

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045199**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.31

(21) Номер заявки
202092065

(22) Дата подачи заявки
2019.03.01

(51) Int. Cl. **A61K 39/09** (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

(54) ЭКСПРЕССИЯ ПНЕВМОКОККОВОГО ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА А (PspA)

(31) 201841007814

(32) 2018.03.01

(33) IN

(43) 2020.11.19

(86) PCT/IB2019/051655

(87) WO 2019/167008 2019.09.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОЛОДЖИКАЛ И ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
**Срираман Раджан, Матур Рамеш
Венкат, Мантена Нарендер Дев, Датла
Махима, Камиредди Светха (IN)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) Anonymous: "UPI00067DF074", 10 August 2015 (2015-08-10), XP055599348, retrieved from the Internet: URL: <https://www.uniprot.org/uniparc/UPI00067DF074> [retrieved on 2019-06-25], abstract
CN-A-107674118
WO-A2-2010141312
FELDMAN CHARLES et al.: "Review: Current and new generation pneumococcal vaccines", JOURNAL OF INFECTION, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 69, № 4, 23 June 2014 (2014-06-23), p. 309-325, XP029053023, ISSN: 0163-4453, DOI: 10.1016/J.JINF.2014.06.006, the whole document

(57) Изобретение относится к экспрессии пневмококкового поверхностного белка А (PspA). Изобретение представляет собой усовершенствование в области генной инженерии и технологии вакцин. В изобретении раскрыты экспрессионные векторы и рекомбинантные клетки-хозяева для экспрессии усеченного пептида PspA. В изобретении также раскрыты вакцинные композиции, содержащие усеченные пептиды в качестве белка-носителя.

B1**045199****045199****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к высокоуровневой экспрессии усеченного пневмококкового поверхностного белка A1 (PspA1) в бактериях.

Уровень техники

Streptococcus pneumoniae является важным возбудителем отита среднего уха, менингита, бактериемии и пневмонии, а также основной причиной смертельных инфекций у людей пожилого возраста и лиц с имеющимися сопутствующими заболеваниями. Привлекательной целью вакцинации против стрептококков является снижение числа носителей инфекции в вакцинированных популяциях и, как следствие, снижение уровня заболеваемости пневмококковой инфекцией.

Пневмококковые полисахаридные вакцины, представленные на рынке под товарным знаком Pneumovax23, не эффективны у детей младше 2 лет. Отсутствие эффективности полисахаридных вакцин в данной популяции является следствием незрелости детской иммунной системы в отношении экспрессии В-клеточных рецепторов. Конъюгация полисахаридов (PS) с белками-носителями превращает их из Т-независимого антигена в Т-зависимый антиген. В качестве Т-зависимого антигена полисахариды могут вызывать ответную реакцию с переключением изотипа иммуноглобулинов, генерацией клеток памяти и стимуляцией иммунного ответа.

Мембранные белки находятся внутри мембраны и охватывают ее, через которую они служат для транспорта молекул или облегчения клеточной адгезии. Белки могут способствовать перемещению веществ за счет облегченной диффузии (т.е. пассивного транспорта) или активного транспорта. Пневмококковый поверхностный белок А (PspA) является мембранным белком и еще одним важным фактором вирулентности, обнаруженным присоединенным к клеточной стенке всех штаммов *Streptococcus pneumoniae*.

Замена универсальных белков-носителей, таких как столбнячный анатоксин (TT) или CRM197, пневмококковым белком, в частности PspA1 или его фрагментом, помимо расширения охвата действия вакцины, также предупреждает нарушение иммунных ответов, вызванных чрезмерным использованием одних и тех же белков-носителей в конъюгированных вакцинах. Экспрессионная плазмида сконструирована таким образом, чтобы включать регуляторные последовательности, которые функционируют в качестве энхансерной и промоторной областей и приводят к эффективной транскрипции гена, переносимого в экспрессионном векторе. Целью хорошо сконструированного экспрессионного вектора является эффективная продукция белка, и это может быть достигнуто посредством синтеза значительного количества стабильной матричной РНК. Возможно сконструировать экспрессионный вектор, который обеспечивает жесткий контроль экспрессии, и белок продуцируется в больших количествах только при необходимости в подходящих для экспрессии условиях. В отсутствие жесткого контроля экспрессии гена белок также может экспрессироваться конститутивно.

Corynebacterium glutamicum представляет собой грамположительную ферментативную бактерию, которая широко используется в производстве глутамата натрия в больших количествах. За счет своих стабильных генетических характеристик и отсутствия каких-либо эндотоксинов *Corynebacterium glutamicum* классифицируется как GRAS-микроорганизм (в общем, считается безопасным). Известно, что бактерия не секретирует каких-либо внеклеточных протеаз, и как следствие она становится привлекательной платформой для продуцирования гетерологичных белков в среду. Это может быть достигнуто с использованием экспрессионной плазмидной конструкции, которая может синтезировать рекомбинантный белок в больших количествах.

В EP 2310502 B1 раскрыто применение промотора P_{lac} в конструкции, где штамм *Escherichia coli*, содержащий IPTG-индуцибельную мутацию *ftsZ* и делецию *minCDE*, культивировали в среде LB.

В публикации Nokano et al., J. Bacteriol., 1984 Jan., 157(1):79-83 раскрыто использование гена устойчивости к канамицину в плазмидной конструкции для создания трансформированного штамма, который приобретает свойство устойчивости к канамицину.

В публикации Masai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1987 Jul., 84(14):4781-5 раскрыт белок RepA для инициации репликации плазмиды R1 и взаимодействия с последовательностью *oriR*.

В публикации Nayak et al., Infect. Immun.-1998-Nayak-3744-51 раскрыта живая рекомбинантная вакцина для перорального введения на основе штамма *Salmonella*, экспрессирующего пневмококковый поверхностный белок А (PspA).

В публикации Nabors et al. Vaccine, 18 (2000) 1743-54 раскрыта экспрессия рекомбинантного усеченного PspA в виде цитоплазматического белка в *Escherichia coli*.

В публикации Figueredo et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2017), 101:2305-2317 раскрыто получение и очистка немеченого рекомбинантного пневмококкового поверхностного белка А (PspA4Pro).

В вышеуказанных документах раскрыты генетические элементы экспрессионного вектора или экспрессия пневмококкового поверхностного протеина А в *Escherichia coli* и *Salmonella*.

Авторы изобретения идентифицировали иммуногенные фрагменты пневмококкового поверхностного белка. Затем авторы изобретения приложили интенсивные усилия для разработки экспрессионных конструкций, способных к стабильной и конститутивной или индуцибельной экспрессии усеченного пневмококкового поверхностного белка А1 (PspA1) в бактериях на высоком уровне.

Следовательно, настоящее изобретение обеспечивает преодоление проблем предшествующего уровня техники посредством получения экспрессионных векторов и рекомбинантных клеток-хозяев для экспрессии усеченных пневмококковых поверхностных белков. Кроме того, авторы изобретения получили вакцинные композиции, содержащие усеченные белки в качестве белков-носителей.

Цель изобретения

Основной целью настоящего изобретения является получение экспрессионной конструкции для высокоуровневой экспрессии усеченного пневмококкового поверхностного белка A1 (PspA1) в бактериях.

Другой целью настоящего изобретения является получение экспрессионной конструкции, способной к стабильной и конститутивной или индуцибельной экспрессии на высоком уровне усеченного пневмококкового поверхностного белка A1 (PspA1) в бактериях.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, способной к высокоуровневой экспрессии усеченного пневмококкового поверхностного белка A1 (PspA1) с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3 и 4.

Настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, содержащей ген, который кодирует усеченный PspA1, с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5 и 6.

Настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (пневмококкового поверхностного белка A1) с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3 или 4, в бактериях, содержащей

- a) ген, кодирующий усеченный PspA1, с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5 или 6;
- b) ориджин репликации;
- c) ген устойчивости к антибиотикам;
- d) промотор; и
- e) сайт связывания рибосомы.

Настоящее изобретение также относится к способу высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (пневмококкового поверхностного белка A1), который включает культивирование бактерий, трансформированных экспрессионной конструкцией, и тем самым очистку экспрессированного белка.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 на панели А приведено схематическое представление pBE31C. На панели В приведено схематическое представление доменов rspA, определенных из выведенной аминокислотной последовательности Rx1 PspA1. На панели С приведено схематическое представление pBE117. На панели D показан ампликон ПЦР, содержащий RBS, нативный сигнальный пептид, усеченный PspA1, нативный терминатор и ttnB.

На фиг. 2 показано покрытие белковой последовательности усеченного PspA1 в анализе пептида "отпечатков пальцев".

