



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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.09.13**

**(21)** Номер заявки  
**201270082**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2010.06.28**

**(51)** Int. Cl. **C12N 9/36 (2006.01)**  
**C12N 9/52 (2006.01)**

**(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ**

**(31)** **09163955.9**

**(32)** **2009.06.26**

**(33)** **EP**

**(43)** **2012.06.29**

**(86)** **PCT/EP2010/059152**

**(87)** **WO 2010/149795 2010.12.29**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЛИСАНДО АГ (LI)**

**(72)** Изобретатель:  
**Миллер Стефан (DE)**

**(74)** Представитель:  
**Явкина Е.В. (RU)**

**(56)** **WO-A2-2010023207**

DONOVAN D.M. ET AL.: "Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD-, DOI: 10.1128/AEM.72.4.2988-2996.2006, vol. 72, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 2988-2996, XP002582772, ISSN: 0099-2240, abstract

ARIMA H. ET AL.: "Bactericidal action of lysozymes attached with various sizes of hydrophobic peptides to the C-terminal using genetic modification", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD-, DOI: 10.1016/S0014-5793(97)01071-5, vol. 415, no. 1, 22 September 1997 (1997-09-22), pages 114-118, XP004261147, ISSN: 0014-5793, abstract

MANOHARADAS S. ET AL.: "Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards Staphylococcus aureus", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL LNKD-, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2008.09.003, vol. 139, no. 1, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 118-123, XP025796283, ISSN: 0168-1656 [retrieved on 2008-09-26], abstract

IBRAHIM H.R. ET AL.: "Enhanced bactericidal action of lysozyme to Escherichia coli by inserting a hydrophobic pentapeptide into its C terminus", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US, vol. 269, no. 7, 18 February 1994 (1994-02-18), pages 5059-5063, XP002579297, ISSN: 0021-9258, page 5059

DIAZ E. ET AL.: "CHIMERIC PHAGE-BACTERIAL ENZYMES A CLUE TO THE MODULAR EVOLUTION OF GENES", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US LNKD-, DOI: 10.1073/PNAS.87.20.8125, vol. 87, no. 20, 1 October 1990 (1990-10-01), pages 8125-8129, XP002477600, ISSN: 0027-8424, figures 1, 2, left-hand column, paragraph 1 - page 8127

LOPEZ R. ET AL.: "Enzymes for anti-infective therapy: phage lysins", DRUG DISCOVERY TODAY: THERAPEUTIC STRATEGIES, ELSEVIER LNKD-, DOI: 10.1016/J.DDSTR.2004.09.002, vol. 1, no. 4, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 469-474, XP004694307, ISSN: 1740-6773, figure 3, page 473, right-hand column

JADO ISABEL ET AL.: "Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae infection in a murine sepsis model", JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, vol. 52, no. 6, December 2003 (2003-12), pages 967-973, XP002597152, ISSN: 0305-7453, the whole document

CONLON ET AL.: "Peptidomic analysis of skin secretions supports separate species status for the tailed frogs, Ascaphus truei and Ascaphus montanus", COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. PART D: GENOMICS AND PROTEOMICS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD-, DOI: 10.1016/J.CBD.2007.01.003, vol. 2, no. 2, 27 April 2007 (2007-04-27), pages 121-125, XP022052772, ISSN: 1744-117X, the whole document

**(57)** Изобретение относится к антимикробным агентам, активным в отношении грамположительных бактерий, а именно к слитым белкам, включающим эндолизин с функцией разрушения клеточной стенки грамположительных бактерий и амфипатическую пептидную цепь, слитую с эндолизином на N- и/или C-конце. Помимо этого, изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим заявленный слитый белок, векторам, включающим заявленные молекулы нуклеиновой кислоты, и клеткам-хозяевам, содержащим либо заявленные молекулы нуклеиновой кислоты, либо заявленные векторы. Дополнительно, изобретение относится к применению заявленного слитого белка в качестве медикаментозного препарата, в частности, в лечении или профилактике инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, в качестве

средства диагностики или компонента косметического препарата. Изобретение также относится к обработке или профилактике заражения грамположительными бактериями пищевых продуктов, оборудования на предприятиях пищевой промышленности, поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами, медицинского оборудования, поверхностей в стационарах и хирургических блоках. Помимо этого, изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим заявленный слитый белок.

038542 B1

038542 B1

---

Заявленное изобретение относится к антимикробным агентам, активным в отношении грамположительных бактерий, а именно к слитым белкам, включающим эндолизин с функцией разрушения клеточной стенки грамположительных бактерий и амфипатическую пептидную цепь, слитую с эндолизином на N- и/или C-конце. Помимо этого, заявленное изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим заявленный слитый белок, векторам, включающим заявленные молекулы нуклеиновой кислоты и клеткам-хозяевам, содержащим либо заявленные молекулы нуклеиновой кислоты, либо заявленные векторы. Дополнительно, заявленное изобретение относится к применению заявленного слитого белка в качестве медикаментозного препарата, в частности, в лечении или профилактике инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, в качестве средства диагностики или компонента косметического препарата. Заявленное изобретение также относится к обработке или профилактике заражения грамположительными бактериями пищевых продуктов, оборудования на предприятиях пищевой промышленности, поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами, медицинского оборудования, поверхностей в стационарах и хирургических блоках. Помимо этого, заявленное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим заявленный слитый белок.

По сравнению с грамотрицательными бактериями грамположительные бактерии не имеют внешней мембраны. Цитоплазматическая мембрана окружена слоем пептидогликана толщиной до 25 нм (который составляет всего максимум 5 нм в грамотрицательных бактериях), который образует стенку бактерии. Основной функцией клеточной стенки грамположительных бактерий является стабилизация формы бактерии и уравнивание внутреннего давления бактерии. Пептидогликан или муреин представляет собой полимер, состоящий из сахаров и аминокислот. Сахарный компонент состоит из чередующихся остатков  $\beta$ -(1,4) связанных остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Пептидная цепь из трех-пяти аминокислот прикрепляется к N-ацетилмурамовой кислоте. Пептидная цепь может быть перекрестно сшита с пептидной цепью другого штамма, образующего слой с трехмерной сетчатой структурой. Пептидная цепь может содержать D- и L-аминокислотные остатки, а состав может меняться в зависимости от действия на различные бактерии.

Особенный случай представляют микобактерии, которые, как правило, являются грамположительными. Недавно опытным путем было доказано, что микобактерии имеют внешнюю клеточную мембрану. У всех микобактерий наблюдается характерная толстая клеточная стенка, которая является гидрофобной, амилоидной (податливой), с повышенным содержанием миколевых кислот/миколатов. Клеточная стенка состоит из гидрофобного слоя миколатов и слоя пептидогликанов, скрепленных арабиногалактаном (полисахаридом). Для проникновения через толстую клеточную стенку микобактерий путем разрушения полисахаридного слоя может быть необходимо совместное действие новых антимикробных агентов с хитиназой или аналогичным белком.

Известны различные типы агентов с бактерицидным или бактериостатическим действием, например антибиотики, эндолизины, антимикробные пептиды и дефензины. Возрастающая микробная устойчивость в отношении антибиотиков тем не менее создает проблемы в лечении все большего числа инфекций, вызываемых бактериями, в частности, что касается инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, как, например, *Staphylococcus aureus*, *Enterococci*, *Streptococci*, *Listeria monocytogenes* и *Clostridium difficile*, в особенности, например, устойчивыми к метициллину *Staphylococcus aureus* и устойчивыми к ванкомицину *Enterococci*.

Эндолизины представляют собой пептидогликангидролазы, кодированные бактериофагами (или бактериальными вирусами). Они синтезируются во время экспрессии "поздних" генов в литическом цикле мультимпликации фагов и опосредуют высвобождение прогенных вирионов из инфицированных клеток путем разрушения бактериального пептидогликана.

