

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **027981**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2017.09.29**

**(21)** Номер заявки  
**201590078**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.06.21**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)  
*A61K 39/112* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)

---

**(54) ВАКЦИНА ПРОТИВ ПНЕВМОНИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОГО БЕЛКА**

---

**(31)** 2012126328

**(32)** 2012.06.22

**(33)** RU

**(43)** 2015.06.30

**(86)** PCT/RU2013/000525

**(87)** WO 2013/191591 2013.12.27

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЭПИТОП ЛИМИТЕД (ЭПИТОП  
ЛТД.) (RU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Суворов Александр Николаевич,  
Духовлинов Илья Владимирович,  
Орлов Антон Иосифович, Байгузин  
Евгений Яковлевич (RU)**

**(74)** Представитель:  
**Федорова Е.А. (RU)**

**(56)** US-A1-20120135037  
DATABASE GenBank, ABJ98818.1,  
08.01.2007, [retrieved on 02.09.2013]. Retrieved  
from the Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>  
US-A1-20110287052

---

**(57)** Проблема, которая должна быть решена: отсутствие безопасной эффективной вакцины для профилактики и лечения обусловленных *Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*) заболеваний, способной обеспечивать защиту против всех штаммов *S.pneumoniae* (отсутствие универсальной вакцины против пневмококков). Решение: вакцина на основе гибридного белка, состоящего из иммуногенных эпитопов консервативных белков *Streptococcus pneumoniae*: PspA, Spr1895 и PsaA, а также компонентов флагеллина (FliC1, FliC2), функционирующих в качестве безопасного адьюванта, и, соответственно, гомологичных им белков или пептидов не менее чем на 60% по аминокислотной последовательности, соединенных гибкими мостиками. Продемонстрированы безопасность, эффективность и как профилактический, так и терапевтический эффект.

---

**B1**

**027981**

**027981**

**B1**

Изобретение относится к медицине, фармакологии, биотехнологии и может быть использовано для профилактики и лечения пневмонии, вызываемой пневмококками (латинское название вида - *Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*)).

Термин "гибридный белок" здесь обозначает белок, полученный в результате экспрессии рекомбинантной молекулы ДНК, в которой соединены друг с другом в одной рамке считывания кодирующие участки нескольких разных генов.

Пневмония (син. воспаление легких) считается распространенным заболеванием как у взрослых, так и у детей, и требует ответственного проведения диагностических и лечебных мероприятий. По медицинской статистике более одного миллиона россиян ежегодно заболевают воспалением легких, и у 5% пациентов болезнь заканчивается летальным исходом (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/ru/index.html>).

Термин "пневмония" объединяет большую группу болезней, каждая из которых имеет свою этиологию, патогенез, клиническую картину, рентгенологические признаки, данные лабораторных исследований и особенности терапии, может протекать как самостоятельное заболевание или как осложнение других болезней.

Пневмония - воспалительный процесс инфекционного происхождения дыхательных систем человека. Возбудителями пневмонии могут быть вирусы, грибы, но чаще всего ими являются бактерии. Самая частая причина бактериальной пневмонии - пневмококк (*S. pneumoniae*). Изучение глоточной микрофлоры выявляет носительство пневмококков у 5-25% здоровых людей.

Для пневмококков характерна мощная полисахаридная капсула, которая выполняет функцию защиты микроорганизма от опсонизации и последующего фагоцитоза. Вследствие того, что капсула пневмококков является основным поверхностным элементом, распознаваемым системой иммунитета, капсульный полисахарид характеризуется наибольшей вариабельностью. К настоящему времени обнаружен 91 различный капсульный тип пневмококков, но большинство (более 90%) инвазивных пневмококковых заболеваний вызывается 23 наиболее распространенными сероварами. Большое количество иммунологических вариантов капсульного полисахарида является фактором, осложняющим создание эффективных полисахаридных вакцинных препаратов.

Заболеть пневмококковой инфекцией может любой человек, но существуют группы риска, в большей степени подверженные заболеванию, это лица в возрасте от 65 лет, маленькие дети, лица, имеющие определенные проблемы со здоровьем, лица с ослабленной иммунной системой, курильщики.

Пневмококковая инфекция нередко с трудом поддается лечению, поскольку многие циркулирующие эпидемические штаммы пневмококков приобрели множественную лекарственную устойчивость к антибиотикам. Для предупреждения развития заболевания используются вакцины. Согласно позиции ВОЗ (Всемирная Организация Здравоохранения) и Российского респираторного общества, "Вакцинация - единственная возможность предотвратить развитие пневмококковой инфекции". На данный момент FDA (Food and Drug Administration) одобрило 2 типа вакцин: пневмококковую конъюгатную вакцину и пневмококковую полисахаридную вакцину (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/pneumococcalinfections.html>). В России зарегистрированы вакцина Пневмо 23 (PPSV23) - 23-валентная пневмококковая полисахаридная вакцина производства компании Санофи Авентис Пастер, Франция, и вакцина Превенар (PCV7) - семивалентная пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная вакцина компании Вайет Фармасьютикалз, США.