На фиг. 3 показан анализ интактной массы усеченного PspA1, экспрессированного в *Corynebacterium glutamicum*.

На фиг. 4 показан усеченный PspA1, элюированный с колонки с керамическим гидроксипатитом (СНТ-II).

На фиг. 5 показан усеченный PspA1, элюированный с анионообменной колонки.

На фиг. 6 показан усеченный PspA1 после диафильтрации.

На фиг. 7 показана хроматограмма SEC-HPLC кинетики реакции конъюгации пневмококкового полисахарида серотипа 3 (А), 6А (В) и 6В (С).

На фиг. 8 показан титр сывороточных антител у иммунизированных кроликов против различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипов 3, 6А, 6В (2,2 мкг) с усеченным белком-носителем PspA1.

На фиг. 9 показан титр сывороточных антител у иммунизированных кроликов против различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипов 3, 6А, 6В (4,4 мкг) с усеченным белком-носителем PspA1.

На фиг. 10 на панели А приведено схематическое представление pBE114k. На панели В показано подтверждение pBE114k рестрикционным расщеплением.

На фиг. 11 показан усеченный PspA1, элюированный с хроматографической колонки с СНТ I.

На фиг. 12 показан усеченный PspA1, элюированный с хроматографической колонки с Capto Q Impress.

На фиг. 13 показано покрытие белка PspA1 MALDI.

На фиг. 14 показан анализ интактной массы усеченного PspA1, экспрессированного в *Escherichia coli*.

Подробное описание изобретения

Термин PspA1 относится к пневмококковому поверхностному белку A1 из *Streptococcus pneumoniae*.

Настоящее изобретение относится к высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (пневмококкового поверхностного белка A1) в бактериях. Бактериями, подходящими для высокоуровневой экспрессии PspA1, являются *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (пневмококкового поверхностного белка A1) с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3, в *Corynebacterium glutamicum*.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (пневмококкового поверхностного протеина A1) с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4, в *Escherichia coli*.

Настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, способной к высокоуровневой экспрессии поверхностного белка с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3.

Настоящее изобретение также относится к экспрессионной конструкции, способной к высокоуровневой экспрессии поверхностного белка с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (пневмококкового поверхностного белка A1) с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3, в *Corynebacterium glutamicum*.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (пневмококкового поверхностного белка A1) с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4, в *Escherichia coli*.

Настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, которая используется для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1, в *Corynebacterium glutamicum*, содержащей

- i) ориджин репликации *ori R*;
- ii) ген устойчивости к канамицину;
- iii) промотор P_{tac} ;
- iv) представляющий интерес ген, кодирующий усеченный PspA1 (SEQ ID NO: 5).

Настоящее изобретение также относится к экспрессионной конструкции, которая используется для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 в *Escherichia coli*, содержащей

- i) ориджин репликации *pUC*;
- ii) ген устойчивости к канамицину;
- iii) промотор P_{T7} ;
- iv) представляющий интерес ген, кодирующий усеченный PspA1 (SEQ ID NO: 6).

В одном варианте осуществления экспрессионная конструкция для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 дополнительно содержит сайт связывания рибосомы (RBS). RBS включен в прямой праймер, и короткий участок ДНК, содержащий нативные терминаторы, включен в обратный праймер, используемые для дальнейшей амплификации усеченного PspA1. RBS (сайт связывания рибосомы) представляет сайт гена триозофосфатизомеразы в экспрессионной конструкции для экспрессии усеченного PspA1 в *Corynebacterium glutamicum*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионная конструкция содержит кодирующую область (нативную) сигнального пептида PspA1, усеченный PspA1, промотор P_{tac} и сайт связывания рибосомы (RBS) гена триозофосфатизомеразы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения относится к экспрессионной конструкции для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (SEQ ID NO: 3) в *Corynebacterium glutamicum*, которая содержит

- a) ген, кодирующий усеченный PspA1 (SEQ ID NO: 5);
- b) ориджин репликации *ori R* (SEQ ID NO: 12);
- c) ген устойчивости к канамицину (SEQ ID NO: 1);
- d) промотор P_{tac} (SEQ ID NO: 2); и
- e) сайт связывания рибосомы гена триозофосфатизомеразы.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (SEQ ID NO: 4) в *Escherichia coli*, которая содержит

- a) ген, кодирующий усеченный PspA1 (SEQ ID NO: 6);
- b) ориджин репликации *pUC*;
- c) ген устойчивости к канамицину (SEQ ID NO: 1);
- d) промотор P_{T7} (SEQ ID NO: 11); и
- e) сайт связывания рибосомы.

Пневмококковый поверхностный белок A (PspA) является мембранным белком и представляет важный фактор вирулентности, обнаруженный присоединенным к клеточной стенке всех штаммов *Streptococcus pneumoniae*, и является многообещающим компонентом вакцины, который, как было показано, обладает высокой иммуногенностью.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения усеченный PspA1 используется в качестве белка-носителя. Белки-носители, используемые в конъюгированных вакцинах, предпочтительно представляют собой белки, которые не являются токсичными и реактогенными, и которые можно получить в большом количестве и с высокой чистотой. Белок-носитель можно конъюгировать с капсульным полисахаридом, выделенным из патогенных бактерий, для усиления иммуногенности полисахарида. Бел-

ки-носители должны поддаваться стандартным процедурам химической конъюгации.

Усеченный PspA1 в *Corynebacterium glutamicum* секретируется во внеклеточную среду. Секреция во внеклеточную среду способствует эффективной очистке.

Настоящее изобретение относится к высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 в *Corynebacterium glutamicum*, где N-концевая область вместе с пролин-богатой областью усеченного гена PspA1 была амплифицирована из капсульного серотипа 23F *Streptococcus pneumoniae* вместе с расположенной выше областью.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионная конструкция содержит усеченный PspA1, промотор P_{lac} и сайт связывания рибосомы (RBS) гена триозофосфатизомеразы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионная конструкция содержит усеченный PspA1, промотор P_{T7} и сайт связывания рибосомы (RBS).

Экспрессионную конструкцию подвергают электропорации в *Corynebacterium glutamicum* и отбирают на чашках со средой LB с использованием канамицина в качестве селективного маркера.

P_{lac} представляет сильный гибридный промотор, состоящий из области -35 промотора trp и области -10 промотора/оператора lacUV5.

Последовательности rpsA получали из GenBank и выравнивали с белками из базы данных. Праймеры конструировали для специфической амплификации кодирующей области нативного сигнального пептида, N-концевой области вместе с пролин-богатой областью генов PspA, относящихся к семействам 1 и 2. Необходимые области PspA1 и PspA2 амплифицировали из доступных клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae*. Анализ МНС пептидов показал, что PspA1 является сравнительно более иммуногенным, чем rpsA2.

Аминокислотная последовательность кодированного усеченного PspA1, экспрессированного и продуцированного в *Corynebacterium glutamicum*, приведена в SEQ ID NO: 3, имеет определенную интактную массу, составляющую 35452 Да.

Аминокислотная последовательность кодированного усеченного PspA1, экспрессированного и продуцированного в *Escherichia coli*, приведена в SEQ ID NO: 4, имеет определенную интактную массу, составляющую 41966 Да.

Последовательность ДНК, кодирующая усеченный PspA1, экспрессированный в *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*, приведена в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO 6 соответственно.

Corynebacterium glutamicum (ранее известная как *Micrococcus glutamicus*), используемая для экспрессии усеченного PspA1, представляет собой GRAS-микроорганизм, грамположительные палочковидные бактерии. *Corynebacterium glutamicum* представляет GRAS-микроорганизм. Доступна полная геномная последовательность *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, которую можно культивировать до более высокой плотности клеток, и которая также является генетически стабильной за счет отсутствия системы рекомбинационной репарации. Она имеет ограниченную систему рестрикции-модификации. Она не проявляет аутолиза и может сохранять метаболическую активность в условиях задержки роста. Она обладает низкой протеазной активностью, что способствует получению рекомбинантного белка. Пластичность ее метаболизма и сильный вторичный метаболизм, способность использовать широкий спектр источников углерода (пентозы, гексозы и альтернативные источники углерода), стрессоустойчивость к источникам углерода делают ее многообещающим хозяином для продукции гетерологичных белков. Такие физиологические свойства делают *Corynebacterium glutamicum* доступной для манипуляций и культивирования в жестких производственных условиях, что делает ее успешной промышленной "рабочей лошадкой". Сообщалось о гетерологичной экспрессии таких белков, как α-амилаза, эндоглюканаза, эндоксилаза, GFP, ксиланаза и т. д., в *Corynebacterium glutamicum*.