Они являются либо  $\beta$ (1,4)-гликолазами (лизосомами), трансгликолазами, амидазами, либо эндопептидазами. Антимикробное применение эндолизинов было предложено еще в 1991 г. Gasson (GB2243611). Несмотря на то, что способность к уничтожению микробов, наблюдаемая у эндолизинов, известна в течение длительного времени, использование данных энзимов в качестве антимикробных веществ игнорировали по причине успешного и доминирующего применения антибиотиков. Только после обнаружения бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам, стали проявлять интерес к применению эндолизинов в качестве препаратов против патогенных микроорганизмов, вызывающих заболевания у человека. Возникла насущная потребность в разработке совершенно новых классов антибактериальных агентов, и эндолизины, используемые в качестве "энзибиотиков" - термин-гибрид ("энзимы" и "антибиотики"), прекрасно выполняют данную функцию. В 2001, Fischetti и соавторы впервые продемонстрировали терапевтический потенциал эндолизина бактериофага C1 в отношении стрептококков группы A (Nelson et al., 2001). С того времени множество публикаций подтвердили функцию эндолизинов в качестве приемлемого и дополнительного альтернативного средства для контроля бактериальных инфекций, вызываемых, в частности, грамположительными бактериями. Впоследствии была доказана эффективность в качестве энзибиотиков у различных эндолизинов, активных в отношении других грамположительных патогенов, как, например, *Streptococcus pneumoniae* (Loeffler и соавторы, 2001), *Bacillus anthracis* (Schuch и соавторы, 2002), *S. agalactiae* (Cheng и соавторы, 2005) и *Staphylococcus aureus* (Rashel и соав-

торы, 2007). Тем не менее также известно, что эндолизины могут, при определенных условиях (например, больших значениях ионной силы), образовывать стабильный протопласт в случаях, когда внутреннего клеточного давления бактерии недостаточно для активации клеточного бурста. При упомянутых условиях клеточная стенка бактерии может регенерировать и бактерия выживает.

Антимикробные пептиды (АМП) представляют широкий спектр малых, катионных, генкодируемых пептидных антибиотиков, которые можно обнаружить в практически любом организме. Различные АМП обладают различными свойствами, многие пептиды в данном классе являются предметом интенсивных научных исследований не только как антибиотики, но также как образцы для создания пептидов, проникающих через клеточную стенку. Несмотря на наличие нескольких схожих свойств (например, катионность, амфипатичность и малый размер), существует огромное разнообразие последовательностей АМП, и в связи с этим предложили как минимум четыре структурные группы (альфа-спиральные, бета-складчатые, растянутые и закольцованные) для систематизации всего разнообразия наблюдаемых АМП. Аналогичным образом, по мере появления новых антибиотиков было предложено несколько вариантов механизма действия и было доказано, что, например, основной мишенью многих из этих пептидов является клеточная мембрана, в то время как основной мишенью для других пептидов является проникновение в цитоплазматическую мембрану и нарушение основных функций метаболизма. АМП могут приобретать концентрацию, достаточную для синергического действия, несмотря на отсутствие специфического связывания мишеней; например, путем образования поры в мембране, как, например, в случае многих АМП. Тем не менее, данное явление наблюдается только в модельных фосфолипидных бислоях, а, в некоторых случаях, концентрация АМП в мембране была настолько высока, что необходимо соотношение одной пептидной молекулы на шесть фосфолипидных молекул. Данные концентрации приближаются к, и практически эквивалентны, состоянию полной мембранной насыщенности. Поскольку минимальная подавляющая концентрация (МПК) для АМП, как правило, находится в пределах низкого микромолярного диапазона, значимость определения данных значений и их роль в проведении опытов *in vivo* сопровождается совершенно объяснимым скептицизмом (Melo et al., *Nature reviews, Microbiology*, 2009, 245).

Дефензины представляют собой большую группу малых, катионных, с повышенным содержанием цистеина и аргинина антимикробных пептидов, присутствующих как в позвоночной, так и межпозвоночной тканях. Дефензины подразделяют на пять групп в соответствии с сеткой размещения цистеинов: растительные, межпозвоночные,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\theta$ -дефензины. Последние три в большинстве случаев встречаются у млекопитающих,  $\alpha$ -дефензины представляют собой белки, встречающиеся в нейтрофилах, и эпителии ЖКТ.  $\beta$ -дефензины по преимуществу являются наиболее широко встречающимися и вырабатываются лейкоцитами и эпителиальными клетками различных видов. До настоящего времени  $\theta$ -дефензины редко обнаруживали, например, в лейкоцитах макак-резусов. Дефензины проявляют активность в отношении бактерий, грибов и многих вирусов с оболочкой и без. Тем не менее для эффективного уничтожения бактерий необходимы по преимуществу высокие концентрации, например, в микромолярном диапазоне. Активность многих пептидов может снижаться в условиях, приближенных к условиям физиологической соли, бивалентных катионов и сыворотки. В зависимости от содержания гидрофобных аминокислотных остатков, дефензины также проявляют гемолитическую активность.

Таким образом, присутствует необходимость в разработке новых антимикробных агентов, активных в отношении грамположительных бактерий.

Данной цели достигают путем практического воплощения сути заявленного изобретения, изложенного в формуле изобретения.

Термин "белок" в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, синонимично соотносится с термином "полипептид". Термин "белок" в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к линейному полимеру аминокислотных остатков, связанных пептидными связями в специфичной последовательности. Аминокислотные остатки белка могут быть модифицированы, например, ковалентными прикреплениями различных групп, как, например, углеводы и фосфаты. Прочие вещества могут быть более свободно ассоциированы с полипептидными цепочками, как, например, гемы или липиды, приводя к образованию конъюгированных белков, которые также обозначают термином "белок" в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения. Описаны различные варианты с включением полипептидных цепей, в частности, что касается присутствия альфа-спиральных и бета-складчатых структур. Термин "белок", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к четырем классам белков, а именно альфа, бета, альфа/бета и альфа-плюс-бета. Помимо этого, термин "белок" относится к комплексному соединению, причем комплекс представляет собой гомомер.

Термин "слитый белок", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к продукту экспрессии, являющемуся результатом слияния двух последовательностей нуклеиновых кислот. Такой белок получают, например, в системах экспрессии рекомбинантных ДНК. Помимо этого, термин "слитый белок", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к слиянию первой аминокислотной последовательности, как, например, энзиму,

со второй или последующими аминокислотными последовательностями. Вторая или последующие аминокислотные последовательности могут определять домен или прочие участки пептидной цепи. Более предпочтительно упомянутые вторая или последующие аминокислотные последовательности чужеродны и по преимуществу не гомологичны с любой областью первой аминокислотной последовательности.

Термин "пептидная цепь", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к любому типу пептида, связанного с белком, например с энзимом.

Термин "пептид", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к малым полипептидам, содержащим от примерно 2 до примерно 100 аминокислотных остатков, более предпочтительно от примерно 4 до примерно 50 аминокислотных остатков, наиболее предпочтительно от примерно 5 до 30 аминокислотных остатков, причем аминокислотная группа одного аминокислотного остатка соединена пептидной связью с карбоксигруппой другого аминокислотного остатка. Пептид может обладать специфической функцией. Пептид может представлять собой природный пептид или пептид, сконструированный и полученный синтетическим путем. Пептиды могут, к примеру, извлекать или получать путем удаления из нативного белка при помощи энзиматического (ферментативного) или химического расщепления либо могут приготавливаться с использованием методов традиционного синтеза пептидов (например, твердофазный синтез) или способов молекулярной биологии (Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Примерами природных пептидов могут служить антимикробные пептиды, дефензины, Sushi пептиды. Примерами синтетически полученных пептидов являются поликатионные, амфипатичные или гидрофобные пептиды. Пептид в описании заявленного изобретения не обозначает His-таги (-метки), Strep-таги, белки, связывающие тиоредоксин или мальтозу (MBP) и им подобные, которые используют для очистки или локализации белков.

Термин "эндолизин", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к энзиму, применение которого приемлемо для гидролиза клеточных стенок бактерий. "Эндолизины" состоят как минимум из одного "энзим-активного домена" (ЭАД) и обладают свойствами как минимум одного из нижеперечисленных компонентов: эндопептидаза, хитиназа, T4-подобная мурамидаза, лямбда-подобная мурамидаза, N-ацетил-мурамоил-L-аланин-амидаза (амидаза), мурамоил-L-аланин-амидаза, мурамидаза, литическая трансгликолаза (С), литическая трансгликолаза (М), N-ацетил-мурамидаза, N-ацетил-глюкозаминидаза (лизосим) или трансгликолаза, как, например, KZ144 или EL188. Дополнительно, эндолизины могут включать также энзим-неактивные области, которые могут связываться с клеточной стенкой бактерии-хозяина, так называемые домены связывания с клеточной стенкой.

