVDSGEDSFVPLVRLVSESGKQVKEYRIHLTK
 EKEPVSEKTVAAVQEDLPKIEFVEKDLAYKTVEKKDSTLYLGETRVEQEGKVGKERIFTAINPDGSKEEKLREVVEVP
 TDRIVLVGTKPVAQEAQKPVSEKADTKPIDSSSEASQTNKAQLPSTGSAASQAAVAAGLTLGLSAGLVVTKGKKED

SEQ ID NO: 40

ALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKLEENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMN
 LPIFKGLDNVNLFYGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYEIREVK
 RVTPTDRVDEVDDRQDGVNEITLVTCEDLAATERIIVKGLKETKDYSQTSDEILTAFNQPKQFY

SEQ ID NO: 41

VPKTATSTETKTIITRIIHYVDKVTNQNVEDVVPVTLSTRTKTENKVTGVVTYGEWTTGNWDEVISGKIDKYKDPDI
 PTVESQEVTSDDSDKEITVRYDRLSTPEKPIQPNPEHPSVPTPNPELPNQETPTPDKPTPEPGTPTETPVNPDPE
 VPTYETGKREE

SEQ ID NO: 42

ASDGTWQKGQYLKEDGSQAANEWVFDTHYQSWFYIKADANYAENEWLKQGGDYFYLKSGGYMAKSEWVEDKGAFYYL
 DQDGKMKRNAWVGTSYVGATGAKVIEDWVYDSQYDAWFIKADGQHAKEWLQIKGKDYFYKSGGYLLTSQWINQAY
 VNASGAKVQGGWLFQYQSWFYIKENGNADKEWIFENGHYLYLKSGGYMAANEWIWDKESWFLYKFDGKIAEKEW
 VYDSHSQAWYYFKSGGYMAANEWIWDKESWFLYKFDGKMAEKEWVYDSHSQAWYYFKSGGYMTANEWIWDKESWFLY
 KSDGKIAEKEWVYDSHSQAWYYFKSGGYMTANEWIWDKESWFLYKSDGKMAEKEWVYDSHSQAWYYFKSGGYMAKNE
 TVDGYQLGSDGKWLGGKATNKNAAYYQVVPVTANVYDSGDGKLSYISQGSVVWLDKDRKSDDKRLAITISGLSGYMK
 TEDLQALDASKDFIPYYESDGHRYFYHYVAQNASI PVASHLSDMEVGGKYYASADGLHFDGFKLENPFLFKDLTEATNY
 SAEELDKVFSLLNINNSLLENKGATFKEAEEHYHINALYLLAHSALSNWGRSKIAKDKNNFFGITAYDTTPYLSAK
 TFDDVDKGILGATKWIKENYIDRGRTFLGNKASGMNVEYASDPYWGEEKIASVMMKINEKLGGKD

SEQ ID NO: 43

ANETEVAKTSQDTTTASSSSEQNQSSNKTQTSAEVQTNAAAYWDGDDYVVKDDGSKAQSEWIFDNYKAWFYINSDGR
 YSQNEWHGNYLYKSGGYMAQNEWIYDSNYKSWFLYKSDGAYAHQEWQLIGNKWWYFKKWGYMAKSQWQGSYFLNGQG
 AMIQNEWLYDPAYSAYFYLYKSDGTYANQEWQKVGKWWYFKKWGYMARNEWQGNYYLTGSGAMATDEVIMDGARYIF
 AASGELKEKKDLNVGWVHRDGGKRYFFNNREEQVGTTEHAKKIDISEHNGRINDWKKVIDENKVDGIVIRLGYSKED
 KELAHLNKLNLGIPYGVYLYTYAENETDAENDAKQTIELIKKYNMNLSPYIYDVENWEYVNSKRAPSDDTWTW

KIINKYMDTMKQAGYQNVYVYSYRSLQLTRLKHPDILKXVNWVAAYTNALEWENPYYSGEKGWQYTSSEYMKGIQGR
VDVSVWY

SEQ ID NO: 44

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLV
VDETLLENNTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYQGVNNVPARMQYEKIT
AHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPGDVFQDVTVTVEDLKQRGISAE
RPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDVEEAFAEALIKGVKVPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVD
MVEDLIQEGSRFTADHLGLPISYTTSFRLDNVAVTFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYD
HQGKEVLTTPKAWDRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPLVRKRTISIWGTTLYP
QVEDKVEND