Пневмококковая полисахаридная вакцина (ППСВ) показана взрослым. У большинства здоровых взрослых людей, прошедших вакцинацию ППСВ, вырабатывается сопротивляемость большинству типов бактерий (антигены которых имеются в вакцине) в течение 2-3 недель после прививки. У лиц очень пожилого возраста, детей до 2 лет и людей с хроническими заболеваниями вакцинация может не привести к созданию стойкого иммунитета, либо иммунитет к заболеванию не возникает совсем (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/languages/pneumococcalinfections.html#Russian>). Кроме того, после вакцинации могут возникнуть осложнения: покраснение, болезненные ощущения в месте инъекции, высокая температура, мышечные боли или более серьезные местные реакции (Donalisio M.R., Rodrigues S.M., Mendes E.T., Krutman M. Adverse events after pneumococcal vaccination. *J. Bras. Pneumol.* 2007 Feb; 33(1):51-6).

Однако ППСВ оказалась достоверно эффективна лишь для людей с низким риском заболевания пневмококковой инфекцией. Для детей до 2 лет одновременно с вакцинацией показана профилактика с использованием антибиотиков (Bade A., Diot P., Lemarie E. Anti-pneumococcal vaccine: justifications and results. *Rev. Pneumol. Clin.* 1997; 53(3):128-37).

Оказалось, что ППСВ не уменьшает частоту пневмонии и связанную с ней смертность и лишь немного уменьшает риск заражения тяжелой пневмококковой инфекцией. Также показано, что данная вакцина не защищает от пневмококков, чувствительных к пенициллину в больших концентрациях (Pneumococcal vaccine: a second look. Solution for SC or IM injection: pneumococcal vaccine. *Prescrire Int.* 1998 Feb; 7(33):16-8). Такие же результаты были показаны и для людей старше 65 лет (Pneumococcal vaccination for elderly subjects: license extension. Still no proof of clinical efficacy. *Prescrire Int.* 2000 Aug; 9(48):106-9).

Действующим веществом ППСВ являются полисахариды 23 серотипов *Streptococcus*, вызывающих

до 90% инвазивных заболеваний пневмококковой этиологии. Полисахарид - это антиген, не связанный с реакцией Т-клеток, потому вызывает лишь краткосрочный иммунитет без иммунной памяти; вакцины, содержащие только данные вещества, неэффективны, что показано у детей до 2 лет (Greenwood B.M. et al., Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980, 74:756-760; международная заявка на изобретение WO 2010120921 A1, дата приоритета 16.04.2009). Также тот факт, что существует порядка 90 серотипов пневмококков, поскольку возбудители заболеваний в разных областях земного шара различаются, затрудняет создание универсальной вакцины на основе полисахаридов.

В конъюгированной вакцине, показанной детям, наряду с полисахаридами 7 сероваров пневмококков, которые наиболее часто вызывают заболевания среди детей, также содержится белок-носитель CRM 197 (мутант дифтерийного токсина), в качестве адьюванта. Благодаря наличию адьюванта в препарате вакцины данный антигенный комплекс хорошо распознается Т-клетками, обеспечивая устойчивый иммунитет (Schneerson R., Barrera O., Sutton A., Robbins J.B. Preparation, characterization, and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates. J. Exp. Med. 1980 Aug. 1; 152(2):361-76). CRM 197 связывается с гепарин-связывающим эпидермальным фактором роста и может ингибировать heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). Несмотря на то что токсичность CRM197 примерно в 106 раз меньше, чем дифтерийного токсина, все же его использование должно быть осторожным, особенно в высоких дозировках (Takuya Kageyama, Minako Ohishil, Shingo Miyamoto, Hiroto Mizushima, Ryo Iwamoto and Eisuke Mekada. Diphtheria Toxin Mutant CRM197 Possesses Weak EF2-ADP-ribosyl Activity that Potentiates its Anti-tumorigenic Activity. Received April 16, 2007. Accepted May 2, 2007). Кроме того, после вакцинации могут возникнуть осложнения: покраснение, чувствительность или припухлость в месте введения препарата, температура выше 38-39°C, а также беспокойность, сонливость, потеря аппетита. Более того, вакцинацию рекомендуют проводить детям до 2 лет четыре раза, от 2 до 5 лет - в зависимости от возраста ребенка. В общей сложности для вакцинации ребенка требуется введение как минимум 4 доз, что дорого и небезопасно.

Известна вакцина, двумя главными компонентами которой являются полисахарид оболочки *N. meningitidis* и белок PsaA *S. pneumoniae* (может также использоваться белок PspA) (международная заявка на изобретение WO 2010120921 A1, дата приоритета 16.04.2009). Ввиду невозможности выработки иммунной памяти на полисахариды считаем использование полисахарида оболочки *N. meningitidis* в качестве компонента вакцины неоправданным. Использование же белков PsaA и PspA целесообразно - это поверхностные антигены пневмококков, которые способны вызывать и иммунный ответ, и формирование иммунологической памяти.

