



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.17

(21) Номер заявки
201500054

(22) Дата подачи заявки
2013.06.24

(51) Int. Cl. **A61K 39/09** (2006.01)

**(54) ОСЛАБЛЕННЫЙ ШТАММ STREPTOCOCCUS SUIIS, ИНДУЦИРУЮЩИЙ
ИММУННЫЙ ОТВЕТ У СВИНЕЙ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **61/664,935**

(32) **2012.06.27**

(33) **US**

(43) **2015.06.30**

(86) **PCT/US2013/047282**

(87) **WO 2014/004361 2014.01.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ЭНИМАЛ ХЕЛТ ЮЭСЭЙ ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Бей Рассел Ф., Лоренс Полрадж
Кирубакаран, Саймонсон Рэнди Р.,
Сириджиредди Камеш Редди,
МакКиоун Дэниель А. (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) FITTIPALDI ET AL.: "Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic Streptococcus suis mutant as a live attenuated vaccine in swine", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 25, no. 18, 17 April 2007 (2007-04-17), pages 3524-3535, XP022032559, ISSN: 0264-410X, DOI:10.1016/J.VACCINE.2007.01.084 Abstract; page 3528, right-hand column; table 7

KOCK C. ET AL.: "Intranasal immunization with a live Streptococcus suis isogenic of mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ELSEVIER BV,

AMSTERDAM, NL, vol. 132, no. 2-4, 15 December 2009 (2009-12-15), pages 135-145, XP026763851, ISSN: 0165-2427, DOI:10.1016/J.VETIMM.2009.05.009 [retrieved on 2009-05-18] Abstract * Discussion

US-A1-2001009668

DATABASE WPI Week 201246 Thomson Scientific, London, GB; AN 2012-F06428 XP002712926, & KR 2012 0039113 A (SNU R&DB FOUND) 25 April 2012 (2012-04-25) abstract

HAESEBROUCK F. ET AL.: "Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect?" VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 100, no. 3-4, 3 June 2004 (2004-06-03), pages 255-268, XP002507758, ISSN: 0378-1135, DOI:10.1016/J.VETMIC.2004.03.002 Abstract * Discussion; page 261 - page 262

DATABASE UniProt [Online] 25 January 2012 (2012-01-25), "RecName: Full=30S ribosomal protein S12", XP002712927, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:G7S294 Database accession no. G7S294 abstract; sequence

DATABASE UniProt [Online] 1 September 2009 (2009-09-01), "SubName: Full=ABC transporter ATP-binding membrane protein; Flags: Precursor", XP002712928, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:C5VVX4 Database accession no. C5VVX4 abstract; sequence

DATABASE UniProt [Online] 5 April 2011 (2011-04-05), "SubName: Full=Transcriptional regulator", XP002712929, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:E8UQ69 Database accession no. E8UQ69 abstract; sequence

(57) В соответствии с данным изобретением предлагаются ослабленные штаммы Streptococcus suis, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие мутантные белки *grsL-S12*, *ABC-ATPBMP* и *marR*, которые вызывают у свиней иммунный ответ, направленный против *S. suis*, применение указанных штаммов для индукции у свиней иммунного ответа, направленного против *S. suis*, и для лечения заболеваний, вызываемых *S. suis*, а также композиции, содержащие указанные штаммы.

Отсылки к родственным заявкам

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США серийный номер 61/664935, поданной 27 июня 2012 г., содержание которой целиком включается в настоящий документ путем отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится в широком смысле к вакцинам на основе ослабленных бактерий, в частности к тем, которые обеспечивают безопасную и эффективную полиспецифичную защиту свиней от инфекций/заболеваний, вызываемых *Streptococcus suis*. Данное изобретение также относится к способам получения ослабленных бактерий и идентификации вариантов нуклеотидных последовательностей, связанных с пониженной вирулентностью ослабленных бактерий.

В соответствии с этим данное изобретение относится также к иммуногенным или вакцинным композициям, содержащим бактерии по данному изобретению, например живые ослабленные бактерии. В этих композициях бактерии также могут быть инактивированными, но предпочтительны живые ослабленные бактерии *S. suis*. Данное изобретение также относится к способам получения и/или составления таких композиций; например к способам культивирования, или выращивания, или размножения бактерий на или в подходящей среде, сбора бактерий, при необходимости инактивирования бактерий, при необходимости смешивания бактерий с подходящими фармацевтически или ветеринарно приемлемыми носителями, разбавителями, средствами доставки и/или иными эксципиентами и/или адъювантами и/или стабилизирующими агентами. Таким образом, данное изобретение относится также к применению указанных бактерий при составлении таких композиций.

Уровень техники

Streptococcus suis - это грамположительные шаровидные бактерии (кокки), поселяющиеся обычно в организме у свиней. Но если взрослые свиньи являются бессимптомными носителями, то у поросят этот микроорганизм может вызывать менингит со смертельным исходом, септический артрит и бронхопневмонию. У взрослых особей *S. suis* обычно живут как комменсалы на криптах небных миндалин и в верхних отделах дыхательных путей, хотя этих бактерий выделяли также из желудочно-кишечного тракта и половых путей. Почти все взрослые свиньи служат резервуаром *S. suis*, и этот патогенный агент приносит ущерб свиноводству во всем мире.

Не только свиньи могут быть заражены *S. suis*: эти бактерии обитают также у многих видов млекопитающих и птиц [Gottschalk et al., 2007]. Также *S. suis* является важным возбудителем зоонозов [Perch et al., 1968], но у людей в Северной Америке и в Европе инфекция *S. suis* встречается редко. Большинство случаев заражения человека *S. suis* связаны с профессиональной деятельностью, предполагающей контакт со свиньями, свиной и продуктами из нее. Однако в Юго-Восточной Азии и в Китае инфекция *S. suis* у людей распространена гораздо больше. Наиболее частым проявлением этой инфекции у человека является менингит, а также иногда бывают септицемия и эндокардит.

Из 33 известных на сегодняшний день серотипов *S. suis* с двумя чаще всего ассоциированы менингит и артрит у свиней североамериканского и европейского происхождения [Fittipaldi et al., 2009; Higgins and Gottschalk, 2006]. Вирулентность *S. suis* определяется различными факторами, в том числе: капсулой; белками, связывающими фибронектин/фибриноген; фактором, подобным ОРА-протеину (белку мутности сыворотки); модификациями липотейхоевых кислот и пептидогликана клеточной стенки [Baums et al., 2006; Chabot-Roy et al., 2006; de Greeff et al., 2002; Fittipaldi et al., 2008a, b; Smith et al., 1999]. Кроме того, общие для различных штаммов одного и того же серотипа факторы вирулентности значительно варьируют [Berthelot-Herault et al., 2005; Quessy et al., 1995; Vecht et al., 1992]. Фенотипические маркеры вирулентности *S. suis* включают фактор гемолиза, суилизин (кодируемый геном *sly*), высвобождающий мурамидазу белок, содержащий мотив LPXTG (MRP, 136 кДа, кодируется геном *mrp*), и секретируемый белковый внеклеточный фактор (EF, 110 кДа, кодируется геном *erf*). Среди евразийских штаммов *S. suis* имеется значительная положительная корреляция между присутствием этих белковых факторов вирулентности и фенотипами вирулентности [Gottschalk et al., 2007; Vecht et al., 1991]. В Европе и Азии штаммы серотипа 2 MRP⁺EF⁺SLY⁺ выделяются в основном у больных свиней с выраженными клиническими симптомами, в то время как штаммы MRPEFSLY⁻ часто выделяют у здоровых особей [Allgaier et al., 2001; Vecht et al., 1992].

На роль компонентов вакцины изучались цельные клетки и многие белки *S. suis*. Иммунизация бактериями дикого типа полностью защищает от заражения гомологичным серотипом, а мутантные бактерии без капсулы не создают защиты [Wisselink et al., 2002]. В одном из исследований (Li et al.) рекомбинантный белок поверхности *S. suis* (SAO) в сочетании с адъювантом Quil A (частично очищенным сапонином) защищал свиней от заболевания, вызываемого *S. suis* серотипа 2. Иммунизация путем внутримышечного введения SAO вызвала значительный гуморальный иммунный ответ, но антитела были представлены преимущественно IgG2. Иммунизация рекомбинантным SAO также вызвала образование антител, опосредующих опсонофагоцитоз [Li et al., 2007]. Иммунизация поросят очищенным суилизином из штамма P1/7 *S. suis* (серотип 2) вызвала повышение титра нейтрализующих антител, откуда следует, что SLY может функционировать как защитный антиген [Jacobs et al., 1996]. Однако ни в одном из этих исследований для заражения свиней, вакцинированных указанными антигенами, не использовались гете-

рологичные серотипы. В исследовании, проведенном Баумсом с коллегами [Baums et al.], бактерии *S. suis* серотипа 2 вызывали протективный иммунитет против заражения гомологичными микроорганизмами. Напротив, эффективность защиты, создаваемой субъединичной вакциной на основе белков, ассоциированных с муреином (MAP), была низкой, хотя иммунизация MAP приводила к высоким титрам IgG2, направленных против MRP и SAO, в сыворотке. Важно, что иммунизация именно бактериями, а не MAP вызывала возрастание титра опсонизирующих антител против штамма серотипа 2, и по величине титры этих антител коррелировали со степенью защиты. Однако сыворотка, взятая у поросят, иммунизированных бактериями, после истощения изогенными мутантами без капсулы не способствовала фагоцитарной функции нейтрофилов, свидетельствуя о том, что антитела, направленные против капсулы, возможно, не важны для опсонофагоцитоза. [Baums et al., 2009]. Также в группе особей, получавших бактерии, или в группе особей, получавших вакцину на основе MAP, индукция опсонизирующих антител против серотипа 9 не выявлялась и степень защиты от штаммов серотипа 9 была низкой.

Ни в одном из исследований, в которых изучалась вакцинация от заражения *S. suis*, не была получена вакцина, обеспечивающая полиспецифичную иммунную защиту от этой инфекции. Кроме того, сведения о точном механизме патогенеза при инфекции *S. suis* на молекулярном уровне отрывочны, отчасти из-за широкого спектра факторов вирулентности у штаммов этих бактерий в пределах серотипа и сложности молекулярных механизмов, участвующих во взаимодействии возбудителя инфекции с организмом-хозяином. Отсутствие эффективной вакцины против инфекции *S. suis* является существенной проблемой в современном свиноводстве. Таким образом, основная задача настоящего описания - предложить безопасную и эффективную вакцину против *S. suis*.

Раскрытие изобретения

Цель данного изобретения - предложить аттенуированные вакцины, а также способы лечения и профилактики инфекции *S. suis*.

Данное изобретение также относится к новым ослабленным штаммам *S. suis*, которые вызывают безопасную и эффективную полиспецифичную иммунную защиту. По сравнению с исходным штаммом *S. suis* ослабленные штаммы могут нести один или более полиморфных нуклеотидов, присутствие которых ассоциировано с пониженной вирулентностью.