Термин "домен связывания с клеточной стенкой CBD", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к домену связывания с клеточной стенкой эндолизина. В эндолизинах, специфичных в отношении грамположительных бактерий, CBD часто расположены на С-конце, но также могут находиться на N-конце или еще в каком-либо месте внутри белка. Часто домены связывания с клеточной стенкой CBD опосредуют связывание эндолизина с клеточной стенкой бактерии, но не обладают энзиматической функцией гидролиза клеточной стенки.

Термин "ЭАД", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к энзим-активному домену эндолизина. ЭАД ответственен за гидролиз бактериальных пептидогликанов. Этот домен обладает как минимум одной энзим-функцией эндолизина. ЭАД также может состоять более чем из одного энзим-активного модуля.

Термин "аутолизины" относится к энзимам, подобным эндолизинам, но кодируемым бактериями, например, вовлеченными в процесс клеточного деления. Подробное описание аутолизинов можно найти в "Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008 Mar; 32(2):259-86".

Термин "бактериоцин", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к белковоподобным, полипептид-подобным или пептид-подобным веществам, которые могут ингибировать рост других бактерий. Некоторые бактериоцины способны разрушить клеточные стенки бактерий, как, например, лизостафин (разрушающий клеточные стенки *Staphylococcus*), мутанолизин (разрушающий клеточные стенки *Streptococcus*) и энтеролизин (разрушающий клеточные стенки *Enterococcus*). Более предпочтительно упомянутый процесс ингибирования происходит специфически путем абсорбции упомянутых прочих бактерий специфическими рецепторами бактериоцина. Обычно бактериоцины продуцируются микроорганизмами. Тем не менее термин "бактериоцин", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится как к изолированной форме микроорганизма, так и к синтетически получаемой форме и относится к вариантам, которые преимущественно сохраняют свойства своих родительских бактериоцинов, но чьи последовательности были изменены путем инсерции или делеции одного или более аминокислотных остатков.

Термин "антимикробные пептиды" (АМП), в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к любому пептиду с антибиотической и/или микробиостатической функциями. Так, например, термин "антимикробный пептид", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится, в частности, к любому пептиду с антимикробной,

антигрибковой, антимикотической, антипаразитарной, антипротозойной, антивирусной, антиинфекционной, антиконтагиозной и/или бактерицидной, альгицидной, амебоцидной, микробицидной, бактерицидной, фунгицидной, паразитицидной, протозоицидной функции.

Термин "дефензин", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к пептиду, встречающемуся в животном мире, предпочтительно у млекопитающих, более предпочтительно у человека, причем дефензин выполняет важную функцию в механизме внутренней защитной системы организма-хозяина, разрушая чужеродные вещества, как, например, инфекционные бактерии и/или инфекционные вирусы и/или грибки. Дефензин представляет собой микробицидный и/или туморицидный белок, пептид или полипептид типа "не-антитело". Примерами "дефензинов" могут являться "дефензины млекопитающих", альфа-дефензины, бета-дефензины, индолицин и магаинины. Термин "дефензины", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится как к изолированной форме из клеток животных, так и к синтетически получаемой форме и также относится к вариантам, которые преимущественно сохраняют цитотоксические свойства своих родительских белков, но чьи последовательности изменили путем инсерции или делеции одного или более аминокислотных остатков.

Термин "Sushi пептид", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к белкам комплементарного контроля с короткими повторениями транскрипции. Sushi модуль Sushi пептидов функционирует как домен взаимодействия "белок-белок" в различных белках. Доказано, что пептиды, содержащие Sushi домен, показывают антимикробную активность.

В контексте описания заявленного изобретения термин "катионный пептид" относится к пептиду с положительно заряженными аминокислотными остатками. Предпочтительно катионный пептид имеет значение pKa 9,0 или более. Как правило, как минимум четыре аминокислотных остатка катионного пептида могут быть положительно заряженными, например лизин или аргинин. Термин "положительно заряженные" относится к боковым цепям аминокислотных остатков, имеющих номинальное значение номинального положительного заряда на уровне примерно физиологической среды.

Примерами природных катионных пептидов, которые могут быть получены рекомбинантным способом, являются дефензины, магаинины, меллитин и цекропины.

Термин "поликатионные пептиды", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к синтетически получаемым пептидам, состоящим преимущественно из остатков лизина и/или аргинина.

Термин "амфипатичный пептид", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к пептидам, имеющим как гидрофильные, так и гидрофобные функциональные группы. Предпочтительно в контексте описания заявленного изобретения термин "амфипатичный пептид" относится к пептиду, имеющему определенное расположение гидрофильных и гидрофобных групп, например амфипатичные пептиды могут являться альфа-спиральными, с превалирующими неполярными боковыми цепями вдоль одной стороны спирали и полярными остатками вдоль остальной части поверхности.

Термин "гидрофобная группа", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к химическим группам, как, например, аминокислотные боковые цепи, которые преимущественно водонерастворимы, но растворимы в масляной фазе, причем растворимость в масляной фазе выше, чем растворимость в воде или водной фазе. В воде аминокислоты с гидрофобной боковой цепью взаимодействуют друг с другом для получения неводной среды. Примерами аминокислот с гидрофобными боковыми цепями являются аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, гистидин, триптофан и тирозин.

Термин "делеция", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к делеции (удалению) 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислотных остатков из соответствующей стартовой последовательности.

Термины "инсерция" или "аддиция", в том смысле, в котором они используются в описании заявленного изобретения, относятся к инсерции или аддиции 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислотных остатков соответствующей стартовой последовательности.

Термин "субституция", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к замене аминокислотного остатка, расположенного на определенной позиции, на другой аминокислотный остаток.

На решение указанной выше задачи по разработке новых антимикробных агентов, активных в отношении грамположительных бактерий, направлен предлагаемый настоящим изобретением слитый белок, состоящий из эндолизина с функцией разрушения клеточной стенки грамположительных бактерий и амфипатичной пептидной цепи, слитой с эндолизином со стороны N-конца и/или C-конца, причем амфипатичная пептидная цепь содержит от 5 до 100 аминокислотных остатков, и при этом один или более аминокислотных остатков амфипатичной пептидной цепи представляют собой положительно заряженные остатки лизина и/или аргинина и как минимум 60% аминокислотных остатков амфипатичной пептидной цепи представляют собой гидрофобные остатки валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, треонина, серина, пролина и/или глицина.

Слитый белок характеризуется тем, что амфипатичная пептидная цепь содержит предпочтительно от 5 до 50 аминокислотных остатков. Упомянутая амфипатичная пептидная цепь представляет собой природный пептид и связана с эндолизином по меньшей мере через один дополнительный аминокислотный остаток.

Слитый белок может содержать дополнительный аминокислотный остаток на N-конце.

Слитый белок характеризуется тем, что грамположительные бактерии относятся к классу бактерий Bacilli, при этом они могут относиться к родам бактерий Staphylococcus и/или Streptococcus.

Эндолизин, содержащийся в слитом белке, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, 57, 58, 60 или 61.

Слитый белок характеризуется тем, что предпочтительно как минимум 30% аминокислотных остатков амфипатичной пептидной цепи являются положительно заряженными остатками лизина и/или аргинина. Задача решается и тем, что амфипатичная пептидная цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 7, 2, 6, 1, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 23, 48, 49, 50, 51, 52 или 53.

Слитый белок характеризуется и тем, что содержит tag-метку на C- и/или N-концах.

При этом указанная tag-метка связана со слитым белком по меньшей мере через один дополнительный аминокислотный остаток.

Слитый белок характеризуется также и тем, что имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, 63-65, 67, 70 или 73-81.

Достижение решения поставленной задачи обеспечивается также и тем, что предлагаются изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выше упомянутый слитый белок, вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, и клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или указанный вектор.