При создании патентуемой вакцины опирались на индукцию сильного иммунного ответа с последующим формированием иммунной памяти. Для этого в нашей разработке центральное место заняли не полисахариды, а белки пневмококков, полученные с использованием методов молекулярной биологии и рекомбинантной ДНК. По литературным данным в качестве вакцинных кандидатов белковой природы наиболее перспективными антигенами являются три поверхностных белка пневмококков: PsaA, PspA, Spr 1895.

Белок PsaA считают перспективным иммуногеном и авторы международной заявки на изобретение WO 2004102199 A2, дата приоритета 16.05.2003. Авторы приводят данный белок и еще несколько белков (SlrA - ротамаза липопротеинов, IgA1 - протеаза, PrpA - белок созревания стрептококков) или их компонентов в качестве основы для создания вакцины. Однако мы считаем более перспективным подход с использованием других поверхностных белков *S. pneumoniae* - помимо PsaA, PspA и Spr1895.

Описан гибридный белок, включающий PsaA и В-субъединицу холерного токсина в качестве адьюванта (Areas A.P., Oliveira M.L., Miyaji E.N., Leite L.C., Aires K.A., Dias W.O., Ho P.L. Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in Escherichia coli: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004 Aug. 13; 321(1):192-6). Однако мы считаем использование холерного токсина либо его компонентов в качестве компонента вакцины менее безопасным, чем флагеллина, ввиду того, что люди высокочувствительны к холерному токсину, и даже 8 мкг токсина может вызвать сильную диарею.

Исследования показали, что белки PsaA и PspA целесообразно использовать как основу для вакцин от пневмококковой инфекции. Белок PsaA высококонсервативен среди различных серотипов пневмококков и обуславливает адгезию бактерии и ее вирулентность (Berry A.M., and Paton J.C.: Sequence heterogeneity of psaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae. Infect. Immun. 1996; 64:5255- 5262). Показано, что антитела к PsaA обладают перекрестной активностью относительно всех серотипов *S. pneumoniae*.

PspA - это холин-связывающий поверхностный антиген, который ингибирует комплемент-опосредованный фагоцитоз, связывается с лактоферрином и предотвращает лактоферрин-опосредованную элиминацию бактериальных клеток (Hammerschmidt S., Bethe G., Remane P.H., Chhatwal G.S. (1999) Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of Streptococcus pneumoniae. Infect. Immun. 67:1683-1687). В данной статье также указывается белок PsaA как перспективный для создания вакцины. Авторами показан еще ряд белков, кандидатных для создания вакцин для защиты от пневмококковой инфекции, однако мы сочли целесообразным использование именно белков

PsaA и PspA ввиду их консервативности среди серотипов пневмококков и некоторых других бактерий.

Одним из главных компонентов предлагаемой вакцины также является белок Spr1895, закодированный в гене фосфат-связывающего белка фосфатного ABC транспортера. Данный белок является жизненно важным для бактерий, константным, что обуславливает его выбор для создания вакцины от пневмонии, вызываемой *S. pneumoniae*.

В настоящем изобретении также фигурирует белок флагеллин (FliC) в качестве адьюванта. FliC, взаимодействуя с Toll-like receptor-5 (TLR-5), стимулирует созревание макрофагов и дендритных клеток - антиген-презентирующих клеток, что приводит к выработке иммунного ответа (Mc Dermott P.F. High-affinity interaction between Gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infect. Immun.* - 2000. - V. 68. - p. 5525-5529; Means T.K. et al., The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J. Immunol.* -2003.- V.170.-p. 5165-5175).

На данный момент флагеллин является одним из наиболее перспективных и хорошо изученных адьювантов нового поколения. Результаты исследований показывают, что рекомбинантные белки, вводимые с флагеллином, имеют повышенные иммуногенные и антигенные характеристики. Ответы на них регистрируются в более короткие сроки и вызывают более сильный клеточный и гуморальный иммунный ответ (Balaram, 2008).

В настоящем изобретении указывается, что в качестве адьюванта могут быть использованы компоненты флагеллина. Во флагеллине обнаружены два рецептор -активирующих участка в терминальных областях (а.о. 79-117 и а.о. 408-439) (Топуя, 2001).

Таким образом, оправдан подход с использованием в качестве адьюванта определенных компонентов флагеллина (FliC domain 1, FliC domain 2).

TLR-5 экспрессирован на клетках врожденного иммунитета, на эпителиальных и эндотелиальных клетках (Sebastiani G. et al., Cloning and characterization of the murine Toll-like receptor 5 (Tlr5) gene: sequence and mRNA expression studies in Salmonella-susceptible MOLF/Eimice. *Genomics.* - 2000. - V. 64. - p.230-240; Zarembek K.A. and Godowski P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J.Immunol.* - 2002. - V.168. - p.554-561; Delneste, 2007). Ввиду этого целесообразно использование для иммунизации поверхности слизистой, что значительно облегчает доставку иммуногена.