Данным изобретением предлагаются мутантные бактерии, несущие мутацию (мутации) в одной или более нуклеотидных последовательностях по сравнению с исходными (дикого типа) бактериями, причем с этими мутациями связана ослабленность мутантных бактерий по сравнению с исходными бактериями, которые несут нуклеотидные последовательности, кодирующие белки дикого типа с аминокислотными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 2, 6 и 10. В одном из конкретных воплощений данного изобретения мутантные бактерии несут нуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO: 3, 7 и 11 и кодирующие пептиды, аминокислотные последовательности которых представлены SEQ ID NO: 4, 8 и 12, причем эти нуклеотидные последовательности обуславливают ослабленность/отсутствие вирулентности у мутантных бактерий по сравнению с вирулентными бактериями дикого типа/исходными. В другом воплощении данного изобретения у мутантных бактерий имеются другие мутации в пептидах, представленных SEQ ID NO: 2, 6 и 10 (т.е. отличные от тех, что имеются в пептидах, представленных SEQ ID NO: 4, 8 и 12), обуславливающие ослабленность мутантных бактерий по сравнению с исходным/дикого типа штаммом.

По одному из конкретных воплощений данного изобретения у предлагаемых штаммов могут быть альтернативные формы генов; в настоящем документе термин "альтернативные формы" определяется как "аллели" в сравнении с исходным штаммом *S. suis*. В одном из воплощений данного изобретения эти альтернативные аллели обуславливают пониженную вирулентность или ослабленность бактерий. В настоящем документе термин "ген" употребляется в широком смысле и охватывает как кодирующие, так и не кодирующие нуклеотидные последовательности, т.е. регуляторные последовательности, расположенные в сторону 3'- и 5'-концов от кодирующей последовательности, промоторы, 3'- и 5'-концевые нетранслируемые области (UTR), интроны и экзоны. В настоящем описании там, где имеется в виду только кодирующая последовательность гена, употребляется термин "кодирующая нуклеотидная последовательность гена" или как синоним "кодирующая последовательность ДНК" (сокращенно CDS).

В одном из конкретных воплощений данного изобретения у ослабленных штаммов имеются один или более полиморфизмов в *gplS12* (белок субъединицы 30S рибосомы), в АТФ-связывающем мембранном белке, ABC-транспортере (сокращенно ABC-АТФВМР) и в регуляторе транскрипции семейства *marR* - во всех трех этих белках или в каких-то из их комбинаций. В одном из воплощений данного изобретения между исходным и ослабленным штаммами имеются по меньшей мере 4 нуклеотидных различия: два однонуклеотидных полиморфизма (SNP) в гене *gplS12* и по одному SNP в генах ABC-АТФВМР и *marR*.

В другом своем аспекте данное изобретение относится к генетически модифицированным штаммам *S. suis*, у которых экспрессия *gplS12*, ABC-АТФВМР и *marR* или всех трех этих белков изменена по сравнению с исходным штаммом *S. suis*, в результате чего генетически модифицированные штаммы отличаются пониженной вирулентностью.

Штаммы по изобретению могут быть получены способом, включающим следующие этапы:

- (a) выращивание исходного штамма *S. suis* в присутствии мутагенного агента;
- (b) посев жизнеспособных клеток на подходящую среду;
- (c) определение вирулентности бактерий каждой колонии путем введения свиньям;
- (d) классификация штамма как ослабленного, если у свиней не наблюдается клинических признаков, ассоциированных с инфекцией исходным штаммом.

В одном из воплощений данного изобретения аттенуированные вакцины содержат также адъювант. Адъювантом может быть любое вещество, усиливающее и/или продлевающее вызываемый вакциной иммунный ответ по сравнению с вакциной без адъюванта. Применительно к описанным в настоящем документе аттенуированным вакцинам, применяемым перорально, особенно подходят адъюванты для мукозальных вакцин, включая хитозаны и их производные.

Штаммы по изобретению могут быть использованы для индуцирования иммунологической (или иммуногенной) реакции или защитного иммунного ответа против *S. suis*, а также для профилактики или лечения инфекции *S. suis*, или патологического состояния (состояний), вызываемых *S. suis*, причем соответствующие способы включают введение ослабленных бактерий или композиций, содержащих ослабленные бактерии, нуждающимся в том животным.

Каждый штамм по изобретению может быть представлен в виде набора, включающего, по меньшей мере, ослабленный штамм *S. suis* и инструкции по его применению.

Упомянутые выше и другие воплощения данного изобретения описываются в приведенном ниже разделе "Осуществление изобретения", или явствуют из него, или охватываются им.

Осуществление изобретения

Данным изобретением предлагаются нуклеотидные последовательности и гены, имеющие отношение к аттенуированию микроорганизмов, например бактерий, например грамположительных бактерий, например *Streptococcus suis* (*S. suis*); продукты (например, белки, антигены, иммуногены, эпитопы), кодируемые этими нуклеотидными последовательностями; способы получения таких нуклеотидных последовательностей, продуктов и микроорганизмов и их применения, например, для получения вакцин или иммуногенных композиций, или для возбуждения иммунологической реакции или иммунного ответа, или в качестве векторов, например экспрессивных векторов для использования *in vitro* или *in vivo*.

В результате вызванных мутаций в нуклеотидных последовательностях и генах микроорганизмов получают новые неожиданные аттенуированные мутанты. Эти мутантные варианты можно использовать для создания высокоиммуногенных композиций или вакцин на основе живых ослабленных бактерий.

Мутантные бактерии можно также использовать в качестве векторов для экспрессии нужных продуктов *in vitro*, а также для воспроизведения или размножения нуклеотидных последовательностей (например, для репликации ДНК) и для экспрессии нужных продуктов *in vivo*.

Идентификация таких мутаций дает возможность установить новые неожиданные нуклеотидные последовательности и гены, а также новые неожиданные генные продукты, кодируемые этими нуклеотидными последовательностями и генами.

Такие генные продукты позволяют получить антигены, иммуногены и эпитопы; можно использовать также изолированные генные продукты.

Изолированные генные продукты, а также их эпитопы можно использовать для получения антител с целью их диагностического применения.

Генные продукты, которые позволяют получить или создать эпитопы, антигены или иммуногены, можно использовать в иммуногенных или иммунологических композициях, а также в вакцинах.

В одном из аспектов данного изобретения предлагаются бактерии, несущие аттенуирующие мутации в нуклеотидных последовательностях или генах, изменяющие, ослабляющие или прекращающие экспрессию и/или биологическую активность полипептидов или белков, кодируемых этими генами, в результате чего снижается вирулентность бактерий.

Для того чтобы мутация повлияла на функцию гена аттенуирующим образом, она не обязательно должна затрагивать его кодирующую последовательность. Такая мутация может быть в нуклеотидных последовательностях, участвующих в регуляции экспрессии данного гена, например в областях, регулирующих инициацию и терминацию транскрипции и трансляции. В их числе промоторы и участки связывания с рибосомой (как правило, эти регуляторные элементы располагаются на расстоянии 60-250 нуклеотидов в сторону 5'-конца от стартового кодона кодирующей последовательности гена; Doree S.M. et al., *J. Bacteriol.* 2001, 183(6): 1983-9; Pandher K. et al., *Infect. Imm.* 1998, 66(12): 5613-9; Chung J.Y. et al., *FEMS Microbiol letters* 1998, 166: 289-296), терминаторы транскрипции (как правило, терминатор располагается на расстоянии до приблизительно 50 нуклеотидов в сторону 3'-конца от стоп-кодона кодирующей последовательности гена; Ward C K et al., *Infect. Imm.* 1998, 66(7): 3326-36). В случае оперона такие регуляторные участки могут располагаться на большем расстоянии в сторону 5'-конца от гена или кодирующей последовательности. К аттенуированию могут приводить и мутации в областях между генами.

Мутации в таких регуляторных последовательностях, ассоциированных с кодирующей последовательностью или геном таким образом, что из-за мутаций в этой нуклеотидной последовательности изменяется, подавляется или прекращается экспрессия и/или биологическая активность полипептида или бел-

ка, кодируемого данным геном и это приводит к снижению вирулентности бактерий, эквивалентных мутациям в самом гене или в кодирующей последовательности, идентифицированным в настоящей работе.

Аттенуирование состоит в снижении или исчезновении патогенности бактерий и в уменьшении степени тяжести обусловленных этими бактериями клинических проявлений или повреждений, а также уменьшается интенсивность клеточного роста бактерий; в итоге ниже вероятность гибели животного (свиньи) из-за бактериальной инфекции.

В частности, данное изобретение включает ослабленные штаммы *S. suis* и содержащие их вакцины, вызывающие у животного иммуногенную реакцию; в частности ослабленные штаммы *S. suis*, вызывающие, индуцирующие или стимулирующие ответную реакцию у свиней.

У ослабленных штаммов *S. suis*, представляющих интерес в контексте данного изобретения, имеются мутации в генах, которые у исходного вирулентного штамма дикого типа имеют отношение к его вирулентности. При практическом осуществлении данного изобретения можно использовать не только штаммы с описанными в настоящем документе мутациями, но и ослабленные штаммы с любым числом мутаций в описанных в настоящем документе генах, имеющих отношение к вирулентности.

В одном из воплощений данного изобретения ослабленные штаммы содержат нуклеотидные последовательности, включающие нуклеотиды, представленные SEQ ID NO: 3, 7 и 11 или их комбинациями. На момент написания настоящего документа не было известно о существовании этих последовательностей в геномах, встречающихся в природе *S. suis* - эти последовательности получали только в результате мутагенеза способами, применявшимися авторами данного изобретения, из исходного вирулентного штамма, у которого гены дикого типа содержали нуклеотиды, представленные SEQ ID NO: 1, 5 и 9.

В другом воплощении данного изобретения ослабленные штаммы *S. suis* несут нуклеиновые кислоты, кодирующие пептиды, аминокислотные последовательности которых представлены SEQ ID NO: 4, 8 и 12 или их комбинациями. В еще одном воплощении данного изобретения штаммы *S. suis* содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие пептиды, в аминокислотных последовательностях которых имеется по меньшей мере одна замена по сравнению с последовательностями, представленными SEQ ID NO: 2, 6, 10 или их комбинациями. В одном из воплощений данного изобретения используются аминокислотные замены, представленные в табл. 1 (для вакцинного штамма).

В еще одном воплощении данного изобретения штаммы *S. suis* несут мутации в тех генах, которые имеют отношение к вирулентности исходного штамма (этот штамм депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером (Patent Deposit Designation) PTA-13269. В результате этих мутаций получен ослабленный штамм с пониженной (по сравнению с исходным вирулентным штаммом) вирулентностью.

В одном из конкретных воплощений данного изобретения ослабленный штамм *S. suis* является штаммом, депонированным в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером (Patent Deposit Designation) PTA-13269.

В другом аспекте данного изобретения новые ослабленные штаммы *S. suis* входят в состав безопасных эффективных вакцин, защищающих от *S. suis* и инфекций/заболеваний, вызываемых *S. suis*.