SEQ ID NO: 45

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLV
VDETLLENNTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYQGVNNVPARMQYEKIT
AHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPGDVFQDVTVTVEDLKQRGISAE
RPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDVEEAFAEALIKGVKVPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVD
MVEDLIQEGSRFTADHLGLPISYTTSFRLDNVAVTFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYD
HQGKEVLTTPKAWDRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAFEWRTVYEKTDLPLVRKRTISIWGTTLYP
QVEDKVEND

SEQ ID NO: 46

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLV
VDETLLENNTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYQGVNNVPARMQYEKIT
AHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPGDVFQDVTVTVEDLKQRGISAE
RPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDVEEAFAEALIKGVKVPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVD
MVEDLIQEGSRFTADHLGLPISYTTSFRLDNVAVTFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYD
HQGKEVLTTPKAWDRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAFEWRTVYEKTDLPLVRKRTISIWGTTLYP
QV

SEQ ID NO: 47

AETDDKIAAQDNKISNLTAQQQEAQKQVDQIQEQVSAIQAEQSNLQAENDRLQAESKKLEGEITELSKNIVSRNQS
LEKQARSQNTGAVTSYINTIVNSKSITEAISRVAAMSEIVSANNKMLEQQKADKKAISEKQVANNDAINTVIANQQ
KLADDAQALTTKQAEKAAELSLAAEKATAEAGEKASLLEQKAAAEAEARAAVAEAAAYKEKRASQQQSVLASANTNL
TAQVQAVSESAAAAPVRKVRPTYSTNASSYPIGECTWGVKTLAPWAGDYWGNGAQWATSAAAAGFRTGSTPQVGAIA
CWNDGGYGHVAVVTAVESTTRIQVSESNYAGNRTIGNHRGWFNPNTTSEGFVYIYAD

SEQ ID NO: 48

MKSITKKIKATLAGVAALFAVFAPSFVSAQESSTYTVKEGDTLSEIAETHNTTVEKLAENNHIDNIHLIYVDQELVI
DGPVAPVATPAPATYAAPAAQDETVSAPVAETPVVSETVSVTVSGSEAEAKEWIAQKESGGSYTATNGRYIGRYQLT
DSYLNQDYSANQERVADAYVAGRYGSWTAAKNFWLNNGWY

SEQ ID NO: 49

MKKNRVFATAGLVLLAAGVLAACSSSKSSDSSAPKAYGYVYTADPETLDYLISSKNSTTVVTSNGIDGLFTNDNYGN
LAPAVAEDWEVSKDGLTYTYKIRKGVKWFSTSGEEYAEVTAKDFVNGLKHAADKKSEAMYLENSVKGLADYLSGTS
TDFSTVGKAVDDYTLQYTLNQPEPFWNSKLTYSIFWPLNEEFETSKGSDFAKPTDPTSLLYNGPFLKGLTAKSSV
EFVKNEQYWDKENVHLDITINLAYYDGSQESLERNFTSGAYSARLYPTSSNYSKVAEEYKDNIIYTSQSGSGLAGL
VNIDRQSYNYTSKTTDSEKVAATKALLNKDFRQALNFALDRSAYSQAQNGKDGAALAVRNLVFKPDFVSAGEKTFGD
LVAAQLPAYGDEWKGVNLADGQDGLFNADKAKAEFAKAKKALEADGVQFPIHLDVPVDQASKNYISRIQSFKQSVET
VLGVENVVVDIQQMTSDEFINITYYAANASSEDWDVSGGVSWGPDYQDPSTYLDILKTTSETTKTYLGFDNPNSPS
VVQVGLKEYDKLVDEAARETSDLNVRYEKAAAAQAWLTDSSSLFIPAMASSGAAPVLSRIVPFTGASAQTGSKGSDVY
FKYLSQDKVVTKEEYKAREKWLKEKAESNEKAQKELASHVK

SEQ ID NO: 50

MNKKKMILTSLASVAILGAGFVASOQTVVRAEESPVASQSKAEKDYDAKKDAKNAKKAVEDAQKALDDAKAAQKKY
DEDQKKTEEKAALKAASEMDKAVAAVQQAAYLAYQQATDKAAKDAADKMIDEAKKREEEAKTKFNTVRAMVVPPE
QLAETKKKSEEAKQKAPELTKKLEAAKAKLEAAEKKATEAKQKVDAAEVAPQAKIAELENQVHRLEQELKEIDESSES
EDYAKEGFRAPLQSKLDAKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQLKAAEENNNVEDYFKEGLEKTIAAKKAELEK