Таким образом, к наиболее близким к настоящему изобретению можно отнести изобретение, описанное в WO 2004102199 A2, и конструкцию СТВ-PsaA, описанную в вышеприведенной статье. В международной заявке, однако, предлагается использовать белки или их функциональные части в качестве отдельных компонентов вакцины. В основе же нашего изобретения лежит гибридный белок, который, помимо специфической белковой компоненты *S.pneumoniae*, также включает адьювант. В связи с этим, прототипом настоящего изобретения является гибридный белок, описанный бразильскими авторами.

Гибридный белок СТВ-PsaA включает PsaA серотипа 6B *S.pneumoniae* (289 а.о.), а также В-субъединицу холерного токсина в качестве адьюванта (Areas A.P., Oliveira M.L., Miyaji E.N., Leite L.C., Aires K.A., Dias W.O., Ho P.L. Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in *Escherichia coli*: ability of СТВ-PsaA to induce humoral immune response in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004 Aug. 13;321(1):192-6). Однако выгоднее и удобнее (для обеспечения правильного фолдинга молекулы) использовать фрагмент белка - антигенную детерминанту - вместо полноразмерного белка. Именно такой подход - использование наиболее иммуногенных фрагментов белков - был использован при создании настоящего изобретения. Кроме того, мы считаем использование холерного токсина, либо его компонентов в качестве компонента вакцины менее безопасным, чем флагеллина, ввиду того, что люди высокочувствительны к холерному токсину, и даже 8 мкг токсина может вызвать сильную диарею. Относительно метода получения данного гибридного белка, ген, кодирующий белок PsaA, амплифицируется отдельно с плазмиды, в которую он введен, с последующим клонированием по сайтам рестрикции в вектор, содержащий ген, кодирующий СТВ. В нашем же случае использовался подход с применением синтеза полноразмерного гена, кодирующего гибридный белок.

Настоящее изобретение представляет собой вакцину на основе высокоочищенного гибридного белка (SEQ ID NO:1), включающего иммуногенные фрагменты белков PspA (160-262 а.о. gb|EHD89266.1| pneumococcal surface protein A [*Streptococcus pneumoniae*]), Spr1895 (94-161 а.о. ref|ZP\_01836139.1| LysM domain protein [*Streptococcus pneumoniae*]), PsaA (238 - 309 а.о. gb|AAF70667.1| PsaA [*Streptococcus pneumoniae*]), а также компоненты флагеллина в качестве адьюванта (1-169 а.о. gb|AAB33952.1| flagellin {alternatively spliced} [*Salmonella typhimurium*], 311 - 405 а.о. gb|AAB33952.1| flagellin {alternatively spliced} [*Salmonella typhimurium*]), соединенные гибкими мостиками. Вакцину в соответствии с настоящим изобретением получают в результате создания рекомбинантной ДНК, кодирующей описанный химерный белок, введения такой ДНК в векторную конструкцию, обеспечивающую высокий уровень ее экспрессии в клетках бактерии *E.coli*, введения данной векторной конструкции в клетки бактерий *E.coli*, продукции химерного белка в указанном организме, его выделения, очистки и смешивания с физиологически приемлемым носителем.соединенные гибкими мостиками.

Для получения в соответствии с настоящим изобретением гибридного белка могут быть использо-

ваны стандартные методы молекулярной биологии и микробиологии, известные специалистам в данной области техники. Такие методы полно представлены в научной литературе.

После вакцинации на входящие в состав гибридного белка вакцины эпитопы бактериальных поверхностных белков вырабатываются антитела, и формируется способность вырабатывать антитела в ответ на попадание в организм *S.pneumoniae*. В гибридном белке вакцины представлены антигенные детерминанты консервативных белков пневмококка, которые присутствуют у всех сероваров данного микроорганизма, поэтому иммунный ответ, который вырабатывается после вакцинации, будет вырабатываться при встрече с любым сероваром пневмококка. Использование эпитопов нескольких белков позволит увеличить эффективность вакцины. Наличие в сыворотке крови человека протективных антител к *S.pneumoniae* приведет к тому, что человек не заболит или легко перенесет болезнь.

Вакцина обладает как профилактическим, так и терапевтическим эффектом.

Технический результат от использования изобретения заключается в обеспечении универсальной защиты от пневмококков, благодаря возможности и профилактики, и терапии заболеваний, вызываемых *S.pneumoniae*, за счет того, что белок вакцины составлен из иммуногенных эпитопов нескольких консервативных белков пневмококков, на которые вырабатывается специфический иммунный ответ с формированием иммунологической памяти.

Технический результат от использования изобретения также заключается в усилении иммунного ответа на активный компонент вакцины, за счет использования в составе конструкции адьюванта, компонентов флагеллина.

Технический результат выражается и в увеличении безопасности вакцины, благодаря использованию в качестве адьюванта нетоксичного агента - адьюванта (компонентов флагеллина).