В одном из воплощений данного изобретения вакцины, защищающие от *S. suis*, содержат также адъювант. В одном из конкретных воплощений данного изобретения адъювант является мукозальным, например, это хитозан, метилированный хитозан, триметилхитозан или их производные или их комбинации.

В одном из воплощений данного изобретения адъювант содержит цельные бактериальные клетки и/или вирусные частицы, включая *H. parasuis*, клостридий, вирус гриппа свиней (SIV), цирковир свиней (PCV), вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), Mannheimia, Pasteurella, Histophilus, Salmonella, Escherichia coli или их сочетания и/или варианты. В нескольких воплощениях данного изобретения адъювант усиливает образование IgM, IgG, IgA и/или их сочетаний у животного.

Термины "антиген" или "иммуноген" в настоящем документе означают вещество, вызывающее у животного-хозяина специфичный иммунный ответ. Антиген может представлять собой целый организм - живой, убитый или ослабленный; составную часть или фрагмент организма; рекомбинантный вектор, содержащий участок, обуславливающий иммуногенные свойства; участок или фрагмент ДНК, способный вызвать иммунный ответ у животного-хозяина; полипептид, эпитоп, гаптен или любое их сочетание. Или же иммуноген или антиген могут представлять собой токсин или антитоксин.

Термины "белок", "пептид", "полипептид" и "фрагмент полипептида" в настоящем документе употребляются как синонимы и относятся к полимерам любой длины, состоящим из остатков аминокислот. Этот полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот, цепочка которых может прерываться другими мономерами, химически отличными от аминокислот. Указанные термины охватывают также полимеры из аминокислот, модифицированные естественным или искусственным образом, например путем образования дисульфидных связей, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или каким-либо иным образом или воздействием, например путем конъюгирования с меткой или биологически активным компонентом.

Термин "иммуногенный или антигенный полипептид" в настоящем документе включает полипеп-

тиды, являющиеся иммунологически активными в том смысле, что, будучи введены в организм-хозяин, они способны вызывать гуморальный и/или клеточный иммунный ответ, направленный против данного белка. Предпочтительно фрагмент белка берется такой, который обладает, по существу, той же иммунологической активностью, что и цельный белок. Таким образом, фрагмент белка по данному изобретению содержит по меньшей мере один эпитоп или одну антигенную детерминанту или состоит (или в основном состоит) по меньшей мере из одного эпитопа или антигенной детерминанты. Термин "иммуногенный" применительно к белку или полипептиду в настоящем документе включает полную аминокислотную последовательность белка, ее аналоги или иммуногенные фрагменты. Под иммуногенным фрагментом подразумевается фрагмент белка, включающий один или более эпитопов и вызывающий иммунологическую реакцию, описанную выше. Такие фрагменты можно идентифицировать, используя любые методы картирования эпитопов, хорошо известные в данной области техники [см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996)]. Например, линейные эпитопы можно определить, синтезировав на твердой подложке параллельно большое число пептидов, соответствующих различным участкам белковой молекулы и воздействуя на эти эпитопы (на подложке) антителами. Такие методы известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 4708871, а также в работах Geysen et al., 1984 и Geysen et al., 1986. Конформационные эпитопы нетрудно идентифицировать, определяя пространственную конформацию аминокислот путем, например, рентгеновской кристаллографии и двумерной спектроскопии ядерного магнитного резонанса (см., например, упомянутую выше работу *Epitope Mapping Protocols*). Методы, применимые к белкам *T. parva*, описаны в заявке PCT/US 2004/02260, которая полностью включается в настоящий документ путем ссылки.

Как говорилось выше, данное изобретение охватывает активные фрагменты и варианты антигенных полипептидов. Таким образом, термин "иммуногенный полипептид" или "антигенный полипептид" также включает делеции, вставки и замены в аминокислотной последовательности, если при них полипептид сохраняет способность вызывать иммунологическую реакцию согласно приведенному в настоящем документе определению. Термин "консервативная замена" в настоящем документе означает, что аминокислотный остаток заменен другим, но биологически близким аминокислотным остатком или что замена нуклеотида в нуклеиновой кислоте такова, что в кодируемой ею аминокислотной последовательности соответствующий аминокислотный остаток не изменяется или заменяется на биологически близкий. В этой связи особенно предпочтительные замены являются в основном консервативными, т.е. аминокислотные замены не выходят за пределы данной группы аминокислот. Обычно аминокислоты подразделяют на четыре группы: (1) кислые (аспарагиновая кислота/аспартат и глутаминовая кислота/глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин); (3) неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и (4) полярные не заряженные (глицин, аспарагин, глутамин, цистин, серин, треонин, тирозин). Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда выделяют как ароматические аминокислоты. Примеры консервативных замен включают замены одного гидрофобного аминокислотного остатка, например изолейцина, валина, лейцина или метионина, на другой гидрофобный остаток, или замену одного полярного аминокислотного остатка на другой полярный, например замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую или глутамин на аспарагин и т.п.; или замены аминокислот на структурно родственные аминокислоты, что не влияет существенно на биологическую активность. Таким образом, в определение исходного (референсного) полипептида входят белки, по существу, с такой же аминокислотной последовательностью, как у исходной (референсной) белковой молекулы, но несущие незначительные замены аминокислот, практически не влияющие на иммуногенность данного белка. В настоящий документ включаются все полипептиды, получаемые в результате таких модификаций. Термин "консервативная замена" также включает использование замещенных аминокислот вместо не замещенных исходных при условии, что антитела, образовавшиеся против полипептида с заменами, иммунологически взаимодействуют также с полипептидом без замен.

Термин "эпитоп" в настоящем документе относится к участку антигена или гаптена, на который реагируют специфические В- и/или Т-клетки. Этот термин употребляется синонимично термину "антигенная детерминанта" или "сайт антигенной детерминанты". Антитела, узнающие один и тот же эпитоп, можно идентифицировать путем несложного иммунологического анализа, демонстрирующего способность антител блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью.

Под иммунологической реакцией на композицию или вакцину понимается развитие клеточного и/или опосредованного антителами иммунного ответа на данную композицию или вакцину. Обычно иммунологическая реакция включает (но не ограничивается перечисленным здесь) один или более из следующих эффектов: образование антител, В-клеток, хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, специфично направленных против антигена/антигенов, входящих в состав данной композиции или вакцины. Предпочтительно в организме-хозяине возникает лечебная или защитная иммунологическая реакция, например возрастает устойчивость к новому заражению и/или снижается тяжесть клинических проявлений заболевания. Такая защита демонстрируется ослаблением или отсутствием обычно развивающихся в зараженном организме симптомов и/или клинических признаков заболевания, более быстрым выздоровлением и/или снижением титра вируса.

Термин "животное" подразумевает млекопитающих, птиц и проч.; в настоящем документе под животным или хозяином понимается млекопитающее или человек. Животное выбирается из группы, состоящей из представителей семейств лошадиных (например, лошади), собачьих (например, волка, лисы, койота, шакала), кошачьих (например, льва, тигра и др. "больших кошек", домашней кошки, диких кошек и др., в том числе гепарда и рыси), полорогих (например, овцы и коровы), нежвачных парнокопытных (например, свиньи), а также класса птиц (например, курицы, утки, гуся, индейки, перепела, фазана, попугаев, представителей семейств воробьиных и соколообразных, вороны, страусов, в том числе эму и казуара), отряда приматов (например, полуобезьян, обезьян Старого и Нового света, долгопятовых, гиббонов, человекообразных обезьян), хорьков, тюленей и рыб. Термин "животное" включает индивида на всех стадиях развития, в том числе новорожденного, эмбриона и плода.

В настоящем документе все технические и научные термины, если не дается иного объяснения, употребляются в том значении, которое общепринято и известно рядовым специалистам в данной области техники. Слова, используемые в единственном числе, также включают и множественное число, если только из контекста не явствует иное. Союз "или" подразумевает также значение "и", если только из контекста не явствует иное.

Отметим, что в настоящем описании и, в частности, в формуле изобретения и/или в основном тексте глагол "содержать" и его производные ("содержащий" и проч.) имеет значение, соответствующее патентному законодательству США; например, он может означать "включать". Выражение "состоять в основном из" и его производные ("состоящий в основном из" и проч.) имеет значение, соответствующее патентному законодательству США; например, оно может подразумевать содержание элементов, не названных буквально и явно, но исключать элементы, уже известные в данной области техники или влияющие на принципиальные или новые признаки данного изобретения.

Композиции.

Данное изобретение относится к вакцинам или композициям для защиты от *S. suis*, которые могут содержать ослабленный штамм *S. suis* и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, средство доставки или иной эксципиент и которые вызывают, индуцируют или стимулируют ответную реакцию у животного.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" в настоящем документе относятся к молекулам рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) - не разветвленным или разветвленным, одноцепочечным или двухцепочечным или их гибридам. Этот термин также охватывает гибриды РНК/ДНК. Приведем примеры полинуклеотидов, не имеющих ограничительного характера: гены или фрагменты генов, экзоны, интроны, матричные РНК (мРНК), транспортные РНК (тРНК), рибосомные РНК (рРНК), рибозимы, комплементарные ДНК (кДНК), рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированные ДНК с любой нуклеотидной последовательностью, изолированные РНК с любой нуклеотидной последовательностью, ДНК- или РНК-зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, например метилированные нуклеотиды, и аналоги нуклеотидов, урацил, другие сахара (не рибозу и не дезоксирибозу) и связующие группы, например фторрибозу и тиолаты, разветвления нуклеотидной цепи.

Последовательность нуклеотидов также может быть модифицирована после полимеризации, например, путем конъюгации с компонентом-меткой. Это определение включает и другие модификации: экзипирование, замену одного или более встречающихся в природе нуклеотидов на аналоги, введение в нуклеотидную цепь средств для присоединения полинуклеотида к белкам, ионам металлов, компонентам-меткам, другим полинуклеотидам или твердой подложке. Полинуклеотиды могут быть получены из микроорганизмов или путем химического синтеза.

Термин "ген" в настоящем документе употребляется в широком смысле применительно к любому отрезку полинуклеотида, ассоциированному с какой-либо биологической функцией. Таким образом, термин "ген" включает интроны и экзоны (как в случае геномной нуклеотидной последовательности) или только кодирующие последовательности (как в случае кДНК) и/или регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии. Например, термин "ген" относится также к фрагментам нуклеиновых кислот, по которым образуется мРНК или функциональная РНК или которые кодируют определенный белок и включают регуляторные последовательности.

Определение "изолированный" применительно к биологическому компоненту (например, к нуклеиновой кислоте, или к белку, или к органелле) означает, что данный компонент в основном отделен или очищен от других биологических компонентов клеток организма, у которого данный компонент имеется в природе, например от остальной хромосомной ДНК и внехромосомных ДНК и РНК, белков и органелл. Изолированные нуклеиновые кислоты и белки включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные путем стандартных методов очистки. Изолированными считаются также нуклеиновые кислоты и белки, полученные рекомбинантным путем или путем химического синтеза.