TEADLKKA VNEPEKPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPAPKPEKPAEQPKPEKTDQQAEEEDYARRSEEEYNRL
TQQQPPKAEKPAPAPKTGWKQENGWYFYNTDGSMATGWLQNNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMAT
GWAKVNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNANGA
MATGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWVKDGD TWYYLEASGAMKASQWFKVSDKWYYVNGLGALAVNTTVDGYKVNANG
EWV

SEQ ID NO: 51

MKKLGTL LVLFLSAIILVACASGKKDTTSGQKLKV VATNSIIADITKNIAGDKIDLHSIVPIGQDPHEYEPLPEDVK
KTSEADLI FYNGINLETGGNAWFTKLVENAKKTENKDYFAVSDGVDVIYLEGQNEKGKEDPHAWLNLENGIIFAKNI
AKQLSAKDPNNKEFYEKNLKEYTDKLDKLDKESKDKFNKIPAEKKLIVTSEGAFKYFSKAYGVPSAYIWEINTEEEG
TPEQIKTLVEKLRQTKVPSLFEVSSVDDRPMKTVSQDTNIPYIAQIFTD SIAEQGKEGDSYYSMMKYNLDKIAEGLA
K

SEQ ID NO: 52

MFASKSERKVHYSIRKFSIGVASVAVASLVMG SVVHATENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQ
LDRRKHTQNVALNIKLSAIKTKYLRELVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEKVAEAKKKVEEAKKK
AEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAELELVKEEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKA EATRLENIKTDRK
KAE EEA KRKADAKLKEANVATSDQGKPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSSSLKSGKKVAEAEK
KVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLDLEIAESDVKVKEAELELVKEEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKA EATRLE
ENIKTD RKKAE EEA KRKAAEEDKVKEKPAEQPPAPATQPEKPAPKPEKPAEQPKAEKTDQQAEEEDYARRSEEEYN
RLTQQQPPKTEKPAQPSTPKTGWKQENGWYFYNTDGSMATGWLQNNGSWYYLNANGAMATGWLQNNGSWYYLNANG
SMATGWLQNNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATGWLQNNGSWYYLN
ANGDMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATGWVKDGD TWYYLEASGAMKASQWFKVSDKWYYVNGSGALAVNTTVDGYGV
NANGEWVN

SEQ ID NO: 53

MFAFKRRRKVHYSIRKFSIGVASVAVASLVMG SVVHATEKEVTTQVATSSNANKSQT EHMKA AKQVVDEYIEKMLSE
IQ LDRRKHTQNVGLLTKLGAIKTEYLRGLSVSKEKSTAE L PSEIKEKLTA AFEQFKKDTLKS GKKVAEAKKKAKDQK
EAKQEIEALIVKHKGREIDLDRKKAKAAVTEHLKKLNDIEKNLKKEQHTHTVELIKNLKDIEKTYLHKLDESTQKA
QLQKLI AESQSKLDEAFSKFKNGLSSSSNSGSSSTKPETPQPETPKPEVKPELETPKPEVKPEPETPKPEVKPEPETP
KPEVKPELETPKPEVKPEPETPKPEVKPEPETPKPEVKPEPETPKPEVKPELETPKPEVKPELETPKPEVKPEPETP
KPEVKPELETPKPEVKPEPETPKPEVKPELETPKPEVKPEPETPKPEVKPELETPKPEVKPEPETPKPEVKPEPETP
KPEVKPEPETPKPEVKPELETPKQKVKEPETPKPEVKPEPETPKPEVKPELETPKPEVKPELETPKPEVKPELETPKPEVKPDNSKP
QADDKKPSTPNNL SKDKQSSNQASTNENKKQGPATNPKPKSLPSTGSSISNLAL E IAGLLTLAGATILAKRKM

SEQ ID NO: 54

MEINVS KLRTDL PQVGVPYRQVHAHSTGNPHSTVQNEADYHWRKDPELGFFSHIVGNGC IMQVGPVDNGAWDVGGS
WNAET YAAVELIESHSTKEEFMTDYRLYIELRLNLADEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNNHSDHVDYPYLY
AKWGI SREQFKHDIENGLTIETGWQKNDTG YWYVHSDGSYPKDKFEKINGTWY YFDSSGYMLADRWRKHTDGNWYWF
DNSGEMATGWKKIADKWY YFNEEGAMKTGWVKYKDTWY YLDAKEGAMVSNAFIQSADGTGWY YLKP DGT LADRPEFT
VEPDGLITVK