В варианте осуществления настоящего изобретения выход усеченного PspA1 составляет приблизительно 500 мг/л, приблизительно 400 мг/л, приблизительно 300 мг/л, приблизительно 250 мг/л, приблизительно 220 мг/л, приблизительно 200 мг/л, приблизительно 180 мг/л, приблизительно 160 мг/л, приблизительно 150 мг/л, приблизительно 120 мг/л, приблизительно 100 мг/л.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей по меньшей мере один полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипов, выбранных из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, конъюгированный с усеченным PspA1 по настоящему изобретению или комбинацией усеченного PspA1 и других белков-носителей, таких как CRM197, столбнячный анатоксин, коклюшный анатоксин; PsaA и т.п.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к поливалентной пневмококковой вакцинной композиции, выбранной из 10-валентной, 14-валентной, 15-валентной, 17-валентной, 18-валентной, 19-валентной, 20-валентной, 22-валентной, 23-валентной, 24-валентной или 25-валентной композиции, содержащей полисахариды из *Streptococcus pneumoniae* серотипов, выбранных из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, конъюгированные с усеченным PspA1 по настоящему изобретению или комбинацией усеченного PspA1 и других белков-носителей, таких как CRM197, столбнячный анатоксин, коклюшный анатоксин; PsaA и т.п.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к поливалентной конъюгированной вакцине, содержащей по меньшей мере три полисахарида из *Streptococcus pneumoniae* серотипов 3, 6А и 6В, конъюгированные с усеченным PspA1 по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгированной вакцине, содержащей полисахариды из *Streptococcus pneumoniae* серотипов 3, 6А и 6В, конъюгированные с усеченным PspA1 по настоящему изобретению, и из *Streptococcus pneumoniae* серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с CRM₁₉₇.

Настоящее изобретение относится к составам, содержащим приблизительно 2,2 мкг или 4,4 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов из серотипов 3, 6А и 6В, каждый конъюгированный с усеченным PspA1 по настоящему изобретению, и приблизительно 2,2 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, каждый конъюгированный с CRM₁₉₇.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой вакциновой композиции в виде разовой дозы 0,5 мл, где разовая доза содержит приблизительно от 2,2 до 4,4 мкг одного или более пневмококковых полисахаридов; приблизительно от 1 мкг до приблизительно 50 мкг усеченного PspA1 по настоящему изобретению, конъюгированного с каждым из одного или более пневмококковых полисахаридов; приблизительно от 0,2 мг до приблизительно 1 мг адъюванта на основе фосфата алюминия; и эксципиент.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой вакциновой композиции в виде разовой дозы 0,5 мл, где разовая доза содержит приблизительно от 2,2 до 4,4 мкг одного или более пневмококковых полисахаридов; приблизительно от 1 мкг до приблизительно 30 мкг усеченного PspA1 по настоящему изобретению, конъюгированного с каждым из одного или более пневмококковых полисахаридов; приблизительно от 1 мкг до приблизительно 30 мкг CRM₁₉₇, конъюгированного с каждым из одного или более пневмококковых полисахаридов; приблизительно от 0,2 мг до приблизительно 1 мг адъюванта на основе фосфата алюминия; и эксципиент.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение также относится к вакцине для профилактики инфекционного заболевания, вызванного *Streptococcus pneumoniae*, введением конъюгированной вакцины, полученной посредством конъюгации усеченного PspA1 по настоящему изобретению с пневмококковыми полисахаридами.

Примеры

Следующие примеры приведены для иллюстрации изобретения и предназначены только для иллюстративных целей и не должны истолковываться как ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Рекомбинантная экспрессия усеченного PspA1 в *Corynebacterium glutamicum*.

Конструирование pBE31C.

Небольшую, стабильно реплицирующуюся плазмиду pBE30 с широким кругом хозяев получали с использованием синтетической плазмиды, имеющей последовательность pNG2 oriR размером 2,692 т.п.н. Используя данную плазмидную ДНК в качестве матрицы, область oriR размером 1,8 т.п.н. амплифицировали с использованием праймеров rEP-F1 (5'-GCG CGG ACT AGT AGA TCT ATG GTA AAT CTG CGC AGA CAG-3') и rEP-R1 (5'-GCG CGG ACT AGT GAA TTC GGT GAG GTT ATG GCG-3').

Одновременно амплифицировали последовательность kanR размером 1,033 т.п.н. с использованием ДНК-матрицы pUC4-K1XX и праймеров Kan-F2 (5'-AAG GTC CCG GGA TGG CGA TAG CTA GAC TGG GCG GT-3') и Kan-R2 (5'-AAG GTC CCG GGG GTT GGG CGT CGC TTG GTC GG-3'). Ампликон гена kanR и ампликон oriR лигировали по тупым концам для получения вектора pBE30. Также экспрессионную кассету размером 0,851 т.п.н., содержащую тандем из промотора tac lac UV5, сайта множественного клонирования, компонента lacZα и последовательности терминатора TtrnB, амплифицировали с использованием праймеров P_{tac}-F1 (5'-GG AGC ACT AGT CTG AAA TGA GCT GTT GAC AAT TAA TC-3') и P_{tac}-R1 (5'-GG AGC ACT AGT TTT AAA CAT GAG CGG ATA CAT ATT TGA A-3'), каждый из которых добавляет сайт рестрикции SpeI. ДНК-матрица, используемая для амплификации экспрессионной кассеты, представляет собой pMMB206 (ATCC 37808). Затем экспрессионную кассету клонировали в уникальный сайт SpeI, сконструированный в плазмиде pBE30. Плазмиду, полученную таким образом, обозначали как pBE31C (фиг. 1А; SEQ ID NO: 14).

Конструирование pBE117.

Усеченный ген PspA1 (N-концевая область вместе с пролин-богатой областью, фиг. 1В) амплифицировали из капсульного серотипа 23F *Streptococcus pneumoniae* вместе с расположенной выше областью. Ампликон клонировали в вектор TA (pTZ57R/T, полученный от Fermentas) с использованием праймеров PSPAFl_FP (5'-ATG AAT AAG AAA AAA ATG ATT TTA ACA AGT CTA GCC-3') и PSPAFl_RP (5'-CGA GAG AGA TCT AAA TTA AAA TGT CAA ATG TTC TTA ACA TGC TTT AAT TTT TAT TTT GGT GC-3') и последовательность подтверждали. Ее обозначали как pTZ-PspA1. Последовательность нативного терминатора включали в обратный праймер PSPAFlRP. Определяющие клон области картировали в полученной последовательности усеченного PspA1, для подтверждения его принадлежности к семейству 1 белков PspA.

Для экспрессии усеченного PspA1 в *Corynebacterium glutamicum* выбрали промотор P_{tac} (SEQ ID NO: 2)

и сайт связывания рибосомы (RBS) гена триозофосфатизомеразы (SEQ ID NO: 7), относящийся к *Corynebacterium*. Ген PspA1 вместе со всей кассетой, включая RBS, нативный сигнальный пептид (SEQ ID NO: 8), усеченный ген PspA1, нативный терминатор (SEQ ID NO: 10), амплифицировали с использованием праймеров -SDTICGR0949_FP5 (5'-GAG CGA TGG ATC CTA GAA AGG TGT GTT TCA CCC ATG AAT AAG AAA AA-3') и PSPA2_2RP (5'-TCA AAT GTT CTT AAC ATG CTT TAA TTT TTA TGG TGC AGG AGC TGG TTG-3') и pTZ-PspA1 в качестве матрицы. RBS включали в прямой праймер SDTICGR0949_FP5. Область терминатора *trnB* (SEQ ID NO: 13) амплифицировали из pBE31C, имеющегося у заявителей, и лигировали с геном, кодирующим усеченный PspA1, с использованием ПЦР на основе сплайсинга путем расширения перекрытия (SOE). Ген *trnB* амплифицировали с использованием TER FP2 (5'-ATG TTA AGA ACA TTT GAC ATT TTA ATT TCG GCA CTG GCC GTC GTT-3') и TER_RP3 (5'-GCG ATA TGG ATC CCA TGA GCG GAT ACA-3'). PSPA2_2RP и TER FP2 конструировали таким образом, чтобы имело место перекрытие 17 оснований. Оба ампликона PspA1 и *trnB* добавляли в молярном соотношении 1:1 и использовали в качестве матрицы для ПЦР на основе SOE с праймерами SDTICGR0949_FP5 (5'-GAG CGA TGG ATC CTA GAA AGG TGT GTT TCA CCC ATG AAT AAG AAA AA-3') и TER_RP3 (5'-GCG ATA TGG ATC CCA TGA GCG GAT ACA-3'). Затем весь ампликон, включая RBS, нативный сигнальный пептид (SEQ ID NO: 8), усеченный ген PspA1, нативный терминатор (SEQ ID NO: 10), терминатор *trnB*, расщепляли рестриктазой, добавленной в прямой (SDTICGR0949_FP5) и обратный (TER_RP3) праймеры и клонировали в экспрессионный вектор pBE31C, сконструированный для *Corynebacterium*. Полученный клон обозначали как экспрессионную конструкцию pBE117 (фиг. 1C; SEQ ID NO: 15). Экспрессионный вектор вместе с усеченным PspA1 далее по тексту относится к экспрессионной конструкции. Ориентацию вставки (фиг. 1D) подтверждали анализом ПЦР. Последовательность усеченного гена PspA1 вместе с его экспрессионной кассетой подтверждали секвенированием ДНК.