Изобретение включает также ряд применений упомянутого слитого белка, а именно:

в качестве компонента косметического препарата;

в качестве медикаментозного препарата для лечения или профилактики инфекций, вызываемых грамположительными бактериями;

в качестве дезинфектанта;

для обработки или профилактики заражения грамположительными бактериями пищевых продуктов, оборудования на предприятиях пищевой промышленности, поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами, медицинского оборудования, поверхностей в стационарах и хирургических блоках;

в качестве средства диагностики инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, в медицине, пищевой промышленности и природоохранной деятельности.

На решение поставленной задачи направлена также предложенная фармацевтическая композиция для лечения или профилактики инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, содержащая упомянутый слитый белок.

Заявленное изобретение относится к новым антибактериальным агентам, активным в отношении грамположительных бактерий, в частности к слитым белкам, состоящим из энзима с функцией разрушения клеточной стенки грамположительных бактерий и дополнительной удлиненной пептидной цепи, слитой с энзимом на N- или C-концах или на обоих концах.

Слитые белки в соответствии с заявленным изобретением обладают преимущественным свойством предотвращения регенерации стабильных протопластов, препятствуя, таким образом, выживаемости нежелательных бактерий. Регенерация протопласта бактериями происходит при определенных условиях (например, больших значениях ионной силы), с образованием стабильного протопласта в случаях, когда внутреннего клеточного давления бактерии недостаточно для активации клеточного бурста и бактерия выживает.

В одном из аспектов заявленного изобретения энзим с функцией разрушения клеточной стенки грамположительных бактерий представляет собой эндолизин, аутолизин или бактериоцин.

В другом аспекте заявленного изобретения энзим согласно заявленному изобретению может также содержать энзим-неактивные области и связываться с клеточной стенкой бактерии-хозяина, так называемые домены связывания с клеточной стенкой.

Предпочтительные слитые белки в соответствии с заявленным изобретением представлены в SEQ ID NO: 63 до 90. Слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 63 до 90 могут содержать один или более дополнительных аминокислотных остатков на N-конце. Предпочтительно дополнительным аминокислотным остатком является метионин.

Предпочтительно эндолизин кодируют бактериофагами, специфичными в отношении грамположительных бактерий бактериальных групп, семейств, родов или видов, которые содержат штаммы, патогенные в отношении человека или животных, согласно приведенной табл. 1.

## I. Phylum Actinobacteria

Класс: Actinobacteridae

Порядок Actinomycetales

Семейства:

Actinomycineae: Actinomycetaceae (Actinomyces, Mobiluncus)

Corynebacterineae: Mycobacteriaceae (Mycobacterium),

Nocardiaceae,

Corynebacteriaceae

Frankineae: Frankiaceae

Micrococccineae: Brevibacteriaceae

Propionibacteriaceae (Propionibacterium)

Порядок: Bifidobacteriales

Семейства:

Bifidobacteriaceae (Bifidobacterium, Falcivibrio, Gardnerella)

Другие подклассы: Acidimicrobidae, Coriobacteridae, Rubrobacteridae,

Sphaerobacteridae

## II. Phylum Firmicutes

Класс: Bacilli

Порядок: Bacillales:

Семейства:

Bacillaceae (Bacillus), Listeriaceae (Listeria),

Staphylococcaceae

(Staphylococcus, Gemella, Jeotgaliococcus)

Порядок: Lactobacillales:

Семейства: Enterococcaceae (Enterococcus), Lactobacillaceae

(Lactobacillus, Pediococcus), Leuconostocaceae (Leuconostoc),

Streptococcaceae (Lactococcus, Streptococcus)

Класс: Clostridia

Порядок: Clostridiales (Clostridium, Peptostreptococcus,

Selenomonas)

Порядок: Halanaerobiales

Порядок: Thermoanaerobacterales

Класс: Tenericutes/Mollicutes

Порядок: Mycoplasmatales (Mycoplasma, Ureaplasma)

Порядок: Entomoplasmatales (Spiroplasma)

Порядок: Anaeroplasmatales (Erysipelothrix)

Порядок: Acholeplasmatales (Acholeplasma)

Порядок: Haloplasmatales (Haloplasma)

Предпочтительно аутолизин кодируют грамположительными бактериями, как, например, грамположительные бактерии бактериальных групп, семейств, родов или видов, которые содержат штаммы, патогенные в отношении человека или животных, перечисленные в табл. 1.

Предпочтительно бактериоцин кодируют грамположительными бактериями, как, например, грамположительные бактерии бактериальных групп, семейств, родов или видов, которые содержат штаммы, патогенные в отношении человека или животных, перечисленные в табл. 1.

Энзим в соответствии с заявленным изобретением обладает функцией разрушения клеточной стенки грамположительных бактерий бактериальных групп, семейств, родов или видов, которые содержат штаммы, патогенные в отношении человека или животных, как, например *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus equi*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinomyces*.

Предпочтительными являются эндолизинины фагов *Listeria* PlyA118, PlyA500, PlyPSA, PlyA511, PlyP35, PlyP40, фагов стафилококков Phi 11, Phi MR11, LysK, *Clostridium perfringens* PlyS6, Ply3626, *Clostridium difficile*: CD27L эндолизин, *Streptococcus*: В30 эндолизин, фаг Dp-1 Pal амидаза, C1 эндолизин, Cpl-1 эндолизин, PlyGBS, *Enterococcus*: PlyV12, *Bacillus anthracis*: эндолизин гамма фага PlyG.

Предпочтительными являются аутолизинины, описанные в *Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases*. Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Mar; 32(2):259-86. Epub 2008 Feb 11. Review. Примером предпочтительного аутолизина является AtIA Autolysine.

Предпочтительными являются бактериоцины лизостафин (разрушающий клеточные стенки



Staphylococcus), мутанолизин (разрушающий клеточные стенки Streptococcus) и энтеролизин (разрушающий клеточные стенки Enterococcus).

Более предпочтительно эндолизиновые составляющие выбирают из группы, включающей Cpl-1 в соответствии с SEQ ID NO: 57, Ply511 в соответствии с SEQ ID NO: 58, LysK в соответствии с SEQ ID NO: 59, лизостафин в соответствии с SEQ ID NO: 60 и PA6-gp20 в соответствии с SEQ ID NO: 61.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения эндолизины, аутолизины и бактериоцины слитого белка в соответствии с заявленным изобретением содержат модификации и/или изменения аминокислотных последовательностей. Такие изменения и/или модификации могут включать мутации, как, например, делеции, инсерции и аддиции, субституции или сочетания вышеупомянутых и/или химические изменения аминокислотных остатков, например биотинилирование, ацетилирование, пегилирование, химические изменения amino-, SH- или карбоксигрупп. Упомянутые эндолизины, аутолизины и бактериоцины слитого белка в соответствии с заявленным изобретением показывают литическую активность соответствующего эндолизина дикого типа, аутолизина и бактериоцинов. Тем не менее упомянутая активность может быть на том же самом уровне, выше или ниже способности соответствующего эндолизина дикого типа. Упомянутая активность может находиться на уровне 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или примерно 200% от уровня активности соответствующего эндолизина дикого типа или даже более. Активность можно измерить опытным путем при помощи методов, хорошо известных специалистам в данной области техники, как, например, чашечный тест определения (гемолиза) или анализ в жидкой среде, которые описаны в публикациях Briers et al., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70:531-533, (2007) или Donovan D.M., Lardeo M., Foster-Frey J. *FEMS Microbiol Lett.* 2006 Dec; 265(1) или в аналогичных публикациях.

Предпочтительно удлиненная пептидная цепь слитого белка в соответствии с заявленным изобретением слита с N-концом и/или C-концом эндолизина. В более предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения упомянутая удлиненная пептидная цепь слита только с N-концом энзима. В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения удлиненная пептидная цепь слита только с C-концом энзима. Тем не менее предпочтительными также являются модифицированные слитые белки с удлиненной пептидной цепью на обоих N-конце и C-конце. Упомянутые пептидные цепи на N-конце и C-конце могут быть одинаковыми или различными пептидными цепями. Пептидная цепь может быть связана с энзимом дополнительными аминокислотными остатками, например, из-за клонирования. Предпочтительно упомянутая пептидная цепь может быть связана со слитым белком при помощи как минимум 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дополнительных аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте практического воплощения, пептидная цепь связана с энзимом дополнительными аминокислотными остатками глицина и серина (Gly-Ser). Более того, пептидная цепь слитого белка в соответствии с заявленным изобретением может также содержать дополнительные аминокислоты на N-конце. Предпочтительно пептидная цепь содержит аминокислоты метионин (Met), аланин, и метионин, и глицин (Ala-Met-Gly) или аланин, и метионин, и глицин, и серин (Ala-Met-Gly-Ser).