Термин "консервативная замена" в настоящем документе означает, что аминокислотный остаток заменен другим, но биологически близким аминокислотным остатком или что замена нуклеотида в нуклеиновой кислоте такова, что в кодируемой ею аминокислотной последовательности соответствующий аминокислотный остаток не изменяется или заменяется на биологически близкий. В этой связи особенно

предпочтительные замены являются в основном консервативными, как говорилось выше.

Термин "рекомбинантный" применительно к полинуклеотиду означает, что он имеет полусинтетическое или синтетическое происхождение и не встречается в природе как таковой либо связан с другим полинуклеотидом в структуре, не встречающуюся в природе.

Термин "гетерологичный" означает, что данный объект происходит из структуры более высокого уровня (например, организма), генетически отличной от той, с которой проводится сравнение. Например, методами генетической инженерии полинуклеотид можно встроить в плазмиду или вектор, происходящий из иного источника - тогда этот полинуклеотид является гетерологичным. Или, скажем, промотор, взятый отдельно от той кодирующей последовательности, которую он регулирует в природе, и функционально связанный с другой, не естественной для него кодирующей последовательностью, является гетерологичным.

Полинуклеотиды по данному изобретению могут содержать дополнительные нуклеотидные последовательности, например дополнительные кодирующие последовательности, в пределах одной и той же транскрипционной единицы; регуляторные элементы, например промоторы, сайты связывания с рибосомой, 5'- и 3'-нетранслируемые области; терминаторы транскрипции; сайты полиаденилирования; дополнительные транскрипционные единицы, управляемые тем же или другим промотором; последовательности, обеспечивающие клонирование, экспрессию, гомологичную рекомбинацию и трансформацию клетки-хозяина; и любые конструкции, нужные для воплощений данного изобретения.

Способы применения и изделие.

Штаммы по изобретению применяют путем вакцинации животного (свиньи) путем введения композиции, в состав которой входит ослабленный штамм *S. suis* и фармацевтически или ветеринарно приемлемые носитель, средство доставки или иной эксципиент.

В одном из воплощений данного изобретения может применяться режим вакцинации "прайм-буст"; при этом делают по меньшей мере одно первичное введение (прайм) и по меньшей мере одну повторную иммунизацию (буст) с использованием по меньшей мере одного общего полипептида, антигена, эпитопа или иммуногенного агента. Обычно иммунологическая композиция или вакцина, используемая для первичного введения, отличается от тех, что используются для повторной иммунизации. Однако следует отметить, что и для первичного введения, и для повторной иммунизации можно использовать одну и ту же композицию. Такой режим введения вакцины называется "прайм-буст".

Режим "прайм-буст" включает по меньшей мере одно первичное введение и по меньшей мере одну повторную иммунизацию с использованием по меньшей мере одного общего полипептида и/или его фрагментов или вариантов. Вакцина, используемая для первичного введения, может отличаться от тех, что используются позже для повторной иммунизации. Первичное введение может осуществляться однократно или в несколько приемов. Также и повторная иммунизация может осуществляться однократно или в несколько приемов.

Объем дозы композиций на основе бактериальных антигенов для млекопитающих, например в случае свиней (молодых или взрослых особей), обычно составляет от около 0,1 до около 2,0 мл, от около 0,1 до около 1,0 мл или от около 0,5 до около 1,0 мл.

Эффективность вакцин проверяют через около 2-4 недель после последней иммунизации, заражая животных (например, свиней) вирулентным штаммом *S. suis*. Для заражения с целью проверки эффективности вакцины используют как гомологичные, так и гетерологичные штаммы *S. suis*. Заражение животного осуществляется путем внутримышечной или подкожной инъекции, с помощью спрея, интраназально, внутрь глаза, интратрахеально и/или перорально. До и после заражения у животного берут образцы ткани из суставов, легких, головного мозга и/или полости рта; в этих образцах определяют присутствие антител, специфичных в отношении *S. suis*.

Композиции, содержащие ослабленные штаммы бактерий по данному изобретению и используемые для вакцинации в режиме "прайм-буст", содержатся в фармацевтически или ветеринарно приемлемом средстве доставки, разбавителе или ином эксципиенте. Вакцинация в соответствии с протоколами по данному изобретению защищает животных от *S. suis* и/или предотвращает развитие заболевания у зараженных особей.

Процедуры иммунизации совершаются предпочтительно с интервалом от 1 до 6 недель. Предпочтительная продолжительность промежутка времени между двумя иммунизациями 3-5 недель, оптимальная по одному из воплощений данного изобретения - 4 недели; возможна также ежегодная иммунизация. На момент первой процедуры возраст иммунизируемого животного, например свиньи, может быть по меньшей мере 3-4 недели.

Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что настоящее описание предлагается в качестве примера и данное изобретение им не ограничивается. Основываясь на представленных в настоящем документе и известных в данной области техники сведениях опытный специалист может для каждого протокола определить нужные число процедур иммунизации, путь введения иммунизирующего препарата и дозировку без излишнего экспериментирования.

Штаммы по изобретению могут быть использованы в виде набора для вызова или индукции у животного (свиньи) иммунологической или защитной реакции, направленной против *S. suis*, который вклю-

чает иммунологическую композицию или вакцину на основе ослабленных *S. suis* и инструкции для осуществления способа доставки ее эффективного количества для возбуждения иммунного ответа у животного.

В другом воплощении данного изобретения набор для индукции у животного (свины) иммунологической или защитной реакции, направленной против *S. suis*, включает иммунологическую композицию или вакцину, содержащую ослабленный штамм *S. suis* по данному изобретению, и инструкции для осуществления способа доставки ее эффективного количества для возбуждения иммунного ответа у животного.

В еще одном своем аспекте набор предназначен для вакцинации в режиме "прайм-буст" по данному изобретению, как описано выше. Этот набор может содержать по меньшей мере две емкости: первая содержит вакцину или композицию для первичной иммунизации по данному изобретению, а вторая - вакцину или композицию для повторной иммунизации по данному изобретению. Этот набор предпочтительно содержит дополнительные емкости (как первая или как вторая) для дополнительной первичной иммунизации или для дополнительной повторной иммунизации.

Фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители или средства доставки или иные эксципиенты хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или средство доставки или иной эксципиент может представлять собой 0,9%-ный раствор NaCl (например, физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор. Другие фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители или средства доставки или иные эксципиенты, которые можно использовать в способах по данному изобретению, включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) поли-(L-глутамат) или поливинилпирролидон. Фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или средство доставки или иной эксципиент может представлять собой любое вещество или комбинацию веществ, способствующие введению вектора (или белка, экспрессию которого обеспечивает вектор по данному изобретению *in vitro*), предпочтительно, чтобы носитель, средство доставки или иной эксципиент способствовал трансфекции и/или улучшал сохранность вектора (или соответствующего белка). Дозы и объемы, в которых они вводятся, в настоящем документе обсуждаются в общем описании, а также специалист в данной области техники может их определить на основании этого описания в совокупности с известными сведениями без излишнего экспериментирования.

Иммунологические композиции и вакцины по данному изобретению могут содержать один или более адъювантов или состоять в основном из одного или более адъювантов. Для практического использования по данному изобретению подходят следующие адъюванты: (1) полимеры акриловой или метакриловой кислоты, малеинового ангидрида и алкенильных производных, (2) иммуностимулирующие последовательности (ISS), например олигодезоксирибонуклеотидные последовательности, в которых имеются один или более не метилированных элементов CpG (Klinman et al., 1996; WO 98/16247), (3) эмульсии типа "масло в воде", например эмульсия SPT, описанная на стр. 147 работы "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", опубликованной M. Powell, M. Newman (Plenum Press 1995), и эмульсия MF59, описанная в той же работе на стр.183, (4) катионные липиды, содержащие соли четвертичного аммония, например диметилдидециламмоний (DDA), (5) цитокины, (6) гидроксид алюминия или фосфат алюминия, (7) сапонин или (8) другие адъюванты, обсуждаемые в документах, цитируемых в настоящей заявке и включенных в нее путем отсылки, или (9) любые комбинации или смеси перечисленных веществ.

В одном из воплощений данного изобретения в число адъювантов входят такие, которые способствуют улучшению абсорбции в слизистые оболочки. Примеры этих адъювантов включают монофосфолипид А (MPL), термолабильный токсин *Escherichia coli* LTK63, токсины, микрочастицы полилактидгликолида (PLG) и ряд других (Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627). В одном из воплощений данного изобретения адъювантом может быть хитозан (Van der Lubben et al. 2001; Patel et al., 2005; Majithiya et al., 2008; US Patent Serial No. 5,980.912).

В одном из воплощений данного изобретения адъювантом могут быть инактивированные бактерии, инактивированные вирусы, фракции инактивированных бактерий, бактериальные липополисахариды, бактериальные токсины или их производные или их комбинации.

В одном из воплощений данного изобретения адъювант содержит целые бактерии и/или вирусы, включая *H. parasuis*, клостридий, вирус иммунодефицита свиней (SIV), цирковир свиней (PCV), вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), Mannheimia, Pasteurella, Histophilus, Salmonella, Escherichia coli или их комбинации и/или варианты. В некоторых воплощениях данного изобретения адъювант повышает уровень образования IgM, IgG, IgA и/или их комбинаций.

Литература

1. Allgaier, A., et al. 2001. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. J. Clin. Microbiol. 39, 445-453.

2. Baums, C. G. , et al., 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 74, 6154-6162.
3. Baums, C.G., et al., 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. Clin Vaccine Immunol. 2, 200-208.
4. Berthelot-Herault, F., et al., 2005. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89– 1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. Can. J. Vet. Res. 69, 236-240.
5. Chabot-Roy, G. et al., 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. Microb. Pathog. 41, 21-32.
6. Davidson A.L., et al., 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems". Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72, 317-364.
7. Davidson A.L., Chen J., 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria". Annu. Rev. Biochem 73, 241-268.
8. de Greeff, A., et al., 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. Infect. Immun. 70, 1319-1325.
9. Fittipaldi, N. et al., 2008a. Significant contribution of the pgdA gene to the virulence of *Streptococcus suis*. Mol. Microbiol. 78, 1120-1135.
10. Fittipaldi, N. et al., 2008b. D-Alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 76, 3587-3594.
11. Fittipaldi, N. et al., 2011. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. Emerg Infect Dis. 12, 2239-2244.
12. Gottschalk, M. et al., 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. Anim. Health Res. Rev. 8, 29-45.
13. Henderson D.P., Payne, S.M., 1994. Vibrio cholerae iron transport system: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems". Infect. Immun 62, 5120-5125.
14. Higgins, R., Gottschalk, M., 2006. Streptococcal diseases. In: Straw, B.E., D’Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. Blackwell Publishing, pp. 769-783.
15. Jacobs, A., et al., 1996. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated hemolysin of *Streptococcus suis*. Vet. Rec. 139, 225-228.
16. Li, Y., et al., 2007. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against streptococcus suis infection. Clin. Vaccine Immunol. 14, 937-943.
17. McEvoy, G.K., editor. 1989. AHFS Drug information 89. Bethesda, MD: American

Society of Hospital Pharmacists, 1925-1927.