Экспрессия усеченного PspA1.

Экспрессионную конструкцию подвергали электропорации в *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 и отбирали на чашках со средой LB с использованием канамицина в качестве селективного маркера. Собирали двадцать рекомбинантных колоний *Corynebacterium glutamicum* и анализировали с помощью ПЦР. Было отобрано пять колоний для конститутивной экспрессии усеченного PspA1. Рекомбинантные колонии вместе с *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (использовали в качестве отрицательного контроля) инокулировали в 10 мл бульона Terrific с конечной концентрацией канамицина 25 мкг/мл и инкубировали при 35°C со встряхиванием при 200 об/мин. Через 16 ч проводили вторичную инокуляцию в 10 мл той же среды, указанной выше, так что конечное значение OD составило 0,1. Культуры инкубировали при 35°C со встряхиванием при 200 об/мин в течение 18-20 ч. Через 18 ч культуральные супернатанты тестировали на экспрессию усеченного PspA1. 30 мкл супернатанта загружали в 12% SDS-PAGE и анализировали на экспрессию усеченного PspA1. Видна заметная полоса приблизительно на уровне 45 кДа.

Результаты анализа вестерн-блоттингом с использованием поликлонального антитела против pspA, специфичного к N-концевому эпитопу (SantaCruz), подтверждали экспрессию усеченного PspA1. Анализ экспрессии рекомбинантного клона 5 масштабировали до 500 мл, и экспрессия усеченного PspA1 была подтверждена, по меньшей мере, 3 раза. Усеченный PspA1 был первоначально очищен в опытах со встряхиваемыми колбами с использованием смолы СНТ типа 1 и Capto Qpress почти до 99% чистоты. Позднее после подтверждения стабильной экспрессии усеченного PspA1 в *C. glutamicum*, экспрессию масштабировали до 1,5 л.

Очистка и валидация усеченного PspA1.

800 мл культурального супернатанта, содержащего усеченный PspA1 из 1,6 л (0,66 мг/мл), полученного как описано выше, диализовали с порогом отсека по молекулярной массе 10 кДа и концентрировали до 260 мл (1,92 мг/мл). 70 мл данного диализованного концентрата подвергали очистке с использованием колонок со смолой СНТ типа 1 и Capto Q Impress. Конечное извлечение усеченного PspA1 составляло 162 мг/л.

Анализ MALDI MS/MS гелевой заслонки, содержащей очищенный усеченный PspA1 из SDS-PAGE, дал четкую оценку попадания 233 для пневмококкового поверхностного белка А. 31% покрытие последовательности (фиг. 2) было показано для белка PspA с белком с идентификационным номером NCBI ABY67187.1. Анализ интактной молекулярной массы показал, что молекулярная масса экспрессированного усеченного PspA1 составляет 35,4 кДа. Данная масса совпадает с теоретической молекулярной массой усеченного PspA1. Пик при 17725,4 представляет собой пик молекулы, имеющей заряд 2, поскольку в *m/z* пик появляется на половине интактной массы усеченного PspA1 (фиг. 3).

Пример 2. Получение усеченного PspA1.

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, несущую экспрессионную конструкцию, содержащую усеченный ген PspA1 (далее по тексту относящийся к PspA1), восстанавливали из исходного банка в среде LB. Ее использовали для инокуляции ферментера (объемом 5 л; CSTR). В процессе получения контролировали следующие параметры: pH, DO, температура (ΔT), источник углерода, метаболиты. Страте-

гия подачи, основанная на технологии автоматизации процессов (PAT), была принята для проведения короткой периодической ферментации с подпиткой для получения усеченного PspA1. Отсутствовал индукционный контроль продукта (усеченного PspA1), поскольку это был продукт, связанный с ростом. OD выхода собранного продукта составляла приблизительно 90 ($OD_{600\text{ нм}}$) на время сбора продукта в полусинтетической среде. Клетки собирали и промывали PBS перед разрушением клеток во Френч-прессе.

Очистка усеченного PspA1.

16,2 л отработанной среды с концентрацией общего белка 0,8 мг/мл было собрано из партии ферментации объемом 20 л. 16,2 л отработанной среды концентрировали до 2,6 л (3,6 мг/мл) с использованием кассеты с порогом отсечения по молекулярной массе 10 кДа 0,5 м с последующей диафильтрацией против 20 мМ фосфата калия, pH 6,8, электропроводность 3,2 мС/см. Эти 2,6 л разделяли на две партии, т. е. партию 1 объемом 1,4 л и партию 2 объемом 1,2 л, и переходили к дальнейшей очистке. 500 мл смолы СНТ I помещали в колонку HiScale 50/40. Смолу промывали стерильной дистиллированной водой с последующим уравниванием 8 объемами колонки (CV) 20 мМ фосфата калия, pH 6,8 (буфер А). 1400 мл (3,6 мг/мл) концентрата отработанной среды (партия 1) загружали на колонку и собирали проточную фракцию. Колонку промывали 5 объемами колонки буфера А. PspA1 элюировали в ступенчатом градиенте с использованием 250 мМ фосфата калия pH 6,8 (буфер В). Ступенчатый градиент включал 5 CV на стадии 40% В, 5 CV на стадии 80% В и 3 CV 0,5 М калий-фосфатного буфера. Скорость потока поддерживалась на уровне 80 мл/мин в течение всего цикла. PspA1 собирали во фракции 1 на стадии 80% В с объемом фракции 1250 мл (фиг. 4).

Capto Q Impress использовали на второй стадии хроматографии в очистке PspA1. 250 мл смолы Capto Q Impress упаковывали в колонку XK 50/20. Смолу промывали стерильной дистиллированной водой с последующим уравниванием 5 объемами колонки (CV) 20 мМ фосфата калия и 100 мМ NaCl, pH 6,8 (буфер А). 1250 мл фракции с колонки со смолой СНТ I разбавляли до 2300 мл 20 мМ фосфатом калия, pH 6,8, загружали на колонку и собирали проточную фракцию. Колонку промывали 5 объемами колонки буфера А. PspA1 элюировали с использованием 12 CV буфера В (20 мМ фосфат калия с 1 М NaCl, pH 6,2) в линейном градиенте от 0 до 40% В и на заключительной стадии 3 CV 100% В. Каждую фракцию собирали в объеме 250 мл. Скорость потока поддерживали на уровне 40 мл/мин. PspA1 собирали в линейном градиенте 40% В с объемом объединенной фракции 1250 мл (фиг. 5).

Фракции 4,5,6,7 и 8 с колонки с Capto Q объединяли, концентрировали/подвергали диафильтрации с 20 мМ фосфатом калия pH 6,8. Полученное конечное извлечение составляло 100 мл PspA1 с концентрацией 15,5 мг/мл (общее количество PspA1 составляло 1550 мг) из партии 1. Аналогичную процедуру выполняли для партии 2, и полученное конечное извлечение составило 70 мл PspA1 с концентрацией 16 мг/мл (общее количество PspA1 составляло 1120 мг) из партии 2. Очищенный PspA1 из партии 1 и партии 2 составлял 2670 мг из партии объемом 16,2 л (выход очищенного PspA1 составлял 164 мг/л) (фиг. 6).

Пример 3. Конструирование pBE114k.