Изобретение проиллюстрировано следующими графическими материалами:

фиг. 1 - 3D-структура гибридного белка, показаны  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слои;

фиг. 2 - 3D-структура гибридного белка, показаны аминокислотные остатки;

фиг. 3 - динамика выживаемости мышей (%) после заражения 1 LD *S.pneumoniae* (профилактическая модель);

фиг. 4 - динамика выживаемости мышей (%) после заражения 1 LD *S.pneumoniae* (терапевтическая модель).

### Осуществление изобретения

Пример 1. Моделирование гибридного белка.

Спланированный гибридный полипептид является сложным мультидоменным белком (5 доменов: FliC1, FliC2, PspA, PsaA, Spr1895). Для моделирования мультидоменных белков были произведены определение границ доменов, построение модели целого белка для определения ориентации доменов, построение моделей для каждого домена (с использованием образцов 3D структур и *ab initio*) и докинг моделей с использованием модели целого белка.

В спланированном гибридном полипептиде два домена имели образцы, а три нуждались в *ab initio* моделировании, кроме этого, в *ab initio* моделировании требовалось сформировать гибкие мостики между доменами.

Для получения более приближенных к реальности результатов в автоматическом режиме использовали алгоритм I-Tasser, признанный лучшим на последних трех CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction) - соревнованиях по моделированию белков. Данный анализ проводили в течение трех дней. Однако даже с использованием данного мощного алгоритма получение адекватных данных для мультидоменного белка с необходимостью *ab initio* моделирования доменов и их границ не полностью достоверно (70%).

Для получения более точных данных разбили белок на используемые домены, провели их моделирование с использованием I-Tasser и далее провели их докинг.

Проделировав все шаги, получили конструкцию, представленную на фиг. 1, 2.

Смоделированный гибридный белок состоит из 536 а.о., представлена его аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:1. Анализ аминокислотной последовательности данного белка с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) показал, что гибридный белок имеет молекулярную массу 56,6 кДа, pI 4.56.

Пример 2. Создание нуклеотидной последовательности, кодирующей гибридный белок.

Перевели аминокислотную последовательность гибридного белка, включающего PspA, Spr1895, PsaA, FliCdomain1, FliCdomain2, в нуклеотидную (1623 п.н.), оптимизировав последнюю для экспрессии в клетках *E.coli*.

Синтез данной нуклеотидной последовательности осуществляли путем удлинения взаимоперекрывающихся олигонуклеотидов согласно описанным методам (Majumder, 1992). Олигонуклеотиды представляли собой фрагменты гибридного гена длиной около 70 нуклеотидов со взаимоперекрывающимися участками длиной около 20 нуклеотидов. Основные требования к праймерам заключались в том, что их длина не должна была превышать 60 нуклеотидов, а участки гибридизации должны были быть не меньше 20 нуклеотидов. Кроме того, на концах олигонуклеотидов не должно было быть длинных участков с повторяющимися G или C. В ряде случаев подбор оптимальных праймеров осуществляли эмпири-

чески путем сдвига праймера по отношению к матрице или изменения длины праймера на 3-6 нуклеотидов. В общей сложности для синтеза гибридного гена длиной 1623 п.н. было использовано 59 праймеров. Синтезированные фрагменты по 300 п.н. выделяли с помощью гель-электрофореза и клонировали в плазмидный вектор pGEM-T Easy. Клонирование осуществляли с использованием рестрикционных сайтов KpnI, SacII, EcoRV, BamHI или посредством "тупых" концов. После секвенирования фрагменты амплифицировали, после чего соединяли в нуклеотидную последовательность гибридного белка путем их сплавления методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). После заключительного этапа синтеза гибридного гена путем лигирования фрагментов искусственный ген клонировали в вектор pGEM-T по рестрикционным сайтам KpnI и SacI. Полученный ген был фланкирован дополнительными рестрикционными сайтами EcoRI на 5'-конце и XhoI на 3'-конце. Далее искусственный ген переклонировали в экспрессионный вектор pET24a по рестрикционным сайтам EcoRI и XhoI.

Пример 3. Создание плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок.

По методике, описанной в примере 2, получили нуклеотидную последовательность гибридного белка для создания вакцины от пневмонии.

Клонировали полученный ген в плазмиде pET24a для последующей экспрессии. Для этого провели реакцию лигирования гена и вектора pET24a, с использованием соответствующего буфера и лигазы. Реакцию проводили при +20°C в течение 2 ч.

Смесь прогрели при +95°C в течение 10 мин и очистили от солей диализом на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,025 мкм (Millipore, США). Диализ провели против раствора, содержащего 0,5 мМ ЭДТА в 10% глицерине, в течение 10 мин.

Пример 4. Создание штамма E.coli для амплификации плазмидной ДНК, содержащей гибридный ген.