SEQ ID NO: 55

MQLEISNRKRVS MKINKKYL VGSAAALILSVCSYELGLYQARTVKENNRVSYIDGKQATQKTENLTPDEVSKREGIN
AEQIVIKITDQGYVTSHGDHYHYNGKV PYDAIFSEELLMKDPNYKLKDEDIVNEVKGGYVIKVDGKYVYVLKDAAH
ADNVRTKEEINRQKQEH SQHREGGT PRNDGAVALARSQGRYTDDGYIFNASDI IEDTGDAYIVPHGDHYHYIPKNE
LSASELAAAEAF LSGRGNLSNSRTYRRQNSDNTSR TNWVPSVSNPGTTNTNTSNNSNTNSQASQSNIDSL LKQLYK
LPLSQRHVESDGLVFDPAQITSRTARGVAVPHGDHYHFIPYSQMSELEERIARIIP LRYRSNHWPDSRPEQSPSPQ
TPEPSGPQPAPNLKIDSNSLVSQ LVRKVGEGYVFEKGISRYVFAKDL PSETVKNLESKLSKQESVSHTLTAKKE
NVAPRDQEFYDKAYNLLTEAHKALFENKGRNSDFQALDKLLERLNDESTNKEKLVDDLAF LAPITHPERLGKPN SQ
IEYTEDEVRI AQLADKYTTSDGYIFDEHDIISDEGDAYVT PHMGHSHWIGKDSLSDKEKVAAQAYTKEKGILPPSPD
ADV KANPTGDSAAAIYNRVKGEKRIPLVRLPYMVEHTVEVKNGNLII PHKDHYHNKFAWFDDHTYKAPNGYTTLEDL
FATIKY YVEHPDERPHSNDGWGNASEHVLGKKDHS EDPNKNFKADEEPVEETPAEPEVPQVETEKVEAQLKEAEVLL
AKVTDSS LKANATETLAGLRNNLT LQIMDNNSIMAEAEKLLALLKGSNPSSVSKEKIN

SEQ ID NO: 56

MKINKKYL AGSVAVLALSVC SYELGRYQAGQDKKESNRVAYIDGDAQQKAENLTPDEVSKREGINAEQIVIKITDQ
GYVTSHGDHYHYNGKV PYDAI ISEELLMKDPNYQLKDS DI VNEIKGGYVIKVNGKYVYVLKDAAHADNIRTKEEIK