Экспрессионный вектор pRSET A (коммерческий вектор от Invitrogen) модифицировали удалением гена устойчивости к ампициллину с использованием рестрикционного расщепления DraI и лигирования с расщепленным SmaI геном, кодирующим канамицин (полученным из pUC4 K1XX). Данный модифицированный вектор обозначали как pRSET-km. Усеченный PspA1 экспрессировали в *Escherichia coli* под контролем промотора PT7 (SEQ ID NO: 11) pRSET-km. Короткий участок ДНК, содержащий нативные терминаторы, включали в обратный праймер, использованный для дальнейшей амплификации PspA1. Затем весь усеченный ген PspA1 вместе с его нативным терминатором амплифицировали, расщепляли рестриктазой, добавленной в прямой и обратный праймеры, и клонировали в вектор pRSET-km. Полученный клон обозначали как pBE114k (фиг. 10А). Экспрессионный вектор вместе с усеченным PspA1 в дальнейшем по тексту относится к экспрессионной конструкции. Экспрессионную конструкцию pBE114k подтверждали рестрикционным расщеплением (фиг. 10В). Последовательность гена усеченного PspA1 вместе с его экспрессионной кассетой подтверждали секвенированием ДНК.

Экспрессия усеченного PspA1.

pBE114k трансформировали в химически компетентные клетки *Escherichia coli* DH5 α -T1R (полученные от Invitrogen) и отбирали на чашках со средой LB с канамицином, который использовали в качестве селективного маркера. Было собрано и анализировано с помощью ПЦР 40 рекомбинантных колоний *Escherichia coli*. Все 40 колоний отбирали на индуцибельную экспрессию усеченного PspA1. Рекомбинантные колонии вместе с *Escherichia coli* (в качестве отрицательного контроля) инокулировали в 10 мл бульона Terrific с конечной концентрацией канамицина 25 мкг/мл и инкубировали при 37°C со встряхиванием при 200 об/мин. В середине логарифмической фазы роста добавляли 1 мМ IPTG для индукции экспрессии PspA1 в *Escherichia coli* (pBE114k). Культуры инкубировали при 30°C со встряхиванием при 200 об/мин в течение 16 ч после индукции. Через 16 ч культуральные супернатанты тестировали на экспрессию усеченного PspA1. Клетки собирали центрифугированием, лизировали и загружали в 12% SDS-PAGE и анализировали на экспрессию усеченного PspA1. Видна заметная полоса приблизительно на уровне 65 кДа. Анализ вестерн-блоттингом с использованием поликлонального антитела против PspA, специфичного к

N-концевому эпиту (SantaCruz), подтвердил экспрессию усеченного PspA1. Анализ экспрессии рекомбинантного клона 29 подтвердил экспрессию усеченного PspA1 по меньшей мере 3 раза. Усеченный PspA1 первоначально очищали в экспериментах со встряхиваемыми колбами с использованием колонок со смолой СНТ типа 1 и Capto Q Impress.

Очистка и валидация усеченного PspA1.

Отбирали 40 г (влажная масса) клеточного осадка из *Escherichia coli* (pBE114k) и ресуспендировали в 400 мл 20 мМ калий-фосфатного буфера с pH 6,8, содержащего 1 мг/мл лизоцима и 1 мМ PMSF. Клеточную суспензию лизировали с использованием гомогенизатора высокого давления за 3 хода при 1000 фунт/кв. дюйм. 400 мл клеточного лизата с общей концентрацией белка 4 мг/мл разбавляли до 750 мл 20 мМ калий-фосфатным буфером pH 6,8 и очищали, используя смолу СНТ I, и затем смолу Capto Q Impress на второй стадии хроматографии.

250 мл смолы СНТ I помещали в колонку HiScale 50/20. Смолу промывали стерильной дистиллированной водой с последующим уравниванием 5 объемами колонки (CV) буфера А. 750 мл разбавленного клеточного лизата загружали на колонку и собирали проточную фракцию. Колонку промывали 5 объемами колонки буфера А. PspA1 элюировали в ступенчатом градиенте, используя 250 мМ фосфат калия, pH 6,8, электропроводность 29,5 мС/см (буфер В). Ступенчатый градиент включал 5 CV на стадии 50% буфера В, 5 CV на стадии 80% буфера В, и колонку промывали 3 CV 0,5 М фосфатно-калиевого буфера pH 6,8, электропроводность 48 мС/см (буфер С). Скорость потока поддерживали на уровне 40 мл/мин в течение всего цикла. Фракции пика белка PspA1 собирали вручную, пул элюированных фракций 5, 6 и 7 на стадии 80% В с конечным объемом 350 мл (фиг. 11).

Capto Q Impress использовали на второй стадии хроматографии в очистке PspA1. 60 мл смолы Capto Q Impress упаковывали в колонку ХК 26/20. Смолу промывали стерильной дистиллированной водой с последующим уравниванием 5 объемами колонки (CV) 20 мМ фосфата калия и 100 мМ NaCl, pH 6,8, электропроводность 13,6 мС/см (буфер А). 350 мл фракции с колонки с СНТ I разбавляли до 700 мл 1 мМ фосфатом калия, pH 6,8, загружали на колонку и собирали проточную фракцию. Колонку промывали 5 объемами колонки буфера А. PspA1 элюировали с использованием линейного градиента из 10 объемов колонки буфера В (20 мМ фосфат калия с 1 М NaCl, pH 6,2, электропроводность 89 мС/см) в линейном градиенте от 0 до 40% В, которые собирали вручную, фракции 4-8, 10 и 11 составляли 60 мл, и фракции 9 и 12 составляли 100 мл (фиг. 12). На заключительной стадии из 3 CV 100% В, собирали 180 мл в виде фракции 13. Скорость потока поддерживали на уровне 10 мл/мин. Белок PspA1 собирали во фракции 9 в линейном градиенте 40% В, которая составляла 100 мл.

Собирали фракцию 9 с колонки с Capto Q, концентрировали/подвергали диафильтрации с 20 мМ фосфатом калия, pH 6,8. Полученное конечное извлечение составляло 100 мл PspA1 с концентрацией 5 мг/мл белка (общий белок PspA1 равнялся 500 мг) из 400 мл клеточного лизата с концентрацией 4 мг/мл. % извлечения составил 31,25.

Анализ MALDI MS/MS гелевой заслонки, содержащей очищенный усеченный PspA1 из SDS-PAGE, дал четкую оценку попадания 223 для поверхностного пневмококкового белка А. 39% покрытие последовательности (фиг. 13) было показано для белка PspA с белком с идентификационным номером NCBI WP_050210652.1.

Анализ интактной молекулярной массы показал, что молекулярная масса экспрессированного усеченного PspA1 составляет 41,96 кДа. Анализ интактной массы усеченного PspA1, экспрессированного в *Escherichia coli*, показал 41966 Да (41,9 кДа), что совпадает с теоретической молекулярной массой усеченного PspA1. Пик при 20982,7 Да является пиком молекулы, имеющей заряд 2, поскольку в m/z пик появляется на половине интактной массы усеченного PspA1 (фиг. 14).

Пример 4. Конъюгация отдельного пневмококкового полисахарида с белком-носителем с образованием конъюгатов полисахарид-усеченный PspA1.

Активация серотипа 3 и конъюгация с усеченным PspA1.

Серотип 3 (6,0 мл PS, концентрация 10 мг/мл) и CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.) в приблизительном соотношении по размеру 1:1 смешивали в стеклянном флаконе и перемешивали в течение 1 мин. pH пневмококкового полисахарида серотипа 3 доводили до 9,25 с использованием 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 3 мин при комнатной температуре (RT). Усеченный PspA1 (4,0 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) добавляли к активированному серотипу 3 в соотношении 1:1 (усеченный PspA1:серотип 3).

pH реакционной смеси доводили до 9,05 с использованием 0,2 М триэтиламина, и реакцию продолжали при перемешивании в течение 5 ч при комнатной температуре, и, наконец, реакцию гасили добавлением избыточной концентрации глицина.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации, используя мембрану с порогом отсека по молекулярной массе 100 кДа, и очищали с помощью эксклюзионной хроматографии, где сплошная линия соответствует полисахаридам и пунктирная линия - усеченному PspA1, и 5-часовая реакция представлена пунктирной линией на хроматограмме А (фиг. 7). Фракции анализировали антроновым методом SEC-MALLS, фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и стерилизовали фильтрованием с использованием 0,2 мкм фильтров. Далее данный материал называется моновалентным конъюгатом (конъюгат

серотип 3-усеченный PspA1).

Активация серотипа 6A и конъюгация с усеченным PspA1.