По методике, описанной в примере 3, получили нуклеотидную последовательность белка для создания вакцины от пневмонии и клонировали ее в плазмиде pET24a. Полученной плазмидой были трансформированы клетки E.coli штамма DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)769 galU galKλ- rpsL nupG методом электропорации.

После трансформации клетки инкубировали в SOC-среде (2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 20 мМ глюкоза) в течение 40 мин при +37°C.

С помощью скрининга клеток E.coli на наличие плазмид на селективной среде, содержащей LB-агар, 100 мкг/мл ампициллина, отобрали колонии клеток E.coli - штамм E.coli для амплификации плазмидной ДНК, содержащей гибридный ген.

Из выросших клонов была выделена плазмидная ДНК с использованием набора Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega, США).

Очищенная плазмидная ДНК была проверена с помощью рестрикционного анализа и секвенирования. В ходе работы были отобраны клоны, содержащие фрагменты ДНК требуемого размера в составе плазмиды, из которых такие плазмиды были выделены для дальнейшей индукции экспрессии гена.

Пример 5. Создание штамма E.coli - продуцента гибридного белка.

По методике, описанной в примере 4, получили нуклеотидную последовательность белка для создания вакцины от пневмонии и клонировали ее в плазмиде pET24a, амплифицировали полученную плазмиду в клетках E.coli штамма DH10B/R с последующим ее выделением.

Для экспрессии белка использовали клетки E.coli штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), содержащие в геноме λDe3 лизоген и мутацию rne131. Мутированный ген rne (rne131) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. lon- и ompT-мутации по генам протеаз позволяют получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах.

Подготовили клетки E.coli штамма BL 21 с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в течение ночи в 5 мл L-бульона, содержащего 1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый. Развели культуру свежим L-бульоном в 50-100 раз и вырастили на качалке при +37°C до оптической плотности 0,2-0,3 при длине волны 590 нм. При достижении оптической плотности более 0,3 культуру развели свежим L-бульоном до оптической плотности 0,1 и растили 30 мин. Перенесли 100 мл культуры в стерильную центрифужную пробирку и осадили клетки при +4°C на 5000g в течение 10 мин. Супернатант слили, клетки ресуспендировали в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедура отмывки повторялась трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировали в малом объеме деионизованной воды и центрифугировали 30 с при 5000 об/мин, на микроцентрифуге.

Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Для этого 1 мкл плазмидной ДНК добавляли к 12 мкл компетентных клеток, перемешивали и проводили электропорацию на генераторе высоковольтных импульсов ГВИ-1 (СПБГТУ, Санкт-Петербург) в стерильных ячейках при

электрическом импульсе напряженностью 10 кВ/см длительностью 4 мс.

После трансформации клетки инкубировали в SOC-среде (2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 20 мМ глюкоза) в течение 40 мин при +37°C. 10-100 мкл клеточной суспензии высевались на селективную LB-среду (Gibco BRL, США), содержащую ампициллин (100 мкг/мл), для отбора клонов, содержащих плазмиды (штаммов-продуцентов).

Полученная после трансформации компетентных клеток штаммов *E.coli* плаزمида обеспечивает высокий уровень биосинтеза рекомбинантного белка, закодированного в ней.

Пример 6. Получение гибридного белка для создания вакцины от пневмонии в клетках *E.coli* индукцией синтеза белка 0,2% лактозой по методу Штудиера.

По методике, описанной в примере 5, получили нуклеотидную последовательность гибридного белка для создания вакцины от пневмонии и клонировали ее в плазмиде pET24a, амплифицировали полученную плазмиду в клетках *E.coli* штамма DH10B/R с последующим ее выделением, трансформировали ею клетки *E.coli* штамма BL21 для последующей индукции экспрессии целевого гена.

Для культивирования полученных штаммов-продуцентов использовалась стандартная агаризованная LB-среда, содержащая ампициллин в концентрации 100 мкг/мл и глюкозу в концентрации 1% для блокирования неспецифической экспрессии.

Индукция экспрессии проводилась при достижении культурой клеток оптической плотности 0,6-0,8 оптических единиц при длине волны 600 нм.

В качестве индуктора использовалась 0,2% лактоза (Studier, 2005).

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудиера (Studier, 2005) использовалась среда PYP-5052, состоящая из 1% пептона (Gibco, США), 0,5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,5% глицерола, 0,05% глюкозы и 0,2% лактозы.

В среду PYP-5052, содержащую ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, была инокулирована единичная колония штамма-продуцента. Ферментация проводилась при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об/мин в течение 20 ч до отсутствия существенного изменения ОП<sub>600</sub> за 1 ч. Отбиралась аликвота клеток на анализ экспрессии гена, кодирующего вакцинный белок, методом электрофореза в ПААГ, а оставшуюся биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.