Пептидная цепь слитого белка в соответствии с заявленным изобретением предпочтительно связана ковалентной связью с энзимом. Предпочтительно упомянутая пептидная цепь состоит как минимум из 5, более предпочтительно как минимум из 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или как минимум 100 аминокислотных остатков. Наиболее предпочтительной является пептидная цепь, содержащая от примерно 5 до примерно 100 аминокислотных остатков, от примерно 5 до примерно 50 или от примерно 5 до примерно 30 аминокислотных остатков. Более предпочтительной является пептидная цепь, содержащая от примерно 6 до примерно 42 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 39 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 38 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 31 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 25 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 24 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 22 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 21 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 20 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 19 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 16 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 14 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 12 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 10 аминокислотных остатков или от примерно 6 до примерно 9 аминокислотных остатков.

Предпочтительно пептидная цепь не содержит таг (метку), как, например, His-таг, Strep-таг, Avi-таг, Muc-таг, Gst-таг, JS-таг, цистеин-таг, FLAG-таг или прочих тагов, известных из уровня техники, и никаких тиоредоксин- или мальтоза-связывающих белков (МВР). Тем не менее пептидная цепь и/или эндолизин, аутолизин или бактериоцин в соответствии с заявленным изобретением могут содержать дополнительно такой таг(и).

Более предпочтительно пептидная цепь обладает функцией способствовать бурсту (выходу) бактериальной клетки путем взаимодействия слитого белка с: вначале с пептидогликанным слоем, разрушая

пептидогликан, затем с цитоплазматической мембраной, дестабилизируя ее целостность.

В одном из аспектов заявленного изобретения слитая пептидная цепь представляет собой катионный пептид, более предпочтительно поликатионный пептид. Предпочтительно катионный пептид содержит один или более положительно заряженных аминокислотных остатков лизина, аргинина и/или гистидина. Предпочтительно более, чем примерно 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или примерно 100 %, аминокислотных остатков в упомянутом пептиде являются положительно заряженными аминокислотными остатками. Предпочтительно катионный пептид слит с N-концом и/или C-концом энзима, обладающего способностью разрушать клеточную стенку, повышая таким образом катионность слитых белков и/или антимикробную активность агентов в соответствии с заявленным изобретением. В другом варианте практического воплощения заявленного изобретения катионный пептид, слитый с энзимом, содержит как минимум 5, более предпочтительно как минимум 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте практического воплощения, как минимум примерно 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или примерно 100% упомянутых аминокислотных остатков катионного пептида являются остатками либо аргинина, либо лизина. Еще в одном варианте практического воплощения заявленного изобретения катионный пептид содержит от примерно 3 до примерно 50, более предпочтительно от примерно 5 до примерно 20, например, от 5 до примерно 15 аминокислотных остатков и упомянутые аминокислотные остатки представляют собой остатки аргинина или лизина. Предпочтительные катионные пептиды представлены в SEQ ID NO: 13 и 14.

Особенно предпочтительными являются катионные и/или поликатионные пептидные цепи, содержащие как минимум один мотив в соответствии с SEQ ID NO: 62 (KRKKRK). В частности, предпочтительны катионные пептидные цепи, содержащие как минимум 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 мотивов в соответствии с SEQ ID NO: 62 (KRKKRK). Более предпочтительны катионные пептидные цепи, содержащие как минимум один KRK мотив (lys-arg-lys), предпочтительно как минимум 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 или 33 KRK мотивов.

В другом варианте практического воплощения заявленного изобретения катионная пептидная цепь содержит, помимо положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности, остатки лизина и/или аргинина, нейтрально заряженные аминокислотные остатки, в частности остатки глицина и/или серина. Предпочтительны катионные пептидные цепи, содержащие от примерно 70 до примерно 100%, или от примерно 80 до примерно 95%, или от примерно 85 до примерно 90% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатки лизина, аргинина и/или гистидина, более предпочтительно остатки лизина и/или аргинина и от примерно 0 до примерно 30%, или от примерно 5 до примерно 20%, или от примерно 10 до примерно 20% нейтрально заряженных аминокислотных остатков, в частности остатки глицина и/или серина. Предпочтительны полипептидные цепи, содержащие от примерно 4 до примерно 8% остатков серина, от примерно 33 до примерно 36% остатков аргинина и примерно от 56 до примерно 63% остатков лизина. Особенно предпочтительны полипептидные цепи, содержащие как минимум один мотив в соответствии с SEQ ID NO: 45 (KRXKR), причем X представляет собой любую другую аминокислоту, кроме лизина, аргинина и гистидина. Особенно предпочтительны полипептидные цепи, содержащие как минимум один мотив в соответствии с SEQ ID NO: 46 (KRSKR). Более предпочтительны катионные цепи, содержащие как минимум примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или примерно 20 мотивов в соответствии с SEQ ID NO: 45 (KRXKR) или SEQ ID NO: 46 (KRSKR).

Также предпочтительны полипептидные цепи, содержащие от примерно 9 до примерно 16% остатков глицина, от примерно 4 до примерно 11% остатков серина, от примерно 26 до примерно 32% остатков аргинина и от примерно 47 до примерно 55% остатков лизина. Особенно предпочтительны полипептидные цепи, содержащие как минимум один мотив в соответствии с SEQ ID NO: 47 (KRGSG). Более предпочтительны катионные цепи, содержащие как минимум примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или примерно 20 мотивов в соответствии с SEQ ID NO: 47 (KRGSG).

В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения катионная пептидная цепь содержит, помимо положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков лизина и/или аргинина, гидрофобные аминокислотные остатки, в частности остатки валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина, более предпочтительно остатки аланина, валина, изолейцина, лейцина, фенилаланина и/или триптофана. Предпочтительны катионные пептидные цепи, содержащие от примерно 70 до примерно 100%, или от примерно 80 до примерно 95%, или от примерно 85 до примерно 90% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатки лизина и/или аргинина и примерно от примерно 0 до примерно 30%, или от примерно 5 до примерно 20%, или от примерно 10 до примерно 20% гидрофобных аминокислотных остатков, остатков валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина, более предпочтительно остатки аланина, валина, изолейцина, лейцина, фенилаланина и/или триптофана.

Особенно предпочтительны пептидные цепи из группы, содержащей нижеперечисленные последовательности.

Таблица 2

| Пептидная цепь                       | Длина | SEQ ID NO:   |
|--------------------------------------|-------|--------------|
| KRKKRK                               | 6     | SEQ ID NO:24 |
| KRKKRKKRK                            | 9     | SEQ ID NO:13 |
| RRRRRRRR                             | 9     | SEQ ID NO:25 |
| KKKKKKKK                             | 8     | SEQ ID NO:26 |
| KRKKRKKRKK                           | 10    | SEQ ID NO:27 |
| KRKKRKKRKKRK                         | 12    | SEQ ID NO:28 |
| KRKKRKKRKKRKKR                       | 14    | SEQ ID NO:29 |
| KKKKKKKKKKKKKKKK                     | 16    | SEQ ID NO:30 |
| KRKKRKKRKKRKKRKKR                    | 18    | SEQ ID NO:31 |
| KRKKRKKRKKRKKRKKRKK                  | 19    | SEQ ID NO:32 |
| RRRRRRRRRRRRRRRR                     | 19    | SEQ ID NO:33 |
| KKKKKKKKKKKKKKKKKK                   | 19    | SEQ ID NO:34 |
| KRKKRKKRKRKRKKRKKR                   | 20    | SEQ ID NO:35 |
| KRKKRKKRKRKRKRKKRKKR                 | 21    | SEQ ID NO:36 |
| KRKKRKKRKKRKKRKKRKKR                 | 21    | SEQ ID NO:37 |
| KRKKRKKRKRKRGSGRKKRKKR               | 22    | SEQ ID NO:38 |
| KRKKRKKRKRKRGSGRKKRKKR               | 24    | SEQ ID NO:39 |
| KRKKRKKRKKRKKRKKRKKR                 | 25    | SEQ ID NO:40 |
| KRKKRKKRKRKRKRKKRKKRKR               | 31    | SEQ ID NO:41 |
| KRKKRKKRKRKRGSGRKKRKKRKRKRGSGRKKRKKR | 38    | SEQ ID NO:42 |
| KRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKR  | 39    | SEQ ID NO:43 |
| KRKKRKKRKRKRKRKKRKKRKRKRKRKRKRKRKR   | 42    | SEQ ID NO:44 |