Серотип 6A (6,0 мл PS, концентрация 10 мг/мл) и CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.) в приблизительном соотношении по размеру 1:1 смешивали в стеклянном флаконе и перемешивали в течение 1 мин. pH пневмококкового полисахарида серотипа 6A доводили до 9,25 с использованием 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 3 мин при комнатной температуре (RT). Усеченный PspA1 (4,0 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) добавляли к активированному серотипу 6A в соотношении 1:1 (усеченный PspA1: серотип 6A).

pH реакционной смеси доводили приблизительно до 9,05 с использованием 0,2 М триэтиламина, и реакцию продолжали при перемешивании в течение 5 ч при комнатной температуре, и, наконец, реакцию гасили добавлением избыточной концентрации глицина.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации, используя мембрану с порогом отсека по молекулярной массе 100 кДа, и очищали с помощью эксклюзионной хроматографии, где сплошная линия соответствует полисахаридам, и пунктирная линия соответствует усеченному PspA1, и 5-часовая реакция представлена пунктирной линией на хроматограмме B (фиг. 7). Фракции анализировали антроновым методом SEC-MALLS, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и стерилизовали фильтрованием с использованием фильтров 0,2 мкм. Далее данный материал называется моновалентным конъюгатом (конъюгат серотип 6A-усеченный PspA1).

Активация серотипа 6B и конъюгация с усеченным PspA1.

Серотип 6B (6,0 мл PS, концентрация 10 мг/мл) и CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.) в приблизительном соотношении по размеру 1:1 смешивали в стеклянном флаконе и перемешивали в течение 1 мин. pH пневмококкового полисахарида серотипа 6B доводили до 9,25 с использованием 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 3 мин при комнатной температуре (RT). Усеченный PspA1 (4,0 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) добавляли к активированному серотипу 6B в соотношении 1:1 (усеченный PspA1: серотип 6B).

pH реакционной смеси доводили до 9,05 с использованием 0,2 М триэтиламина, и реакцию продолжали при перемешивании в течение 5 ч при комнатной температуре, и, наконец, реакцию гасили добавлением избыточной концентрации глицина.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации с использованием мембраны с порогом отсека по молекулярной массе 100 кДа и очищали с помощью эксклюзионной хроматографии, где сплошная линия соответствует полисахаридам, и пунктирная линия соответствует усеченному PspA1, и 5-ч реакция представлена пунктирной линией на хроматограмме C (фиг. 7). Фракции анализировали антроновым методом SEC-MALLS, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и стерилизовали фильтрованием с использованием 0,2 мкм фильтров. Далее данный материал называется моновалентным конъюгатом (конъюгат серотип 6B-усеченный PspA1).

Пример 5. Исследование иммуногенности конъюгированной вакцины.

Готовили два состава, содержащие 2,2 или 4,4 мкг серотипов 3, 6A и 6B, каждый конъюгированный с усеченным PspA1, содержащих 2,2 мкг серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, каждый конъюгированный с CRM₁₉₇. Эти конъюгаты были адсорбированы на A1-гидрогеле.

Кроликов с массой тела 1,5-2 кг разделяли на группы по 7 животных в каждой и иммунизировали вышеуказанными составами конъюгатов. Образцы сыворотки крови анализировали до и после иммунизации. Сыворотку, полученную от иммунизированных кроликов, анализировали на наличие полисахарид-специфических антител в непрямом ELISA.

Титр сывороточных антител у иммунизированных кроликов определяли с использованием непрямого ELISA. Планшеты для микротитрования, покрытые специфическими полисахаридами, подвергали взаимодействию с сывороточными антителами. Сыворотку кроликов до иммунизации, после 1 и 2 дозы использовали для анализа, где на оси Y представлен титр антител, полученный с использованием обратного значения максимального разведения, которое дало ELISA OD₄₅₀ выше порогового значения. Титр сывороточных антител у кроликов до иммунизации был ниже предела обнаружения. Пустые столбцы указывают титр после введения первой дозы вакцины, и черные сплошные столбцы указывают титр антител после введения второй дозы вакцины (фиг. 8 и 9). Наблюдали дозозависимое увеличение титров как серотипа, конъюгированного с усеченным PspA1, так и для серотипа конъюгированного с CRM₁₉₇. Титры антител на полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, не ингибировались присутствием конъюгатов с усеченным PspA1 и наоборот. Это указывает на то, что усеченный PspA1 можно использовать в качестве альтернативного белка-носителя для полисахарид-белковой конъюгированной вакцины.

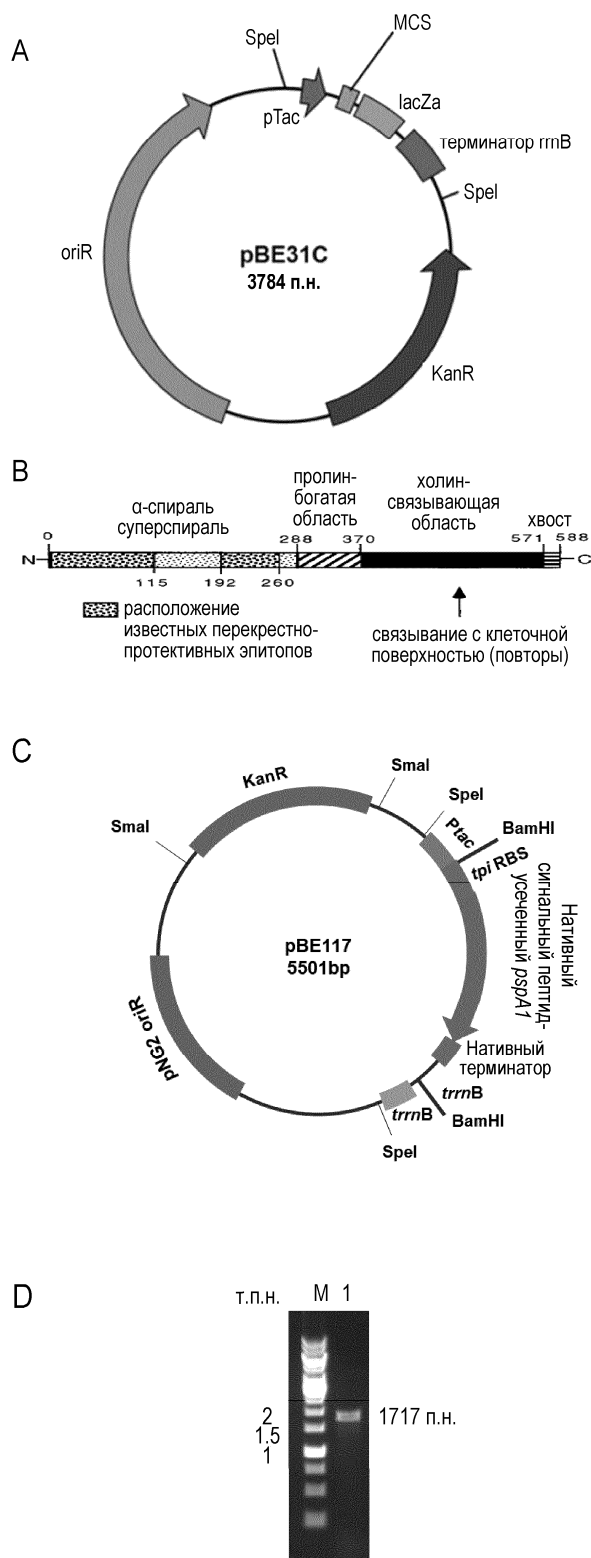
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, кодирующая усеченный пневмококковый поверхностный белок A1 (PspA1), приведенная в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

2. Экспрессионная конструкция для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, содержащая