18. Perch, B., et al., 1968. Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74, 69-76.

19. Poole, R.K., et al., 1994. The *cydD* gene product, component of a heterodimeric ABC transporter, is required for assembly of periplasmic cytochrome-c and of cytochrome-bd in *Escherichia coli*". *FEMS Microbiol. Lett.* 117, 217-224.

20. Poolman, B., et al., 2004. Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions". *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 88-104.

21. Quessy, S., et al., 1995. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infect. Immun.* 63, 1975-1979.

22. Smith, H.E., et al., 1999. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect. Immun.* 67, 1750-1756.

23. Sinha, R.P., 1977. Acriflavine-Resistant Mutant of *Streptococcus cremoris*. *Antimicro and Chemo* 12, 383-389.

24. Vecht, U. et al., 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* 59, 3156-3162.

25. Vecht, U. et al., 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect. Immun.* 60, 550-556.

26. Wisselink, H. J., et al., 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet. Microbiol.* 84, 155-168.

27. Zhou, Z.M., et al., 1998. Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis". *J. Biol. Chem.* 273, 12466-12475.

28. George, A. M., and S. B. Levy. 1983. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J. Bacteriol.* 155:541-548.

Далее данное изобретение описывается с помощью примеров, не имеющих ограничительного характера.

Примеры

Пример 1. Получение и анализ генома ослабленных *S. suis*.

С целью разработки, обеспечивающей полиспецифичную защиту от инфекции *S. suis*, был выделен полевой штамм (исходный штамм, США, Newport Laboratories № 8-1433-1, SEQ ID NO: 9) из мазка свиной ткани мозга. На основании результатов биохимического анализа и реакции агглютинации этот изолят был идентифицирован как *S. suis* серотипа 2.

Для аттенуирования этого исходного штамма использовали химический мутаген (акрифлавина гидрохлорид), как описано в работе Sinha et al. Коротко говоря, делали следующее. Клетки исходного штамма *S. suis* культивировали в течение 18 ч в триптическом соевом бульоне, содержащем 5% овечьей крови и 10 мкМ/мл акрифлавина гидрохлорида. Выжившие клетки отделяли и высевали на агар с овечьей кровью. Были отобраны 20 отдельных колоний и их выращивали по отдельности в той же жидкой среде. Брли одну из этих двадцати культур и вводили свиньям путем инъекции ($1,76 \times 10^9$ клеток/мл), чтобы определить вирулентность. Десяти особям ввели бактерии перорально и наблюдали животных в течение 26 суток. За это время не было замечено клинических признаков, соответствующих инфекции *S. suis*. Помимо того, что мутантный штамм был очень ослабленным, он имел устойчивость к неомицину. Было проведено полное секвенирование всего генома мутантного штамма - кандидата для вакцины (SEQ ID NO: 10) и исходного штамма (SEQ ID NO: 9), также у этих штаммов определили однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), с которыми мог быть связан невирулентный фенотип.

Определение нуклеотидной последовательности.

Для секвенирования геномов исходного и мутантного штаммов получали клеточный осадок культур *S. suis* в экспоненциальной фазе роста и проводили очистку ДНК с помощью набора Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Валенсия, шт. Калифорния, США). Затем получали библиотеку геномной ДНК с помощью набора Illumina Genomic DNA Prep Kit (Illumina, Сан-Диего, шт. Калифорния, США), и проводили кластерную амплификацию, применяя высокопроизводительное секвенирование в режиме одноконцевых чтений с проточной ячейкой (версия 4) [Single End Flow Cell v4] и платформу Illumina (Cluster Generation Station) с плотностью кластеров $\sim 600,000/\text{мм}^2$. Секвенирование осуществляли с помощью геномного анализатора GAI (56 циклов), используя набор реагентов для секвенирования производства Illumina. Полученные последовательности сравнивали с имеющимися в базе данных GenBank последовательностями генома *S. suis*, P1/7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AM946016.1>) (SEQ ID NO: 11) и определяли степень гомологии с известными генами. Сравнивали последовательности исходного и мутантного штаммов на предмет наличия однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в кодирующих областях генов (хотя известно и авторы данного изобретения рассчитывали, что не кодирующие области также могут иметь значение для невирулентного/аттенуированного фенотипа). В результате было выявлено несколько SNP, и те из них, которые приводили к заменам аминокислот (не синонимичным), проверяли далее. Однонуклеотидные полиморфизмы, приводившие к аминокислотным заменам, проверяли путем секвенирования методом Сэнгера по стандартным протоколам.

Прочтения фильтровали по качеству, используя пользовательские скрипты на языке Python. При низком качестве нуклеотиды удаляли с концов прочтения, после чего сохранялись такие, где были по меньшей мере 40 пар нуклеотидов с качеством >20 и внутри не было неоднозначно определяемых нуклеотидов. После этапов конечного удаления и фильтрации прочтения картировали на референсный геном, используя алгоритм Барроуза-Уилера (BWA, версия 0.6.1-r104 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>)). Получаемое в результате выравнивание и карта (SAM) далее анализировали с помощью программы SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) для детекции вариантов. Детектированные варианты далее анализировали, используя пользовательские скрипты, написанные на языке R, причем варианты аннотировались на основании их положения в геноме. Варианты фильтровали также на основании глубины охвата, качества по SAMtools и для вариантов, которые разделялись по происхождению образцов - исходный это штамм или мутантный. Программу SAMtools использовали также для составления консенсусных последовательностей на основании результатов картирования. Эту последовательность аннотируют по референсной последовательности и форматируют в виде файла базы данных Genbank для совместимости с программой Artemis, используя пользовательские скрипты и пакет BioPython (<http://biopython.org/wiki/Biopython>). Сравнение исходного и мутантного (кандидата для вакцины) геномов выявило три однонуклеотидных полиморфизма на протяжении двух генов: 1) два SNP в гене *gpsL* S12 (кодирующем белок рибосомной субъединицы 30S) и 2) один SNP в гене АТФ-связывающего мембранного белка, АВС-транспортера (сокращенно АВС-АТРВМР). Эти три однонуклеотидных полиморфизма были подтверждены путем стандартного секвенирования методом Сэнгера.

Функциональное значение *gpsL*-S12 белка рибосомной субъединицы 30S.

Белки малой (30S) и большой (50S) субъединиц рибосомы, обозначаемые буквами S и L соответственно, являются критически важными элементами клеточного аппарата синтеза белков. Эти белки действуют как сайты связывания многих антибиотиков, и мутации в каком-то одном или более из них радикально влияют на устойчивость или чувствительность к антибиотикам. Мутации, возникшие вследствие однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), в белках малой субъединицы придают устойчивость к таким антибиотикам, как тетрациклин, спектиномицин, гигромицин В и стрептомицин, а мутации в белках большой субъединицы придают устойчивость к хлорамфениколу, эритромицину и степграмину В. Вакцинный штамм *S. suis* устойчив к неомицину (16 мкг/мл) вследствие двух SNP в гене белка S12 малой рибосомной субъединицы, и у этого штамма невирулентный фенотип. У бактерий дикого типа неомицин активно переносится через клеточную мембрану, связывается со специфичным рецепторным белком на 30S-субъединице рибосом и мешает образованию инициаторного комплекса из матричной РНК (мРНК) и рибосомной субъединицы 30S, в результате синтез белков подавляется. ДНК может "считываться" неправильно, и тогда образуются нефункциональные белки, полирибосомы распадаются и не могут осуществлять синтез белков [McEvoy, 1989].

Функциональное значение АТФ-связывающего кассетного транспортного белка. У бактерий АТФ-связывающий кассетный транспортный мембранный белок, называемый АВС-транспортером (сокращенно АВС-АТРВМР) имеет значение для выживания бактериальных клеток и для транспорта факторов вирулентности или связанных с вирулентностью [Davidson et al., 2008; Henderson et al., 1994]. АВС-транспортеры жизненно необходимы бактериям: они действуют как осмопротекторы (защищают от осмотического стресса), опосредуя поглощение растворенных веществ и предотвращая опасное для жизни клетки возрастание осмотического давления [Poolman et al., 2004]. Бактериальные АВС-белки также участвуют в регуляции ряда физиологических процессов. Так, АВС-транспортеры функционируют в выделительной системе бактериальной клетки, доставляя к клеточной поверхности некоторые компоненты (например, полисахариды, входящие в состав капсулы, липополисахариды и тейхоевые кислоты), белки,

участвующие в патогенном действии бактерий (например, в гемолизе, связывании гема, расщеплении белков щелочной протеазой), гем, гидролитические ферменты, белки S-слоя, факторы компетентности, токсины, антибиотики (в том числе пептидные), бактериоцины, лекарственные вещества и сидерофоры [Davidson et al., 2008; Davidson and Chen, 2004]. ABC-транспортеры также играют важную роль в путях биосинтеза, в том числе в биосинтезе внеклеточных полисахаридов и биогенезе цитохромов [Zhou et al., 1998; Poole et al., 1994].

Функциональное значение регулятора транскрипции семейства *marR*. Анализ по базе данных консервативных доменов Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=WWP257HN01N&mode=all>) показывает, что ген *marR* кодирует белок-регулятор транскрипции, содержащий мотив "спираль-поворот-спираль", ассоциированный с множественной устойчивостью к антибиотикам (HTHMARR), в составе оперона *marRAB*. У *Escherichia coli*, *marA* кодирует положительный регулятор устойчивости к антибиотикам, а *marR* кодирует репрессор транскрипции *marRAB* и определяет образование белка *MarA* в ответ на сигналы из окружающей среды (George and Levy, 1983). У описанного в настоящем документе вакцинного штамма SNP располагается в пределах домена HTHMARR (аминокислотные остатки с 30-го по 125-й). Домен "спираль-поворот-спираль" связывается с ДНК и является отличительным признаком белков, регулирующих транскрипцию. Белок *MarR* дикого типа представляет собой димер, каждая субъединица которого содержит ДНК-связывающий мотив типа "крылатая спираль", участвующий в регуляции транскрипции.

Вместе взятые, мутации в этих трех генах (SNP, представленные в табл. 1) делают вакцинный штамм NPL *S. suis* невирулентным и устойчивым к неомицину, а возможно, и к другим антибиотикам.

Таблица 1

Расположение SNP и идентификация мутантных генов у ослабленного штамма *S. suis*

Ген	SNP #	Положение нуклеотида	Исходный штамм	Вакцинный штамм	Аминокислотная замена
<i>gpsL-S12</i>	1	167	A (в SEQ ID NO: 1)	C (в SEQ ID NO: 3)	Лизин→треонин (K-T)
<i>gpsL-S12</i>	2	301	A (в SEQ ID NO: 1)	C (в SEQ ID NO: 3)	Лизин→глутамин (K-Q)
ABC-транспортер ATP bmp	3	323	G (в SEQ ID NO: 5)	A (в SEQ ID NO: 7)	Аргинин→гистидин (R-H)
Регулятор транскрипции <i>marR</i>	4	265	C (в SEQ ID NO: 9)	T (в SEQ ID NO: 11)	Аргинин→цистеин (R-C)

Пример 2. Эффективность аттенуированных вакцин против *S. suis* у свиней.