В одном из аспектов заявленного изобретения слитая пептидная цепь представляет собой амфипатичный пептид, который содержит один или более положительно заряженных аминокислотных остатков лизина, аргинина и/или гистидина, в сочетании с одним или более гидрофобными аминокислотными остатками валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и/или глицина. Боковые цепи аминокислотных остатков предпочтительно ориентированы с учетом того, что катионные и гидрофобные поверхности упорядочены в кластеры на противоположных сторонах пептида. Предпочтительно более чем примерно 30, 40, 50, 60 или 70% аминокислотных остатков в упомянутом пептиде являются положительно заряженными аминокислотами. Предпочтительно более чем примерно 30, 40, 50, 60 или 70%, аминокислотных остатков в упомянутом пептиде являются гидрофобными аминокислотными остатками. Предпочтительно амфипатичный пептид слит с N-концом и/или C-концом энзима, обладающего способностью разрушать клеточную стенку, повышая таким образом амфипатичность упомянутых белков.

В другом варианте практического воплощения заявленного изобретения амфипатичный пептид, слитый с энзимом, содержит как минимум 5, более предпочтительно как минимум 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте практического воплощения как минимум примерно 30, 40, 50, 60 или 70% упомянутых аминокислотных остатков амфипатичного пептида являются остатками либо аргинина, либо лизина и/или как минимум 30, 40, 50, 60 или 70% упомянутых аминокислотных остатков амфипатичного пептида являются остатками гидрофобных аминокислот валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и/или глицина.

Предпочтительными амфипатичными пептидами являются Pleurocidin в соответствии с SEQ ID NO: 1, Sescopin P1 в соответствии с SEQ ID NO: 2, Buforin II в соответствии с SEQ ID NO: 3, Buforin I в соответствии с SEQ ID NO: 23 и Magainin в соответствии с SEQ ID NO: 4. Более предпочтительными амфипатичными пептидами являются Cathelidicine, например LL-37, в соответствии с SEQ ID NO: 5, Nigrosine 2 в соответствии с SEQ ID NO: 48 и Ascaphine 5 в соответствии с SEQ ID NO: 49.

В другом аспекте заявленного изобретения слитая пептидная цепь представляет собой антимикробный пептид, который содержит номинальный положительный заряд и примерно 50% гидрофобных аминокислотных остатков. Антимикробные пептиды являются амфипатичными с длиной примерно от 12 до примерно 50 аминокислотных остатков.

Специфические примеры антимикробных пептидов в соответствии с заявленным изобретением приведены в табл. 3.

Таблица 3

| Пептид                      | Последовательность                       |              |
|-----------------------------|--|--------------|
| LL-37                       | LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPVPRTE    | SEQ ID NO:5  |
| SMAP-29                     | RGLRRLGRKIAHGKVKYGPVLRRIIRIAG            | SEQ ID NO:6  |
| Indolicidin                 | ILPWKWPWWPWR                             | SEQ ID NO:7  |
| Protegrin                   | RGGRLCYCRRRFCVGVGR                       | SEQ ID NO:8  |
| Cecropin P1                 | SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR         | SEQ ID NO:2  |
| Magainin                    | GIGKFLHSAKFKGAFVGEIMNS                   | SEQ ID NO:4  |
| Pleurocidin                 | GWGSFFKKAANHVGHVGHKAALHLYL               | SEQ ID NO:1  |
| Cecropin A (A.aegypti)      | GGLKKGKLEGGAGKRVFNAAEKALPVVAGAKALRK      | SEQ ID NO:9  |
| Cecropin A (D.melanogaster) | GWLKKIGKKIERVGHTRDATTIQGLGIPQQAANVAATARG | SEQ ID NO:10 |
| Bufoforin II                | TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK                    | SEQ ID NO:3  |
| Sarcotoxin IA               | GWLKKIGKKIERVGHTRDATTIQGLGIAQQAANVAATAR  | SEQ ID NO:11 |
| Apidacine                   | ANRPVYIPPPRPPHRL                         | SEQ ID NO:50 |
| Ascaphine 5                 | GIKDWIKGAAKLIKTVASHIANQ                  | SEQ ID NO:49 |
| Nigrocine 2                 | GLLSKVLGVGKVKVLCGVSGLVC                  | SEQ ID NO:48 |
| Pseudin 1                   | GLNTLKKVFQGLHEAIKLNHVQ                   | SEQ ID NO:51 |
| Ranalexin                   | FLGGLIVPAMICAVTKKC                       | SEQ ID NO:52 |
| Melittin                    | GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ                | SEQ ID NO:53 |

Еще в одном аспекте заявленного изобретения, слитая пептидная цепь представляет собой Sushi пептид, описанный в публикации Ding J.L., Li P., Ho B. Cell Mol. Life Sci. 2008 Apr; 65(7-8):1202-19. The Sushi peptides: structural characterization and mode of action against Gram-negative bacteria. Особенно предпочтительным является Sushi 1 пептид в соответствии с SEQ ID NO: 54.

Предпочтительные Sushi пептиды - это Sushi пептиды S1 и S3 и их производные; FASEB J. 2000 Sep; 14(12):1801-13.

В еще одном аспекте заявленного изобретения слитая пептидная цепь представляет собой дефензин, предпочтительно Cathelicidine, Cecropin P1, Cecropin A или Magainin II.

В еще одном аспекте заявленного изобретения слитая пептидная цепь представляет собой гидрофобную пептидную группу, например Apidacine с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 50, WLB2-Variant с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 55 и Walmagh1 с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 56. Гидрофобный пептид с аминокислотной последовательностью Phe-Phe-Val-Ala-Pro (SEQ ID NO: 12) не является частью заявленного изобретения.

В еще одном аспекте заявленного изобретения пептидные цепи слитого белка в соответствии с заявленным изобретением содержат модификации и/или изменения аминокислотных последовательностей. Такие изменения и/или модификации могут содержать мутации, как, например, делеции, инсерции и добавления, субституции или сочетания вышеупомянутых и/или химические изменения аминокислотных остатков, например биотинилирование, ацетилирование, пегилирование, химические изменения амино-, SH- или карбоксигрупп.

Особенно предпочтительны слитые белки в соответствии с SEQ ID NOs: 63 до 90 и слитые белки выбирают из группы, состоящей из нижеперечисленных слитых белков (табл. 4).