- а) ген, кодирующий усеченный PspA1, с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6;
 - б) ориджин репликации;
 - с) ген устойчивости к антибиотикам;
 - д) промотор; и
 - е) сайт связывания рибосомы.
3. Экспрессионная конструкция по п.2, в которой ген устойчивости к антибиотикам представляет ген устойчивости к канамицину.
4. Экспрессионная конструкция по п.2, содержащая
- а) *ori* R в качестве ориджина репликации;
 - б) ген устойчивости к канамицину в качестве гена устойчивости к антибиотикам;
 - с) P_{tac} в качестве промотора; и
 - д) представляющий интерес ген, кодирующий усеченный PspA1, с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.
5. Экспрессионная конструкция по п.2, содержащая
- а) *rUC* в качестве ориджина репликации;
 - б) ген устойчивости к канамицину в качестве гена устойчивости к антибиотикам;
 - с) P_{T7} в качестве промотора; и
 - д) представляющий интерес ген, кодирующий усеченный PspA1, с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6.
6. Экспрессионная конструкция по п.5, дополнительно содержащая сайт связывания рибосомы гена триозофосфатизомеразы с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7.
7. Экспрессионная конструкция для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (SEQ ID NO: 3) в *Corynebacterium glutamicum*, которая содержит
- а) ген, кодирующий усеченный PspA1, приведенный в SEQ ID NO: 5;
 - б) ориджин репликации *ori* R, имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;
 - с) ген устойчивости к канамицину, имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1;
 - д) промотор P_{tac} , имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; и
 - е) сайт связывания рибосомы гена триозофосфатизомеразы.
8. Экспрессионная конструкция для высокоуровневой экспрессии усеченного PspA1 (SEQ ID NO: 4) в *Escherichia coli*, которая содержит
- а) ген, кодирующий усеченный PspA1, приведенный в SEQ ID NO: 6;
 - б) ориджин репликации *rUC*;
 - с) ген устойчивости к канамицину, имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1;
 - д) промотор P_{T7} , имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; и
 - е) сайт связывания рибосомы.
9. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по любому из пп.2-8.
10. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.9, где хозяином является *Corynebacterium glutamicum* или *Escherichia coli*.
11. Способ высокоуровневой экспрессии усеченного *Streptococcus pneumoniae* PspA1 (пневмококкового поверхностного белка A1), который включает культивирование бактерий, трансформированных экспрессионной конструкцией по любому из пп.2-8, и очистку усеченного PspA1, экспрессированного экспрессионной конструкцией.
12. Способ высокоуровневой экспрессии и очистки усеченного PspA1 по п.11, где выход усеченного PspA1 составляет приблизительно 500 мг/л, приблизительно 400 мг/л, приблизительно 300 мг/л, приблизительно 250 мг/л, приблизительно 220 мг/л, приблизительно 200 мг/л, приблизительно 180 мг/л, приблизительно 160 мг/л, приблизительно 150 мг/л, приблизительно 120 мг/л или приблизительно 100 мг/л.
13. Пневмококковая конъюгированная вакцина, содержащая по меньшей мере один полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипов, выбранных из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, конъюгированный с усеченным PspA1, приведенным в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, или комбинацией усеченного PspA1, приведенного в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, и других белков-носителей, выбранных из группы, включающей CRM₁₉₇, столбнячный анатоксин, коклюшный анатоксин и PsaA.
14. Вакцинная композиция по п.13, где вакцина представляет поливалентную вакцину, выбранную из 10-валентной, 14-валентной, 15-валентной, 17-валентной, 18-валентной, 19-валентной, 20-валентной, 22-валентной, 23-валентной, 24-валентной и 25-валентной вакцины.
15. Поливалентная конъюгированная вакцина по п.13, содержащая по меньшей мере три полисахарида из *Streptococcus pneumoniae* серотипов 3, 6A и 6B, конъюгированные с усеченным PspA1 с последова-

тельностью, приведенной в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, и из *Streptococcus pneumoniae* серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с CRM₁₉₇.



Фиг. 1

Покрывание последовательности белка: 31%

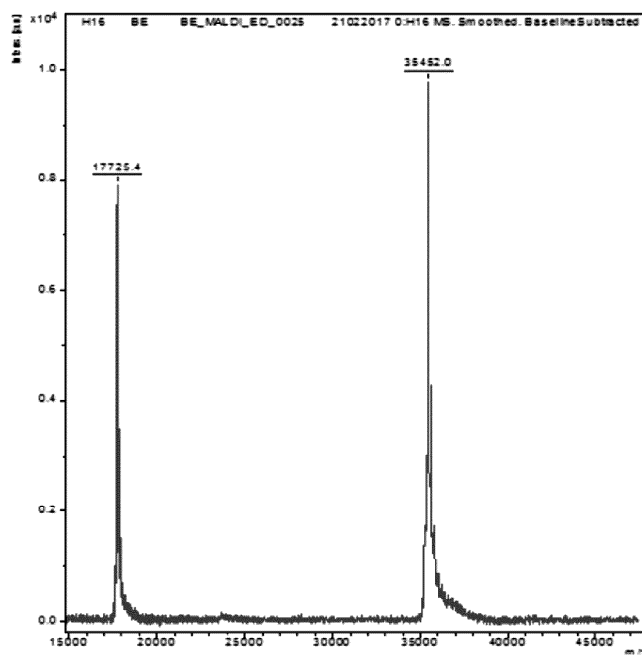
Подчеркнуты совпадающие пептиды

```

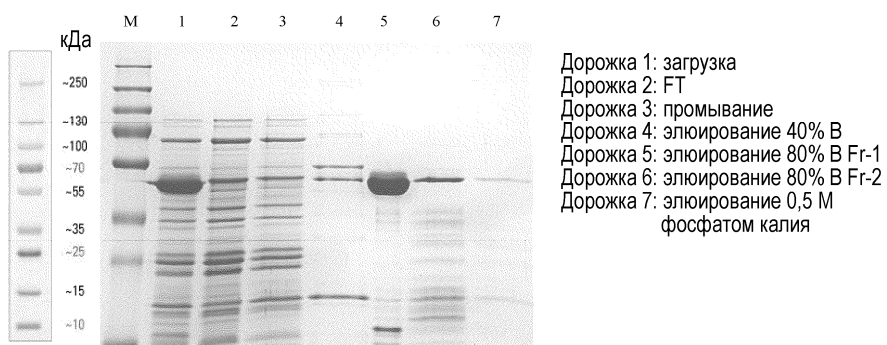
1  ASSFTVVPAAE DAPVANQSKA EKDYDAAKRD AENAKKALED AKRAQKKYKD
51  DQKITTEKAE EEKKASQEQQ KANLDYQQKL RKYINEKDSK KRSMLQKEME
101 EAERKDKKQK AEFKKIREKV IPSAEELTET RRKAEAEAK EFELTKKVKE
151 AEEKVTEAKQ KIDAERAKEV ALQAKIAELE NEVERLETKL KETDESSED
201 YVKEGLRAPL QSELDKQAK LSKLEELSDK IDELDARIK LEKQVEDFKN
251 SDGEYSALYL EAAEKDLAAK KAELEKTEAD LKKAVNEFEK PAPAPETFPAP
301 EAPAEQPKPA PAPQFAPAPK FEKPAEQPKP EKTDDQQAEE DYARRSEEBY
351 NRLTQQQFPK AEKFAFAPKP EQFAPGT