Белок выделяли из клеток *E.coli* посредством лизиса клеток. Клетки ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 7,5, 5 мМ ЭДТА и 1 мМ феноксиметилсульфонилфторид, из расчета на 1 г клеток 5-7 мл буфера. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком 7 раз по 30 с с интервалом в 30 с (частота ультразвука составляет 22 кГц). Лизат центрифугировали 10 мин при +4°C, 5000 g. Надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли раствор 1М мочевины из расчета 10 мл на 1 г клеток, интенсивно перемешивали. Повторяли центрифугирование. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в растворе 2М мочевины того же объема. Повторяли центрифугирование. Супернатант сливали.

Полученный препарат содержал по данным SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium dodecyl sulfate) около 97% гибридного белка в концентрации 1 мг/мл.

Условия выделения и очистки подбирались экспериментальным путем и могут варьировать в известных среднему специалисту в этой области значениях.

Пример 7. Протективное действие вакцины на основе гибридного белка, содержащего PspA, Spr1895, PsaA, FliCdomain1, FliCdomain2, на профилактической модели летальной инфекции *S.pneumoniae*.

Для определения протективного действия препарата гибридного белка использовали мышей.

Опытная и контрольная группы содержали по 30 мышей линии Balb/c (самки), 7-8 недель (массой 18-20 г), каждая. Гибридный белок вводили в количестве 10 мкг на мышью. Через 1 месяц заражали вакцинированных мышей пневмококковой инфекцией: вводили внутрибрюшинно 10<sup>4</sup> КОЕ (колониеобразующих единиц) *S.pneumoniae* (это минимальная летальная доза для мыши). Наблюдали выживаемость таких мышей в течение 14 дней после введения летальной дозы пневмококка (фиг. 3).

Иммунизированные вакциной на основе рекомбинантного гибридного белка мыши показали выживаемость 80% через неделю после заражения и 68% на 14-й день наблюдений. В контрольной группе выживаемость составила 0% уже на 5-й день эксперимента.

Таким образом, препарат предлагаемой вакцины обладает протективным действием. Кроме того, исследуемая доза препарата вакцины (10 мкг/мышью) не оказывает токсического действия на мышей.

Пример 8. Протективное действие вакцины на основе гибридного белка, содержащего PspA, Spr1895, PsaA, FliCdomain1, FliCdomain2, на терапевтической модели летальной инфекции *S.pneumoniae*.

Опытная и контрольная группы содержали по 30 мышей линии Balb/c (самки), 7-8 недель (массой 18-20г), каждая. Мышей заражали пневмококковой инфекцией: вводили внутрибрюшинно 10<sup>4</sup> КОЕ (колониеобразующих единиц) *S.pneumoniae* (это минимальная летальная доза для мыши). В этот же день мышам вводили гибридный белок в количестве 10 мкг на мышью. Наблюдали выживаемость таких мышей в течение 14 дней после введения летальной дозы пневмококка.

При совместном введении пневмококка и вакцины на основе гибридного белка мыши показали выживаемость 76% через неделю после заражения и 65% на 14-й день наблюдений. В контрольной группе

выживаемость составила 0% уже на 6-й день эксперимента. Такие результаты доказывают хорошую иммуногенность вакцины, предлагаемой в данном изобретении. Таким образом, вакцина может использоваться для терапии пневмококковой инфекции.

**Вакцина против пневмонии, вызываемой *Streptococcus pneumoniae*,  
на основе гибридного белка**

**Перечень последовательностей**

<110> Общество с ограниченной ответственностью «Эпитоп» (ООО «Эпитоп»)  
 <120> Вакцина против пневмонии, вызываемой *Streptococcus pneumoniae*,  
 на основе гибридного белка  
 <140>  
 <141>  
 <150> RU 2012126328  
 <151> 2012-06-22  
 <160> 1  
 <210> SEQ ID NO:1  
 <211> 536  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> домен  
 <222> с 1 по 169 аминокислотный остаток  
 <223> домен FliC 1, с 1 по 169 аминокислотный остаток gb|AAB33952.1|  
 flagellin {alternatively spliced} [*Salmonella typhimurium*]  
 <220>  
 <221> домен  
 <222> с 182 по 276 аминокислотный остаток  
 <223> домен FliC 2, с 311 по 405 аминокислотный остаток gb|AAB33952.1|  
 flagellin {alternatively spliced} [*Salmonella typhimurium*]  
 <220>  
 <221> домен  
 <222> с 281 по 386 аминокислотный остаток  
 <223> эпитоп PspA, с 160 по 262 аминокислотный остаток gb|EHD89266.1|  
 pneumococcal surface protein A [*Streptococcus pneumoniae*]  
 <220>  
 <221> домен  
 <222> с 391 по 458 аминокислотный остаток  
 <223> эпитоп Spr1895, с 94 по 161 аминокислотный остаток  
 ref|ZP\_01836139.1| LysM domain protein [*Streptococcus pneumoniae*]  
 <220>  
 <221> домен  
 <222> с 466 по 536 аминокислотный остаток  
 <223> эпитоп PsaA, с 238 по 309 аминокислотный остаток gb|AAF70667.1|  
 PsaA [*Streptococcus pneumoniae*]  
 <400> 1

```

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1           5           10          15
Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
          20          25          30
Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
          35          40          45
Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
          50          55          60
Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
          65          70          75          80
Leu Asn Glu Ile Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
          85          90          95