Таблица 4

| Слитый белок | Слитый белок  | Энзимная составляющая      | Пептидная цепь (N-концевая, если не указано иначе) |
|--------------|---------------|----------------------------|--|
| P1-E1        | SEQ ID NO: 63 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Ascapline 5 (SEQ ID NO:49)                         |
| P2-E1        | SEQ ID NO: 64 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Apiadaecine (SEQ ID NO:50)                         |
| P3-E1        | SEQ ID NO: 65 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Nigrocine 2 (SEQ ID NO:48)                         |
| P4-E1        | SEQ ID NO: 66 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Pseudin 1 (SEQ ID NO:51)                           |
| P7-E1        | SEQ ID NO: 67 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Ranalexin (SEQ ID NO:52)                           |
| P8-E1        | SEQ ID NO: 68 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | WLBU2-Variant (SEQ ID NO:55)                       |
| P9-E1        | SEQ ID NO: 69 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Sushi 1 (SEQ ID NO:54)                             |
| P10-E1       | SEQ ID NO: 70 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Melittin (SEQ ID NO:53)                            |
| P11-E1       | SEQ ID NO: 71 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | LL-37 (SEQ ID NO:5)                                |
| P12-E1       | SEQ ID NO: 72 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Indolicidin (SEQ ID NO:7)                          |
| P13-E1       | SEQ ID NO: 73 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | SMAP-29 (SEQ ID NO:6)                              |
| P14-E1       | SEQ ID NO: 74 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Protegrin (SEQ ID NO:8)                            |
| P15-E1       | SEQ ID NO: 75 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Cecropin P1 (SEQ ID NO:2)                          |
| P16-E1       | SEQ ID NO: 76 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Magainin (SEQ ID NO:4)                             |
| P17-E1       | SEQ ID NO: 77 | Cpl-1 (SEQ ID NO: 57)      | Pleurocidin (SEQ ID NO:1)                          |
| P18-E1       | SEQ ID NO: 78 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)       | Cecropin A (A. aegypti) (SEQ ID NO:9)              |
| P19-E1       | SEQ ID NO: 79 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)       | Cecropin A (D. melanogaster) (SEQ ID NO:10)        |
| P20-E1       | SEQ ID NO: 80 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)       | Buforin II (SEQ ID NO:3)                           |
| P21-E1       | SEQ ID NO: 81 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)       | Sarcotoxin IA (SEQ ID NO:11)                       |
| P5-E1        | SEQ ID NO: 82 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)       | PK (SEQ ID NO:13)                                  |
| P22-E2       | SEQ ID NO: 83 | Ply511 (SEQ ID NO:58)      | Pentapeptid (SEQ ID NO:12)                         |
| P5-E7        | SEQ ID NO: 84 | LysK (SEQ ID NO:59)        | PK (N-концевой) (SEQ ID NO:13)                     |
| P6-E7        | SEQ ID NO: 85 | LysK (SEQ ID NO:59)        | PK2 (SEQ ID NO:31)                                 |
| P5-E8        | SEQ ID NO: 86 | Lysostaphin (SEQ ID NO:60) | PK (C-концевой) (SEQ ID NO:13)                     |
| P6-E8        | SEQ ID NO: 87 | Lysostaphin (SEQ ID NO:60) | PK2 (SEQ ID NO:31)                                 |
| P23-E9       | SEQ ID NO: 88 | PA6-gp20 (SEQ ID NO:61)    | Walmagh1 (SEQ ID NO:56)                            |
| P5-E7        | SEQ ID NO: 89 | LysK (SEQ ID NO:59)        | PK (C-концевой) (SEQ ID NO:13)                     |
| P5-E8        | SEQ ID NO: 90 | Lysostaphin (SEQ ID NO:60) | PK (N-концевой) (SEQ ID NO:13)                     |

Слитый белок в соответствии с заявленным изобретением и в особенности наиболее предпочитаемые слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 63 to 90 могут дополнительно содержать метионин на N-конце.

Слитый белок в соответствии с заявленным изобретением и в особенности наиболее предпочитаемые слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 63 до 90 могут дополнительно содержать таг (метку), например, с целью пурификации. Предпочтительным является His<sub>6</sub>-таг, предпочтительно на C-конце

и/или на N-конце слитого белка. Упомянутый таг можно связать со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков, например, по причине клонирования. Предпочтительно упомянутый таг может быть связан со слитым белком при помощи как минимум 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дополнительных аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на C-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лизина и глицина (Lys-Gly) или лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu). В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на N-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лизина и глицина (Lys-Gly) или лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu). Еще в одном предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на C-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лизина и глицина (Lys-Gly) или лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu).

В более предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на C-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu), и пептидную цепь слитого белка в соответствии с заявленным изобретением, связанную с N-концом энзима при помощи дополнительных аминокислотных остатков глицина и серина. В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на C-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu), а пептидная цепь слитого белка в соответствии с заявленным изобретением связана с N-концом энзима при помощи дополнительных аминокислотных остатков глицина и серина (Gly-Ser), причем слитый белок содержит на N-конце дополнительные аминокислотные остатки метионина (Met) или аланина, метионина и глицина (Ala-Met-Gly) или аланина, метионина, глицина и серина (Ala-Met-Gly-Ser). Предпочтительно применяют слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 108 до 123.

В еще одном предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на N-конце, причем His<sub>6</sub>-таг также содержит на N-конце дополнительные аминокислотные остатки серина и серина (Ser-Ser) или метионина и глицина (Met-Gly) или метионина, глицина, серина и серина (Met-Gly-Ser-Ser).

В еще одном предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на N-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков серина, серина, глицина, лейцина, валина, пролина, аргинина, глицина, серина и гистидина (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His). В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на N-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков серина, серина, глицина, лейцина, валина, пролина, аргинина, глицина, серина, гистидина и метионина (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Met). В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на N-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков серина, серина, глицина, лейцина, валина, пролина, аргинина, глицина, серина и гистидина (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His) или серина, серина, глицина, лейцина, валина, пролина, аргинина, глицина, серина, гистидина и метионина (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Met) и пептидную цепь слитого белка в соответствии с заявленным изобретением, связанную с C-концом энзима при помощи дополнительных аминокислотных остатков серина. В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок содержит His<sub>6</sub>-таг на N-конце, связанный со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков серина, серина, глицина, лейцина, валина, пролина, аргинина, глицина, серина и гистидина (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His) или серина, серина, глицина, лейцина, валина, пролина, аргинина, глицина, серина, гистидина и метионина (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Met), а пептидная цепь слитого белка в соответствии с заявленным изобретением связана с C-концом энзима при помощи дополнительных аминокислотных остатков серина, причем His<sub>6</sub>-таг содержит на N-конце дополнительные аминокислотные остатки серина и серина (Ser-Ser), или метионина, глицина, серина и серина (Met-Gly-Ser-Ser), или метионина и серина (Met-Ser). Предпочтительно применяют слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 122 и 123.

Слитые белки получают построением путем связывания как минимум двух последовательностей нуклеиновой кислоты, с использованием стандартных методов клонирования в соответствии с Sambrook et al. 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Такой белок можно получить, например, в системах экспрессии рекомбинантных ДНК. Подобные слитые белки в соответствии с заявленным изобретением можно получать путем слияния нуклеиновых кислот для эндолизина и соответствующей пептидной цепи.

Слитые белки в соответствии с заявленным изобретением можно слить или связать с другими дополнительными белками. Примером такого дополнительного белка является тиоредоксин.

Помимо вышеописанного, заявленное изобретение относится к изолированной молекуле нуклеино-

вой кислоты, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением. Заявленное изобретение также относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с заявленным изобретением. Упомянутый вектор может быть применен в конститутивной или индуцируемой экспрессии упомянутого слитого белка в соответствии с заявленным изобретением.

Заявленное изобретение также относится к способу получения описанных слитых белков из микроорганизма, как, например, генетически модифицированная приемлемая клетка-хозяин, которая экспрессирует упомянутые слитые белки. Упомянутая клетка-хозяин может представлять собой микроорганизм, как, например, бактерия, или дрожжевая клетка, или клетка животного, например, млекопитающего, в частности человека. В одном из вариантов практического воплощения заявленного изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку *Pichia pastoris*. Клетку-хозяина могут выбирать вследствие чисто биологических параметров, например выход, растворимость, затраты и пр., но также и по медицинским параметрам, например непатогенные бактерии или дрожжи, клетки организма человека. В другом из аспектов, заявленное изобретение относится к способу генетической трансформации приемлемой клетки-хозяина с целью получения слитых белков в соответствии с заявленным изобретением, при котором клетку-хозяина генетически модифицируют путем введения в клетку-хозяин генетического материала, кодирующего упомянутые слитые белки, и последующих трансляции и экспрессии с использованием методов геной инженерии, известных специалистам в данной области.

Еще в одном из аспектов заявленное изобретение относится к композиции, предпочтительно фармацевтической композиции, содержащей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяин, трансформированный с использованием молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением.

Заявленное изобретение также относится к слитому белку в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяину, трансформированному с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением для применения в качестве медикаментозного препарата. В другом аспекте заявленное изобретение относится к применению слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяину, трансформированному с использованием вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный слитый белок в соответствии с заявленным изобретением для применения в производстве медикаментозного препарата для лечения и/или профилактики расстройств, заболеваний и прочих дисфункций, ассоциируемых с грамположительными бактериями. В частности, применение для лечения и/или профилактики расстройств, заболеваний и пр. дисфункций, которые могут быть вызваны грамположительными бактериями, бактериальными группами, семействами, родами или видами, содержащими штаммы, патогенные для человека или животных, а именно *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus equi*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinomyces*.