SEO ID NO: 57

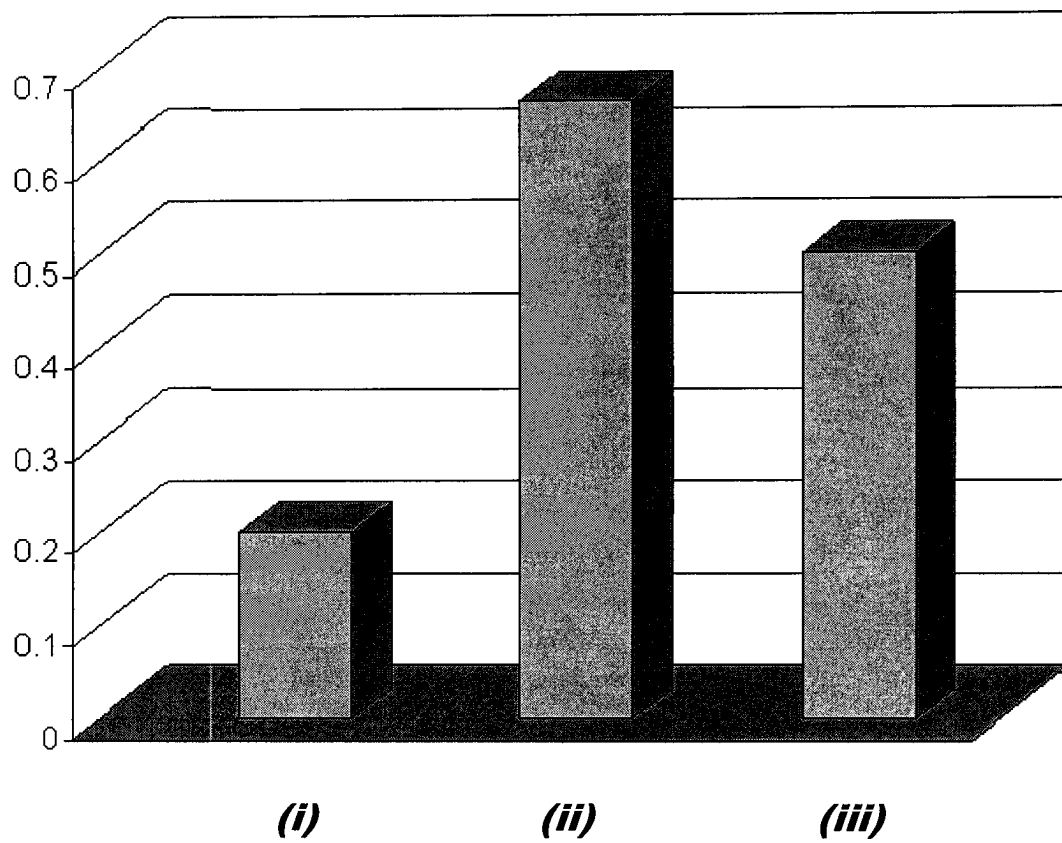
SEQ ID NO: 58

SEO ID NO: 59

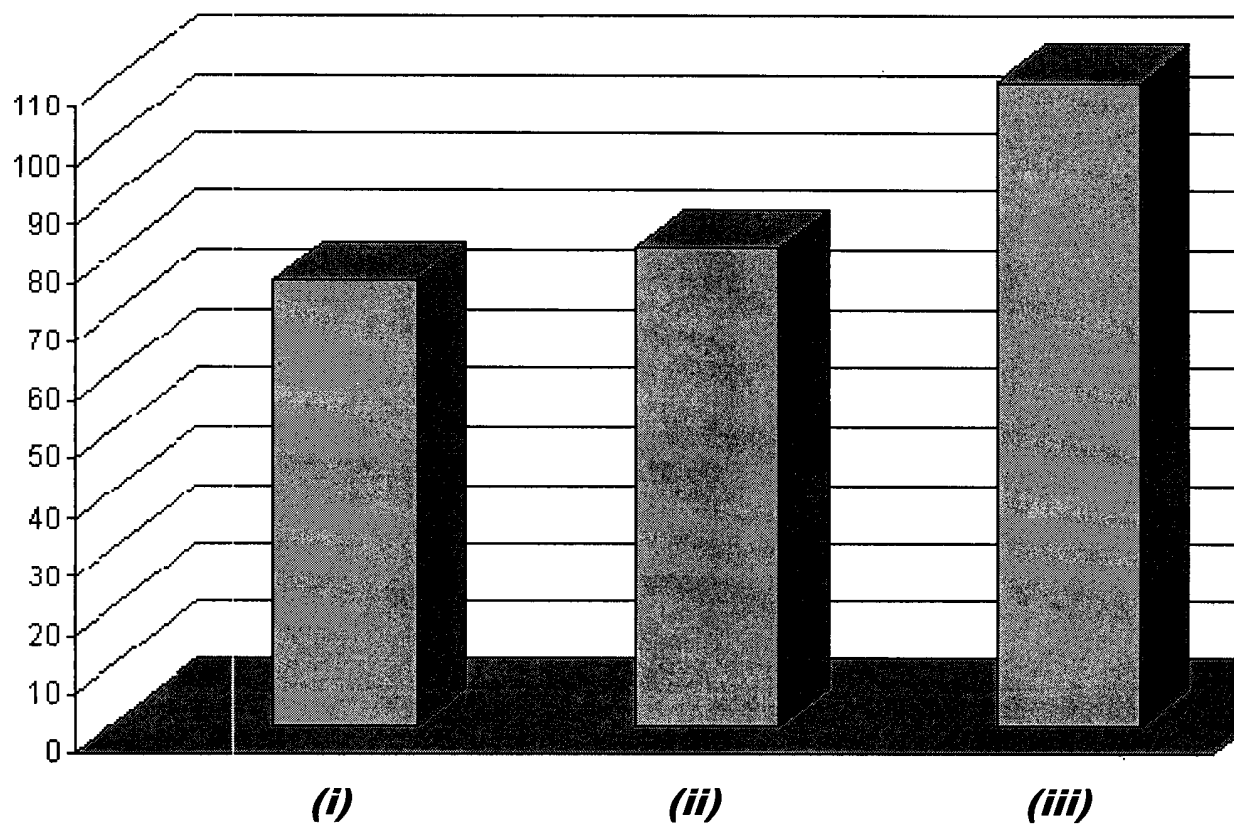
AAALE

$$\begin{array}{c} \rightarrow 6) \beta\text{-D-GlcNAc}_p (1 \rightarrow 3) \beta\text{-D-Galp} (1 \rightarrow 4) \beta\text{-D-Glc}_p (1 \rightarrow \\ | \\ \text{4} \\ | \\ \beta\text{-D-Galp} \end{array}$$

Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4