Общий протокол исследования эффективности.

До и после вакцинации путем титрования определяли число колониеобразующих единиц (КОЕ) на миллилитр каждого разведения вакцины.

Все свиньи, участвовавшие в этом исследовании, были предоставлены компанией Midwest Research Swine (Гиббон, шт. Миннесота, США); на момент поступления все особи были здоровыми и без аномалий. Стадо считалось источником здоровых животных, если в нем никогда не было инфекции *Streptococcus suis* и не выявлялось присутствия вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV). В проведенных ранее исследованиях поросята из стада-источника бывали восприимчивы к заражению *S. suis*. Свиньи поступали в возрасте 17-24 суток. Перед вакцинацией животных обследовали и считали клинически нормальными при отсутствии признаков заболевания, включая кашель, брюшное дыхание и/или хромоту. В этих исследованиях каждая особь являлась экспериментальной единицей и перед поступлением имела метку на ухе. Поступивших животных случайным образом распределяли по помещением для содержания и по экспериментальным группам, используя генератор случайных чисел в Microsoft Excel.

Схема эксперимента.

Всех особей вакцинировали в день 0. В группах животных, получавших вакцину, каждой особи вводили перорально 1 мл соответствующего вакцинного препарата. Контрольным особям давали 1 мл стерильного физиологического раствора, служившего плацебо. Приблизительно через 30-35 суток после вакцинации всех животных заражали и наблюдали на протяжении 11 суток после заражения.

Заражение.

Для заражения использовали изолят, полученный из мазка ткани головного мозга (изолят 8-1433-1). Он был идентифицирован по виду колоний на кровяном агаре (мелкие, белого цвета, гладкие, округлые), по окрашиванию по Граму, по биохимическим свойствам (α -гемолитический, каталаза-отрицательный, не растет в бульоне с 6,5% хлорида натрия, результат теста на гидролиз эскулина положительный) как *Streptococcus suis* типа 2. Этот изолят выращивали в жидкой культуральной среде до 9 логарифмов числа клеток в 1 мл, замораживали аликвоты по 1 мл в стерильных ампулах, помеченных "8-1433-1" и хранили

при температуре -80°C. В проведенных ранее исследованиях была продемонстрирована вирулентность этого изолята у свиней.

Приблизительно за 4 ч до заражения ампулу с полевым изолятом вирулентных *Streptococcus suis* типа 2 (изолят 8-1433-1) оттаивали. Содержимое ампулы переносили в свежую среду и инкубировали на орбитальном шейкере при температуре 37°C до достижения оптической плотности при 600 нм приблизительно 1,0 (определяли с помощью спектрофотометра). Полученную культуру окрашивали по Граму; присутствовали чистые типичные колонии отдельных и объединенных в цепочки мелких шаровидных клеток. Непосредственно перед заражением и сразу после него определяли число жизнеспособных бактерий в инокуляте. Каждой свинье вводили внутримышечно 2 мл инокулята.

Наблюдения.

Животных обследовали ежедневно сотрудники, не осведомленные о том, какие особи получали вакцину, а какие плацебо. Отмечали появление у свиней хромоты, нежелания вставать, нарушений со стороны центральной нервной системы и случаи смерти.

В приведенных ниже таблицах "*S. suis* DMO" - это ослабленный штамм с SNP, представленными в табл. 1, который был депонирован в ATCC под номером РТА-13269 в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Таблица 2

Пероральная вакцинация/заражение, исследование 1

Группа особей	Заболели, %	Умерли, %	Защита, %
Вакцинированные (6 lg, DMO)	50%	30%	70%
Вакцинированные (7 lg, DMO)	30%	10%	90%
Вакцинированные (8 lg, DMO)	44%	11%	89%
Контрольные	90%	40%	60%

Таблица 3

Пероральная вакцинация/заражение, исследование 1

Группа особей	Заболели, %	Умерли, %	Защита, %
Вакцинированные <i>S. suis</i> DMO	40%	30%	70%
Контрольные	80%	40%	60%

Таблица 4

Пероральная вакцинация/заражение, исследование 2

Группа особей	Заболели, %	Умерли, %	Защита, %
Вакцинированные (6 lg, DMO)	15%	10%	90%
Вакцинированные (7 lg, DMO)	10,5%	5,2%	94,8%
Вакцинированные (8 lg, DMO)	10,5%	10,5%	89,5%
Контрольные	60%	33,3%	66,7%

Таблица 5

Исследование эффективности 1

Группа особей	Умерли	Умерли %	Заболели	Заболели %
Вакцинированные (6 lg, DMO)	6/20	30%	9/20	45%
Вакцинированные (7 lg, DMO)	0/20	0%	4/20	20%
Вакцинированные (8 lg, DMO)	3/20	15%	6/20	30%
Контрольные	6/20	30%	11/20	55%

Таблица 6

Исследование эффективности 2

Группа особей	Умерли	Умерли, %	Заболели	Заболели, %
Вакцинированные (6 lg, DMO)	8/20	40%	12/20	60,0%
Вакцинированные (7 lg, DMO)	4/19	21,1%	11/19	58,0%
Вакцинированные (8 lg, DMO)	5/20	25,0%	5/20	25,0%
Контрольные	10/19	52,6%	16/19	84,0%

Описав подробно предпочтительные воплощения данного изобретения, отметим, что оно, представленное в приведенном выше тексте, не ограничивается конкретными изложенными в настоящем документе деталями, поскольку возможно множество их вариантов, не отклоняющихся от сущности и объема данного изобретения.

Перечень последовательностей

<110> Merial Limited
Bey, Russell
Lawrence, Paulraj
Simonson, Randy
Sirigireddy, Kamesh
McKeown, Danielle

<120> ОСЛАБЛЕННЫЙ ШТАММ STREPTOCOCCUS SUIIS, ИНДУЦИРУЮЩИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У СВИНЕЙ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

<130> MER 12-197

<150> USSN 61/664,935

<151> 2012-06-27

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 411
<212> ДНК
<213> Streptococcus suis

<400> 1
atgcctacaa ttaaccagtt ggtacgtaaa ccacgtaagt ctaaagtaga aaaatctaaa 60
tcaccagctt tgaacgttgg ttacaacagc cgtaaaaaag ttcaaacaaa cgtttcatca 120
ccacaaaaac gcggtgttgc aactcgtgtc ggaacaatga cacctaaaaa acctaactca 180
gcccttcgta aatttgctcg ggtacgtttg agcaacctta tcgaagttac tgcttacatc 240
ccaggtatcg gtcacaactt gcaagaacac agtggtggtc ttcttcgtgg tggacgtgta 300
aaagaccttc caggggtacg ttaccatatac gttcgtggtg cacttgatac tgctggtgta 360
aacgatcgta agcaaggccg ttctaataac ggtactaaac gtccaaaagg c 411

<210> 2
<211> 137
<212> белок
<213> Streptococcus suis

<400> 2
Met Pro Thr Ile Asn Gln Leu Val Arg Lys Pro Arg Lys Ser Lys Val 15
1 5 10
Glu Lys Ser Lys Ser Pro Ala Leu Asn Val Gly Tyr Asn Ser Arg Lys 30
20 25 30
Lys Val Gln Thr Asn Val Ser Ser Pro Gln Lys Arg Gly Val Ala Thr 45
35 40 45
Arg Val Gly Thr Met Thr Pro Lys Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys 60
50 55 60
Phe Ala Arg Val Arg Leu Ser Asn Leu Ile Glu Val Thr Ala Tyr Ile 80
65 70 75 80

Pro Gly Ile Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Val Val Leu Leu Arg
85 90 95

Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr His Ile Val Arg
100 105 110

Gly Ala Leu Asp Thr Ala Gly Val Asn Asp Arg Lys Gln Gly Arg Ser
115 120 125

Lys Tyr Gly Thr Lys Arg Pro Lys Gly
130 135

<210> 3
<211> 411
<212> ДНК
<213> Streptococcus suis

<400> 3
atgcctacaa ttaaccagtt ggtacgtaaa ccacgtaagt ctaaagtaga aaaatctaaa 60
tcaccagctt tgaacgttgg ttacaacagc cgtaaaaaag ttcaacaaa cgtttcatca 120
ccacaaaaac gcgggtgtgc aactcgtgtc ggaacaatga cacctacaaa acctactca 180
gcccttcgta aatttgctcg tgtacgtttg agcaacctta tcgaagtac tgcttacatc 240
ccaggatcgc gtcacaactt gcaagaacac agtgtggttc ttcttcgtgg tggacgtgta 300
caagaccttc caggggtacg ttaccatcgt gttcgtggtg cacttgatac tgctgggtgta 360
aacgatcgta agcaaggccg ttctaataac ggtactaaac gtccaaaagg c 411

<210> 4
<211> 137
<212> белок
<213> Streptococcus suis

<400> 4
Met Pro Thr Ile Asn Gln Leu Val Arg Lys Pro Arg Lys Ser Lys Val
1 5 10 15
Glu Lys Ser Lys Ser Pro Ala Leu Asn Val Gly Tyr Asn Ser Arg Lys
20 25 30
Lys Val Gln Thr Asn Val Ser Ser Pro Gln Lys Arg Gly Val Ala Thr
35 40 45
Arg Val Gly Thr Met Thr Pro Thr Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys
50 55 60
Phe Ala Arg Val Arg Leu Ser Asn Leu Ile Glu Val Thr Ala Tyr Ile
65 70 75 80
Pro Gly Ile Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Val Val Leu Leu Arg
85 90 95
Gly Gly Arg Val Gln Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr His Ile Val Arg
100 105 110
Gly Ala Leu Asp Thr Ala Gly Val Asn Asp Arg Lys Gln Gly Arg Ser
115 120 125
Lys Tyr Gly Thr Lys Arg Pro Lys Gly
130 135