```

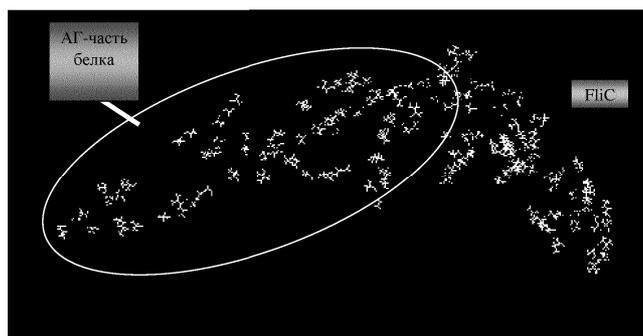
Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln  
 100 105 110  
 Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln  
 115 120 125  
 Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr  
 130 135 140  
 Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 165 170 175  
 Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys  
 180 185 190  
 Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly  
 195 200 205  
 Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr  
 210 215 220  
 Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala  
 245 250 255  
 Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu  
 260 265 270  
 Ser Leu Leu Arg Gly Gly Gly Ser Ala Met Ala Asp Leu Lys Lys Ala  
 275 280 285  
 Val Asn Glu Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala  
 290 295 300  
 Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro  
 305 310 315 320  
 Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Ser Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu  
 325 330 335  
 Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln  
 340 345 350  
 Gln Pro Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Val Pro Lys Pro  
 355 360 365  
 Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Thr Gly Trp Gly Gln Glu Asn Gly  
 370 375 380  
 Met Trp Gly Gly Gly Ser Asn Glu Ala Glu Glu Val Thr Glu Val Glu  
 385 390 395 400  
 Ile Gln Thr Pro Gln Ala Asp Ser Ser Glu Glu Val Thr Thr Ala Thr  
 405 410 415  
 Ala Asp Leu Thr Thr Asn Gln Val Thr Val Asp Asp Gln Thr Val Gln  
 420 425 430  
 Val Ala Asp Leu Ser Gln Pro Ile Ala Glu Ala Pro Lys Glu Val Ala  
 435 440 445  
 Ser Ser Ser Glu Val Thr Lys Thr Val Ile Gly Gly Gly Gly Ser Ser  
 450 455 460  
 Ser Leu Val Glu Lys Leu Arg Gln Thr Lys Thr Pro Ser Leu Phe Val  
 465 470 475 480  
 Glu Ser Ser Val Asp Asp Arg Pro Met Lys Thr Val Ser Gln Asp Thr  
 485 490 495  
 Asn Ile Pro Ile Tyr Ala Gln Ile Phe Thr Asp Ser Ile Ala Glu Gln  
 500 505 510  
 Gly Lys Glu Gly Asp Ser Tyr Tyr Asn Met Met Lys Tyr Asn Leu Asp  
 515 520 525  
 Lys Ile Ala Glu Gly Leu Ala Lys  
 530 535

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

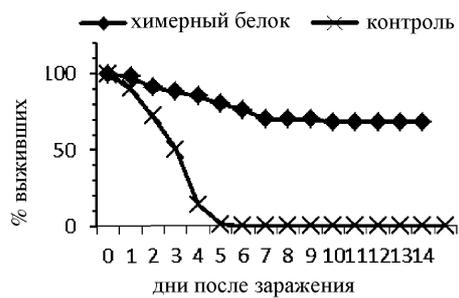
Вакцина против пневмонии, вызываемой *Streptococcus pneumoniae*, содержащая гибридный белок, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, включающий фрагменты белков *Streptococcus pneumoniae* PspA, Spr1895 и PsaA, а также компоненты флагеллина в качестве адьюванта, соединенные гибкими мостиками.



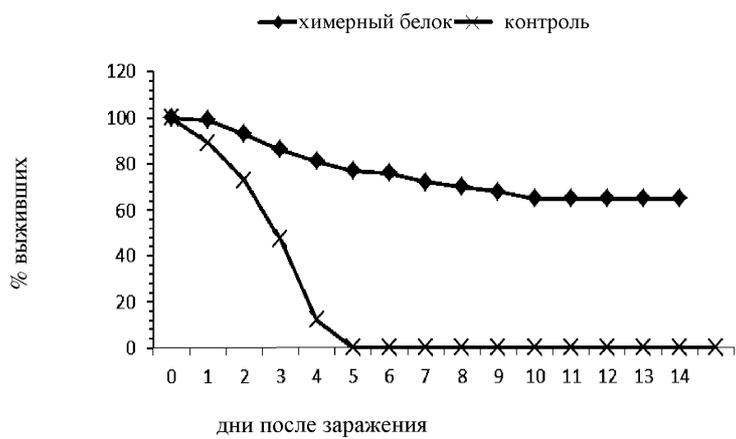
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4