```

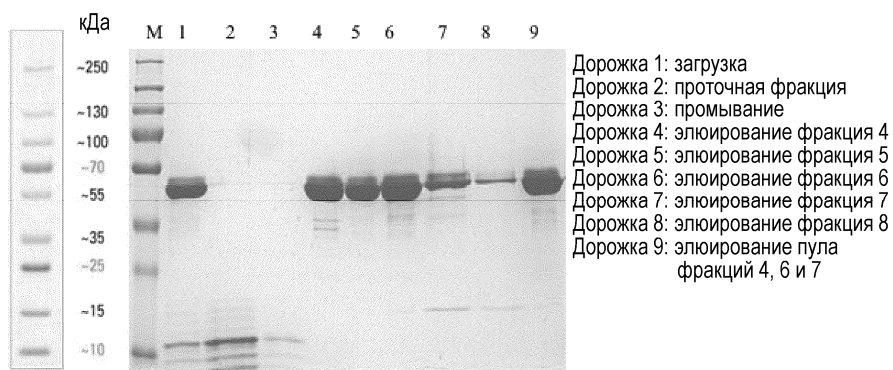
Фиг. 2



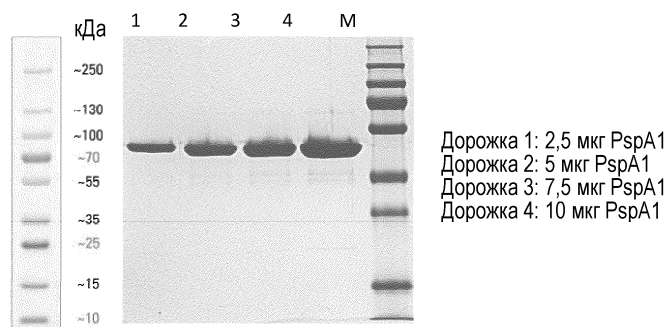
Фиг. 3



Фиг. 4

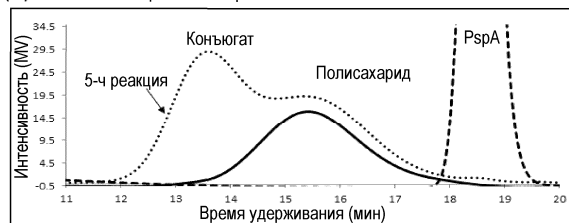


Фиг. 5

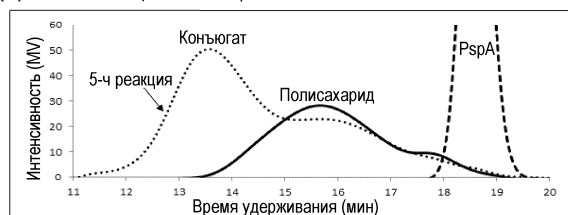


Фиг. 6

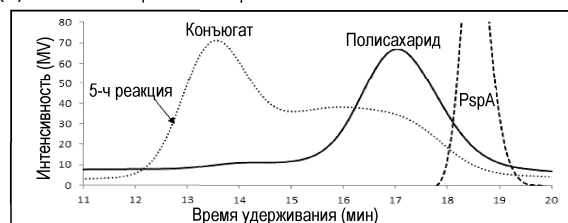
(А) Конъюгат серотип 3-Psp A



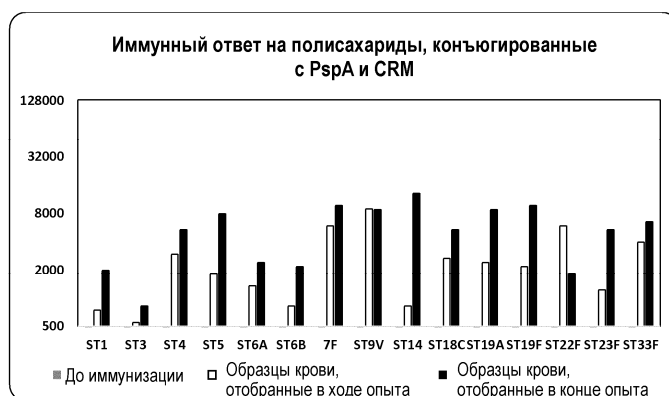
(В) Конъюгат серотип 6A-Psp A



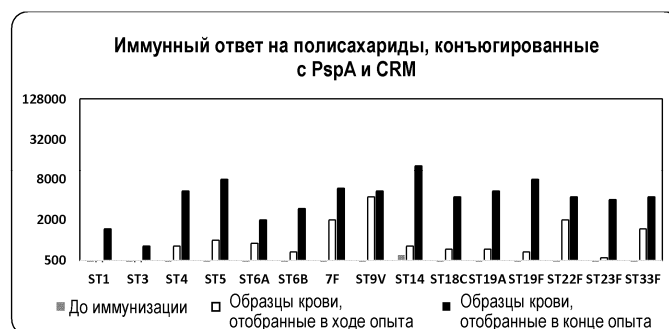
(С) Конъюгат серотип 6B-Psp A



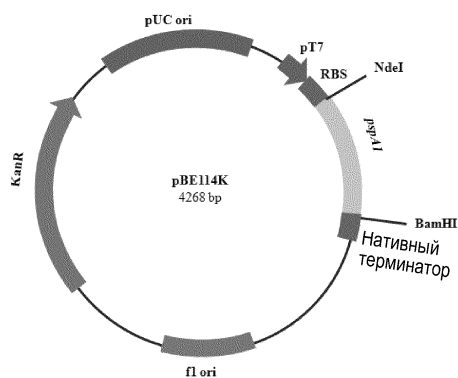
Фиг. 7



Фиг. 8

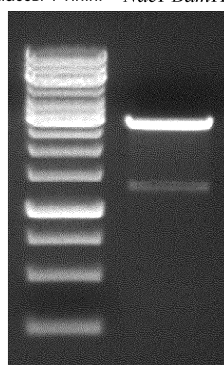


Фиг. 9



А

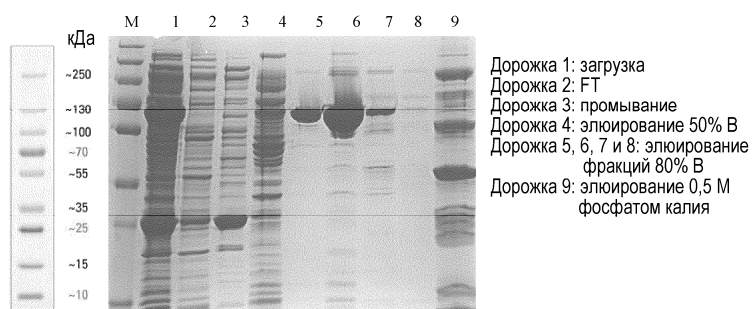
Маркер
молекулярной
массы 1 т.п.н. pBE114k/
NdeI-BamHI



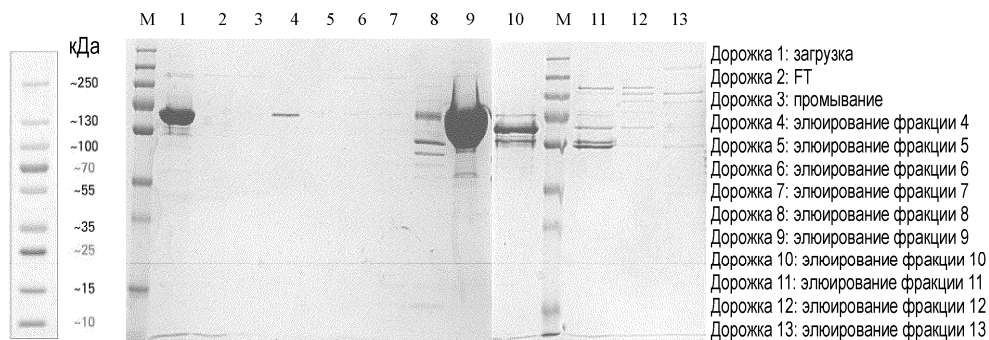
1154 п.н.

В

Фиг. 10



Фиг. 11



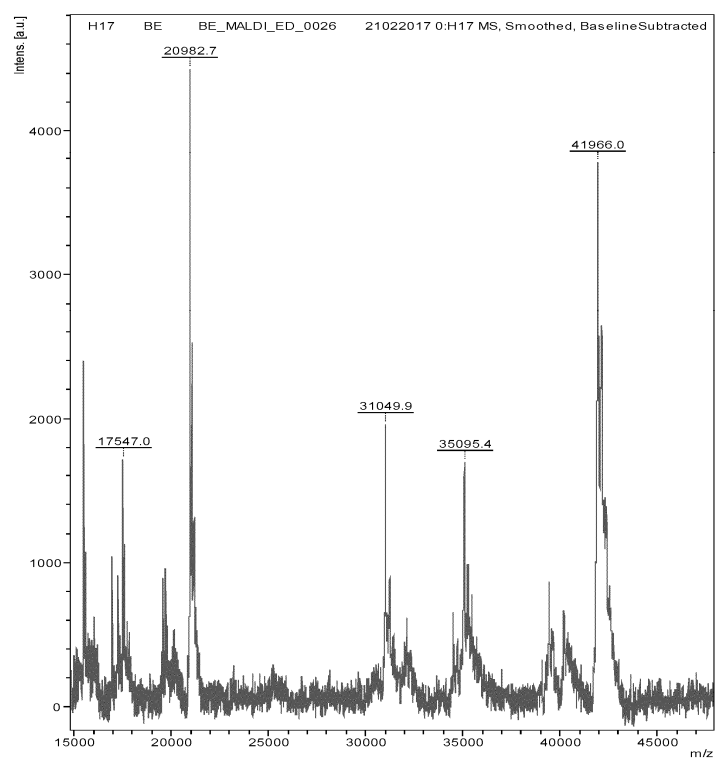
Фиг. 12

Покрытие последовательности белка: 39%

Подчеркнуты совпадающие пептиды

1	MNKKKMILTS	LASVAILGAG	FVASSPTVVR	AEDAPVANQS	<u>KAEKDYDAAK</u>
51	<u>RD</u> ENAKKAL	<u>ED</u> AKRAQKKY	<u>KDDQ</u> KITEEK	AEEKKASQE	<u>QOKANLDYQQ</u>
101	<u>KLR</u> KYINEKD	<u>SKKRS</u> MLQKE	<u>MEE</u> AEKKDKE	KQAEFKKIRE	<u>KVIPSAEELT</u>
151	<u>ETRR</u> KAEEAE	<u>AK</u> EPELTKKV	<u>KEA</u> EKKVTEA	<u>KQK</u> LDAERAK	<u>EVALQAKIAE</u>
201	<u>LENE</u> VHRLT	<u>KL</u> KEIDESDS	<u>EDYV</u> KEGLRA	PLQSELDKQ	AKLSKLEELS
251	DKIDELDAEI	AKLEKDVEDF	KNSDGEYSAL	YLEAAEKDLA	AKKAELEKTE
301	ADLKKA V DEP	EKPAPAPETP	APEAPAEQPK	PAPAPQFAPA	PKPEKPAEQP
351	KPEKTDDQQA	EEDYARRSEE	EYNRLTQQQP	<u>PKAEK</u> PAPAP	<u>KPEQ</u> PAPAPK

Фиг. 13



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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