<210> 5
<211> 1782
<212> ДНК
<213> Streptococcus suis

<400> 5
atgaagacgt tacgtttttt ctggtttttt tttaaacgct ataaactgtc ctttgcgtg 60
atttttctag ccattgtggc agcgacctac ctgcaggtta agacacctgt tttccttgga 120
aatgccattg cggagatggg gaaaatcggg caggcttact ttatggccaa caaagctggt 180
caggctgact ttacgccaga catggctgat tttacgggg ttatgctcaa tcttttcttt 240
gcctatgcgg cgacggttgt ggcttccttg atttacctc tcctcttcac gcgtatcgtg 300
gctcattcga ccaaccgtat gcgtaagggc ttgtttggca aactggaacg cttgacagtt 360
gccttctttg atagccacaa ggacggggat atactttctc gctttaccag tgatttggac 420
aataccaata acgctttcaa ccagtccttg acccaagtgg tgaccaacat cgctctttat 480
gttggtatgg tcatcatgat gttccgtcag gatactcgct tggccttggg gaccattgct 540
tctacgccag ttgccttgat tgccttggtc gttatcatcc gcctatcacg gaaatatacg 600
gataagcaac aggtcgcggt gtctaaactc aatgcctaca tggacgagaa aatttctgga 660
caaaaagcga ttattgtaca aggtgtgcag gaagagacaa ttgatggttt cttggagctc 720
aatgaagaag ttcgtcgcac aactttcaag ggacgcttgt ttggtgggat tctcttccca 780
tttatgaatg gtatgagttt ggtcaatacg gccattgtta tctttgcagg ttccagcatt 840
gttctcaatg acagctcact ggaacacgct gccgcacttg gtctgggtgg gacttttgtt 900
caatactcgc aacagtatta ccagccaatc atgcaggttg ctgccagtg ggcagaattg 960
cagctagctt tcacaggagc tcactgtatt caggaaatgt ttgatgagcc tgagggaatt 1020
cgtcctcaaa acgtccgct atttaccgaa ttaaagaag gtgttgaat taaggacatc 1080
gactttggct acttgccagg tcagaagggtc ttggacaagg tgtctatctc tgctcctaag 1140
ggtaagatgg tggcggtcgt tgggtccgag ggaactggta agactaccat tatgaacttg 1200
attaaccgct tctacgatgt caatggtggt agtgtggcct ttgatggtcg cgatatccgg 1260
gaatatgatt tggatagctt gcggaataag gtcggtatcg tcttgcagga gtcggtgtta 1320
ttctcgggta ctattgcgga caatattcgc tttggtgatg agagcatttc gcaggaaatg 1380
gtggaaccgc cagctcgtgc caccatcgtc cagacttca tcatgagctt gccagagggc 1440
tatgaaacct ttgtgaccga tgatgagaat gtcttctcaa caggtcagaa acagttgatt 1500
tccattgccc gtacgtcttt gacagaccga caagtcttga ttttggacga agcaacctca 1560

```

aacgttgata ccgtaacgga ggccaaaatt caaaaggcta tggaggccat tatcgcagga 1620
cggactagct tcgtcattgc ccaccgcctc aaaaccattc tcaatgcgga tgaatcatc 1680
gtcctcaagg atggaagggt tatcgagcaa ggcaaccaca gccaaattct caaactaat 1740
ggcttctacg ccgaacttta ccacaaccag ttgtgtttg aa 1782

<210> 6
<211> 594
<212> белок
<213> Streptococcus suis
<400> 6

Met Lys Thr Leu Arg Phe Phe Trp Phe Tyr Phe Lys Arg Tyr Lys Leu
1 5 10 15

Ser Phe Ala Val Ile Phe Leu Ala Ile Val Ala Ala Thr Tyr Leu Gln
20 25 30

Val Lys Thr Pro Val Phe Leu Gly Asn Ala Ile Ala Glu Met Gly Lys
35 40 45

Ile Gly Gln Ala Tyr Phe Met Ala Asn Gln Ala Gly Gln Ala Asp Phe
50 55 60

Gln Pro Asp Met Ala Asp Phe Asn Gly Val Met Leu Asn Leu Phe Phe
65 70 75 80

Ala Tyr Ala Ala Thr Val Val Ala Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Leu Phe
85 90 95

Thr Arg Ile Val Ala His Ser Thr Asn Arg Met Arg Lys Gly Leu Phe
100 105 110

Gly Lys Leu Glu Arg Leu Thr Val Ala Phe Phe Asp Ser His Lys Asp
115 120 125

Gly Asp Ile Leu Ser Arg Phe Thr Ser Asp Leu Asp Asn Ile Gln Asn
130 135 140

Ala Phe Asn Gln Ser Leu Thr Gln Val Val Thr Asn Ile Ala Leu Tyr
145 150 155 160

Val Gly Met Val Ile Met Met Phe Arg Gln Asp Thr Arg Leu Ala Leu
165 170 175

Val Thr Ile Ala Ser Thr Pro Val Ala Leu Ile Ala Leu Val Val Ile
180 185 190

Ile Arg Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Asp Lys Gln Gln Ala Ala Val Ser
195 200 205
Lys Leu Asn Ala Tyr Met Asp Glu Lys Ile Ser Gly Gln Lys Ala Ile
210 215 220

Ile Val Gln Gly Val Gln Glu Glu Thr Ile Asp Gly Phe Leu Glu Leu
225 230 235 240

Asn Glu Glu Val Arg Arg Thr Thr Phe Lys Gly Arg Leu Phe Gly Gly
245 250 255

Ile Leu Phe Pro Phe Met Asn Gly Met Ser Leu Val Asn Thr Ala Ile
260 265 270

Val Ile Phe Ala Gly Ser Ser Ile Val Leu Asn Asp Ser Ser Leu Glu
275 280 285

Thr Ala Ala Ala Leu Gly Leu Val Val Thr Phe Val Gln Tyr Ser Gln
290 295 300

Gln Tyr Tyr Gln Pro Ile Met Gln Val Ala Ala Ser Trp Ala Glu Leu
305 310 315 320

Gln Leu Ala Phe Thr Gly Ala His Arg Ile Gln Glu Met Phe Asp Glu
325 330 335

Pro Glu Glu Val Arg Pro Gln Asn Ala Pro Leu Phe Thr Glu Leu Lys
340 345 350

Glu Gly Val Glu Ile Lys Asp Ile Asp Phe Gly Tyr Leu Pro Gly Gln
355 360 365

Lys Val Leu Asp Lys Val Ser Ile Ser Ala Pro Lys Gly Lys Met Val
370 375 380

Ala Val Val Gly Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr Thr Ile Met Asn Leu
385 390 395 400

Ile Asn Arg Phe Tyr Asp Val Asn Gly Gly Ser Val Ala Phe Asp Gly
405 410 415

Arg Asp Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Gly
420 425 430

Ile Val Leu Gln Glu Ser Val Leu Phe Ser Gly Thr Ile Ala Asp Asn
435 440 445

Ile Arg Phe Gly Asp Glu Ser Ile Ser Gln Glu Met Val Glu Thr Ala
450 455 460

Ala Arg Ala Thr His Ile His Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro Glu Gly
465 470 475 480

Tyr Glu Thr Phe Val Thr Asp Asp Glu Asn Val Phe Ser Thr Gly Gln

```

485 490 495
 Lys Gln Leu Ile Ser Ile Ala Arg Thr Leu Leu Thr Asp Pro Gln Val
 500 505 510
 Leu Ile Leu Asp Glu Ala Thr Ser Asn Val Asp Thr Val Thr Glu Ala
 515 520 525
 Lys Ile Gln Lys Ala Met Glu Ala Ile Ile Ala Gly Arg Thr Ser Phe
 530 535 540
 Val Ile Ala His Arg Leu Lys Thr Ile Leu Asn Ala Asp Glu Ile Ile
 545 550 555 560
 Val Leu Lys Asp Gly Lys Val Ile Glu Gln Gly Asn His Ser Gln Leu
 565 570 575
 Leu Lys Leu Asn Gly Phe Tyr Ala Glu Leu Tyr His Asn Gln Phe Val
 580 585 590
 Phe Glu

 <210> 7
 <211> 1782
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus suis

 <400> 7
 atgaagacgt tacgtttttt ctggtttttt tttaaagcgt ataaactgtc ctttgcgtgt 60
 atttttctag ccattgtggc agcgacctac ctgcaggtta agacacctgt tttccttgga 120
 aatgccattg cggagatggg gaaaatcggg caggcttact ttatggccaa tcaagctggt 180
 caggctgact ttcagccaga catggctgat tttaacgggg ttatgctcaa tcttttcttt 240
 gcctatcgcg cgacgggtgt ggttctcttg atttacctc tcctcttcac gcgtatcgtg 300
 gtcatttcga ccaaccgtat gcataagggc ttgtttggca aactggaacg ctgacagttt 360
 gccttctttg atagccacaa ggacggggat atactttctc gctttaccag tgatttggac 420
 aatatccaaa acgctttcaa ccagtctctg acccaagtgg tgaccaacat cgctctttat 480
 gttggtatgg tcatcatgat gttccgtcag gatactcgct tggccttggg gaccattgct 540
 tctacgccag ttgccttgat tgctttggtc gttatcatcc gcctatcacg gaaatatacg 600
 gataagcaac aggcctgcgt gtctaaactc aatgcctaca tggacgagaa aatttctgga 660
 caaaaagcga ttattgtaca aggtgtgcag gaagagacaa ttgatggttt ctggagctc 720
 aatgaagaag ttctgcgcac aactttcaag ggacgcttgt ttggtgggat tctcttccca 780
 tttatgaatg gtatgagttt ggtcaatacg gccattgtta tctttgcagg ttccagcatt 840
 gttctcaatg acagctcact ggaacacgct gccgcacttg gtctgggtgg gacttttgtt 900
 caatactcgc aacagtatta ccagccaatc atgcaggttg ctgccagctg ggcagaattg 960
 cagctagctt tcacaggagc tcactgtatt caggaaatgt ttgatgagcc tgaggaagtt 1020
 cgtcctcaaa acgctccgct atttaccgaa ttaaagaag gtgttgaat taaggacatc 1080
 gactttggct acttgccagg tcagaaggtc ttggacaagg tgtctatctc tgctcctaag 1140
 ggtaagatgg tggcggctgt tggtcgcagc ggatctggta agactaccat tatgaacttg 1200
 attaacgctt tctacgatgt caatggtggt agtgtggcct ttgatggtcg cgatattcgg 1260
 gaatatgatt tggatagctt gcggaataag gtcggtatcg tcttgcagga gtcggtgtta 1320
 ttctcgggta ctattgcgga caatattcgc tttggtgatg agagcatttc gcaggaaatg 1380
 gtggaaaccg cagctcgtgc caccataatc cagcacttca tcatgagctt gccagagggc 1440
 tatgaaacct ttgtgaccga tgatgagaat gtctttctca caggtcagaa acagttgatt 1500
 tccattgccc gtacgctttt gacagaccca caagtcttga ttttggacga agcaacctca 1560
 aacgttgata ccgtaacgga ggccaaaatt caaaaggcta tggaggccat tatcgcagga 1620
 cggactagct tcgtcattgc ccaccgcctc aaaaccattc tcaatgcgga tgaaatcatc 1680
 gtcctcaagg atggaagagt tatcgagcaa ggcaaccaca gccaaacttc caaactaaat 1740
 ggcttctacg ccgaacttta ccacaaccag tttgtgtttg aa 1782

 <210> 8
 <211> 594
 <212> белок
 <213> Streptococcus suis

 <400> 8
 Met Lys Thr Leu Arg Phe Phe Trp Phe Tyr Phe Lys Arg Tyr Lys Leu
 1 5 10 15

 Ser Phe Ala Val Ile Phe Leu Ala Ile Val Ala Ala Thr Tyr Leu Gln
 20 25 30

 Val Lys Thr Pro Val Phe Leu Gly Asn Ala Ile Ala Glu Met Gly Lys
 35 40 45

 Ile Gly Gln Ala Tyr Phe Met Ala Asn Gln Ala Gly Gln Ala Asp Phe
 50 55 60

 Gln Pro Asp Met Ala Asp Phe Asn Gly Val Met Leu Asn Leu Phe Phe
 65 70 75 80

 Ala Tyr Ala Ala Thr Val Val Ala Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Leu Phe
 85 90 95

 Thr Arg Ile Val Ala His Ser Thr Asn Arg Met His Lys Gly Leu Phe
 100 105 110

 Gly Lys Leu Glu Arg Leu Thr Val Ala Phe Phe Asp Ser His Lys Asp
 115 120 125

 Gly Asp Ile Leu Ser Arg Phe Thr Ser Asp Leu Asp Asn Ile Gln Asn

036764

130 135 140

Ala Phe Asn Gln Ser Leu Thr Gln Val Val Thr Asn Ile Ala Leu Tyr
145 150 155 160

Val Gly Met Val Ile Met Met Phe Arg Gln Asp Thr Arg Leu Ala Leu
165 170 175

Val Thr Ile Ala Ser Thr Pro Val Ala Leu Ile Ala Leu Val Val Ile
180 185 190

Ile Arg Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Asp Lys Gln Gln Ala Ala Val Ser
195 200 205

Lys Leu Asn Ala Tyr Met Asp Glu Lys Ile Ser Gly Gln Lys Ala Ile
210 215 220

Ile Val Gln Gly Val Gln Glu Glu Thr Ile Asp Gly Phe Leu Glu Leu
225 230 235 240

Asn Glu Glu Val Arg Arg Thr Thr Phe Lys Gly Arg Leu Phe Gly Gly
245 250 255

Ile Leu Phe Pro Phe Met Asn Gly Met Ser Leu Val Asn Thr Ala Ile
260 265 270

Val Ile Phe Ala Gly Ser Ser Ile Val Leu Asn Asp Ser Ser Leu Glu
275 280 285

Thr Ala Ala Ala Leu Gly Leu Val Val Thr Phe Val Gln Tyr Ser Gln
290 295 300

Gln Tyr Tyr Gln Pro Ile Met Gln Val Ala Ala Ser Trp Ala Glu Leu
305 310 315 320

Gln Leu Ala Phe Thr Gly Ala His Arg Ile Gln Glu Met Phe Asp Glu
325 330 335

Pro Glu Glu Val Arg Pro Gln Asn Ala Pro Leu Phe Thr Glu Leu Lys
340 345 350

Glu Gly Val Glu Ile Lys Asp Ile Asp Phe Gly Tyr Leu Pro Gly Gln
355 360 365

Lys Val Leu Asp Lys Val Ser Ile Ser Ala Pro Lys Gly Lys Met Val
370 375 380

Ala Val Val Gly Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr Thr Ile Met Asn Leu
385 390 395 400

Ile Asn Arg Phe Tyr Asp Val Asn Gly Gly Ser Val Ala Phe Asp Gly
405 410 415

Arg Asp Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Gly
420 425 430

Ile Val Leu Gln Glu Ser Val Leu Phe Ser Gly Thr Ile Ala Asp Asn
435 440 445

Ile Arg Phe Gly Asp Glu Ser Ile Ser Gln Glu Met Val Glu Thr Ala
450 455 460

Ala Arg Ala Thr His Ile His Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro Glu Gly
465 470 475 480

Tyr Glu Thr Phe Val Thr Asp Asp Glu Asn Val Phe Ser Thr Gly Gln
485 490 495

Lys Gln Leu Ile Ser Ile Ala Arg Thr Leu Leu Thr Asp Pro Gln Val
500 505 510

Leu Ile Leu Asp Glu Ala Thr Ser Asn Val Asp Thr Val Thr Glu Ala
515 520 525

Lys Ile Gln Lys Ala Met Glu Ala Ile Ile Ala Gly Arg Thr Ser Phe
530 535 540

Val Ile Ala His Arg Leu Lys Thr Ile Leu Asn Ala Asp Glu Ile Ile
545 550 555 560

Val Leu Lys Asp Gly Lys Val Ile Glu Gln Gly Asn His Ser Gln Leu
565 570 575

Leu Lys Leu Asn Gly Phe Tyr Ala Glu Leu Tyr His Asn Gln Phe Val
580 585 590

Phe Glu

<210> 9
<211> 447
<212> ДНК
<213> Streptococcus suis

<400> 9
atgggacata ctattgcaga ttttcggaac ttgctcaatc agattgaaca aattagtga 60
accattgcaa aagaatacga tgtggagcac ttggctggtc cacagggctg ggccttgctc 120
ttcattgcgg aacggtcggg agccgaacc tttgtaaag atatagaagc ggaattaaag 180
atttccaaat cggttgccag caatctggtc aagagaatgg agaaaaatgg ctttatccaa 240
gtccttcctt ctaaggttga caaacgcttc aaacagctgg ttttgacaga gaagggacaa 300
gggaagatat gtcacctgaa agcttttcat gaagaaatgc accattcact ttttgggggc 360
attcaaaaag aggactttga cttggttaaa caggtgggca atcaattaaa agtaaatatt 420

```

caacgctata aggagaagaa tcattgtt                                447

<210> 10
<211> 149
<212> белок
<213> Streptococcus suis

<400> 10
Met Gly His Thr Ile Ala Asp Phe Arg Asn Leu Leu Asn Gln Ile Glu
1      5      10      15

Gln Ile Ser Glu Thr Ile Ala Lys Glu Tyr Asp Val Glu His Leu Ala
20     25     30

Gly Pro Gln Gly Trp Ala Leu Arg Phe Ile Ala Glu Arg Ser Glu Ala
35     40     45

Glu Thr Phe Val Lys Asp Ile Glu Ala Glu Leu Lys Ile Ser Lys Ser
50     55     60

Val Ala Ser Asn Leu Val Lys Arg Met Glu Lys Asn Gly Phe Ile Gln
65     70     75     80

Val Leu Pro Ser Lys Val Asp Lys Arg Phe Lys Gln Leu Val Leu Thr
85     90     95

Glu Lys Gly Gln Gly Lys Ile Cys His Leu Lys Ala Phe His Glu Glu
100    105    110

Met His His Ser Leu Phe Trp Gly Ile Gln Lys Glu Asp Phe Asp Leu
115    120    125

Val Lys Gln Val Gly Asn Gln Leu Lys Val Asn Ile Gln Arg Tyr Lys
130    135    140

Glu Lys Asn His Val
145

<210> 11
<211> 447
<212> ДНК
<213> Streptococcus suis

<400> 11
atgggacata ctattgcaga ttttcggaac ttgctcaatc agattgaaca aattagtga
60
accattgcaa aagaatacga tgtggagcac ttggctgggtc cacagggtcg ggccttgctc
120
ttcattgcgg aacggtcgga agccgaaacc ttgtaaaag atatagaagc ggaattaaag
180
atttccaaat cggttgccag caatctggtc aagagaatgg agaaaaatgg ctttatccaa
240
gtccttccct ctaagggtga caaatgcttc aaacagctgg ttttgacaga gaagggacaa
300
gggaagatat gtcacctgaa agcttttcat gaagaaatgc accattcact ttttggggc
360
attcaaaaag aggactttga cttggttaaa caggtgggca atcaattaaa agtaaatatt
420
caacgctata aggagaagaa tcattgtt                                447

<210> 12
<211> 149
<212> белок
<213> Streptococcus suis

<400> 12
Met Gly His Thr Ile Ala Asp Phe Arg Asn Leu Leu Asn Gln Ile Glu
1      5      10      15

Gln Ile Ser Glu Thr Ile Ala Lys Glu Tyr Asp Val Glu His Leu Ala
20     25     30

Gly Pro Gln Gly Trp Ala Leu Arg Phe Ile Ala Glu Arg Ser Glu Ala
35     40     45

Glu Thr Phe Val Lys Asp Ile Glu Ala Glu Leu Lys Ile Ser Lys Ser
50     55     60

Val Ala Ser Asn Leu Val Lys Arg Met Glu Lys Asn Gly Phe Ile Gln
65     70     75     80

Val Leu Pro Ser Lys Val Asp Lys Cys Phe Lys Gln Leu Val Leu Thr
85     90     95

Glu Lys Gly Gln Gly Lys Ile Cys His Leu Lys Ala Phe His Glu Glu
100    105    110

Met His His Ser Leu Phe Trp Gly Ile Gln Lys Glu Asp Phe Asp Leu
115    120    125

Val Lys Gln Val Gly Asn Gln Leu Lys Val Asn Ile Gln Arg Tyr Lys
130    135    140

Glu Lys Asn His Val
145

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ослабленный штамм *Streptococcus suis*, способный вызывать у свиней безопасный и эффективный иммунный ответ, направленный против *S. suis*, причем указанный ослабленный штамм содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие мутантные белки rpsL-S12 (белок 30S-субъединицы рибосомы), ABC-АТРВМР (АТФ-связывающий мембранный белок ABC-транспортера), marR (регулятор транскрипции) с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4, 8 и 12 соответственно, по сравнению с исходным вирулентным штаммом *S. suis*, который содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие белки дикого типа rpsL-S12, ABC-АТРВМР и marR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 2, 6 и 10 соответственно.

2. Ослабленный штамм по п.1, содержащий нуклеиновые кислоты с последовательностями SEQ ID NO: 3, 7 и 11, кодирующими мутантные белки *gpsL-S12*, *ABC-ATPBMP* и *marR* соответственно.
3. Ослабленный штамм по п.2, отличающийся тем, что уровень(и) экспрессии пептида(ов) *gpsL-S12*, *ABC-ATPBMP* и *marR* уменьшен(ы) относительно исходного штамма *S. suis*.
4. Ослабленный штамм по п.1, депонированный в АТСС под номером РТА-13269.
5. Иммунологическая композиция, содержащая ослабленный штамм по любому из пп.1-4, которая вызывает у свиней иммунный ответ против вирулентного штамма *S. suis*.
6. Иммунологическая композиция по п.5, содержащая фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или иной эксципиент и адъювант, выбранный из хитозана, инаktivированных бактерий, инаktivированных вирусов, фракций инаktivированных бактерий, бактериальных липополисахаридов, бактериальных токсинов или их производных либо их комбинаций.
7. Иммунологическая композиция по любому из пп.5 или 6, дополнительно содержащая по меньшей мере один антиген, ассоциированный с патогеном, отличным от *S. suis*, где дополнительный антиген способен вызывать у свиней иммунный ответ, направленный против *M. hyo*, PCV2, PRRSV, SIV или других патогенов, которые могут заражать свинью и вызывать у нее заболевание или подверженность заболеванию.
8. Применение ослабленного штамма по любому из пп.1-4 для получения композиции по любому из пп.5, 6 или 7.
9. Применение ослабленного штамма по любому из пп.1-4 в лечении заболеваний, вызываемых *S. suis*.
10. Применение ослабленного штамма по любому из пп.1-4 для индукции у свиньи иммунного ответа, направленного против *S. suis*.
11. Применение по п.10, отличающееся тем, что свинья является свиноматкой за 3-6 недель до опороса, а вызываемый иммунный ответ приводит к снижению заболеваемости или смертности среди родившихся от нее поросят по сравнению с поросятами, родившимися от невакцинированных свиней.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