Заявленное изобретение также относится к медикаментозному препарату, содержащему слитый белок в соответствии с заявленным изобретением, и/или хозяину, трансформированному с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением.

Еще в одном из аспектов, заявленное изобретение относится к способу лечения заболеваний, расстройств или прочих дисфункций у пациентов в состоянии необходимости терапии и/или профилактики, причем способ предусматривает введение пациенту эффективной дозы слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или эффективного количества хозяина, трансформированного с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением или композицию в соответствии с заявленным изобретением. Пациент может являться человеком или животным.

В частности, упомянутый способ лечения могут применять для лечения и/или профилактики инфекций кожи, мягких тканей, респираторной системы, легких, пищеварительного тракта, глаз, ушей, зубов, носоглотки, рта, костной системы, влагалища, осложнений в виде раневых поверхностей при бактериемии и/или эндокардите, вызываемых грамположительными бактериями, в частности вышеперечисленными грамположительными бактериями.

Дозировка и путь введения, используемые в способе лечения (или профилактики) в соответствии с заявленным изобретением, зависят от специфики заболевания/локализации инфекции. Путь введения, например, может быть пероральный, наружный, внутриназальный, парентеральный, внутривенный, ректальный или др.

Для введения слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или эффективного количества хозяина, трансформированного с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением или

композицию в соответствии с заявленным изобретением, в место локализации (или возможного распространения инфекции), применяют такую форму упаковки, которая защищает активные компоненты от воздействий внешних факторов, таких как протеазы, окисление, иммунный ответ и т.п., вплоть до достижения ими очага инфекции. Следовательно, лекарственная форма может представлять собой капсулу, драже, таблетку, порошок, суппозиторий, эмульсию, гель, лосьон, крем, мазь, инъекционный раствор, сироп, спрей, состав для ингаляций или любую другую приемлемую по медицинским показаниям упаковку. Предпочтительно фармацевтическая композиция может содержать подобранные носители, стабилизаторы, красители, буферы или другие подходящие реагенты. Например, для местного нанесения лекарственная форма может представлять собой лосьон, крем, гель, мазь или пластырь, для назофарингального применения - физраствор для интраназального нанесения при помощи спрея. Для перорального применения с целью лечения и/или профилактики очага инфекции, к примеру во внутренних органах, возникает необходимость в дополнительной защите слитого белка в соответствии с заявленным изобретением от агрессивного воздействия среды желудочно-кишечного тракта вплоть до проникновения в очаг инфекции. Таким образом, при пероральном введении в очаг инфекции во внутренних органах требуется использование бактерии как носителя, который преодолевает начальные стадии пищеварения в желудке и только после этого секретируется на слитый белок в соответствии с заявленным изобретением.

В одном из узконаправленных воплощений заявленного изобретения использование слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяина, трансформированного с использованием вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением, для применения в производстве медикаментозного средства для лечения и/или профилактики дисфункции, заболевания или симптоматики, вызвано *Listeria monocytogenes*, в особенности *Granulomatosis infantiseptica* (листериоз новорожденных), мононуклеоз, конъюнктивит, менингит, септический гранулематоз и листериоз беременных.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Staphylococcus aureus*, в частности инфекции кожи, как, например, пиодермия, в частности фолликулит, фурункулез, карбункул, воспаления потовых желез и пемфигус (пузырчатка), и синдром чешуйчатой кожи. Синдром чешуйчатой кожи может наблюдаться в трех случаях клинического проявления: при эксфолиативном дерматите, буллезном импетиго и скарлатиноподобной эритродермии. Помимо этого, дисфункция, заболевание или симптоматика, вызываемые *Staphylococcus aureus*, являются *Staphylococcus* пневмонией, госпитализмом (внутрибольничными инфекциями), в частности инфекциями хирургических ран, маститом, энтероколитом, и пищевыми отравлениями.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Streptococcus pyogenes*, в частности тонзиллит, фарингит, скарлатина, рожистое воспаление, ревматическая лихорадка и острый гломерулонефрит.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Streptococcus pneumoniae*, в частности пневмония, ползучая язва роговицы, отит среднего уха, менингит, перитонит, мастоидит и остеомиелит.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Clostridium perfringens*, в частности газовая гангрена, некротически-язвенный энтерит и пищевые отравления.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Clostridium botulinum*, в частности ботулизм.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Clostridium difficile*, в частности псевдомембранозный энтероколит.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Bacillus anthracis*, в частности злокачественные (сибирязвенные) пустулы, легочная форма сибирской язвы и желудочно-кишечная форма сибирской язвы.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Enterococcus faecalis* или *E. faecium*, как, например, нозокомиальные инфекции и эндокардит.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Bacillus cereus*, в частности пищевые отравления, бронхиальная пневмония, септицемия и менингит.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis*, в частности туберкулез.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дис-



функция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Mycoplasma pneumoniae*, в частности пневмония, заболевания верхних дыхательных путей и воспаления среднего уха (барабанной перепонки).

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дис-функция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Actinomyces*, в частности актиномикоз у человека, домашнего скота, кошек и собак.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дис-функция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Corynebacterium diphtheriae*, в частности локализованная форма дифтерии гланд, носа, носоглотки или среднего уха, прогрессирующая форма дифтерии гортани, трахеи и бронхов, токсическая или злокачественная форма дифтерии, дифтерия кожи и ран.

Предпочтительно слитый белок в соответствии с заявленным изобретением используется как компонент терапии или профилактики в случае, если инфекция вызвана мультирезистентными бактериальными штаммами, в частности штаммами, устойчивыми к одному или более из следующей группы антибиотиков: стрептомицин, тетрациклин, цефалотин, пенициллин, гентамицин, цефатоксин, цефалоспорины, цефтазидим или имипенем. Кроме того, слитый белок в соответствии с заявленным изобретением применяются как компонент терапии путем введения в сочетании с традиционными антибактериальными препаратами, такими как антибиотики, лантибиотики, бактериоцины или эндолизины и т.п.

Заявленное изобретение также относится к фармацевтическому препарату, содержащему одно или более отделений, причем как минимум одно отделение содержит один или более слитых белков эндолизина в соответствии с заявленным изобретением и/или один или более хозяинов, трансформированных с использованием нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением, или композицию в соответствии с заявленным изобретением.

В другом аспекте практической реализации заявленное изобретение относится к процессу приготовления фармацевтической композиции, причем данный процесс включает добавление путем смешивания одного или более слитых белков в соответствии с заявленным изобретением и/или один или более хозяев, трансформированных с использованием нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением, с фармацевтически приемлемым растворителем, эксципиентом или носителем.

В более расширенном аспекте композиция в соответствии с заявленным изобретением представляет собой косметическую композицию. Некоторые виды бактерий могут вызывать раздражение на открытых участках тела пациента, например на кожном покрове. Для предотвращения появления таких раздражений кожного покрова или вероятного патогенного влияния упомянутых бактериальных организмов представляется возможным применение специальных косметических составов, которые содержат достаточное количество слитого белка в соответствии с заявленным изобретением для разрушения уже размножившихся или потенциально опасных очагов инфекции, вызванных грамположительными бактериями.

В расширенном аспекте заявленное изобретение относится к применению слитого белка в соответствии с заявленным изобретением в качестве средства диагностики в здравоохранении, пищевой и природоохранной промышленности, в частности в качестве средства диагностики для диагностирования бактериальных инфекций, вызванных, в частности, грамположительными бактериями. Слитый белок в соответствии с заявленным изобретением можно применять в качестве инструмента направленного разрушения патогенных бактерий, в особенности грамположительных патогенных бактерий. Разрушению бактериальных стенок слитым белком в соответствии с заявленным изобретением можно способствовать путем добавления детергентов, как, например, Triton X-100 или других добавок, которые ослабляют клеточную защиту бактерий, например полимиксин В. Специально направленное разрушение клеток необходимо как начальный этап последующего направленного уничтожения бактерий с использованием НК-методов, как, например, полимеразная цепная реакция (ПЦР), гибридизация нуклеиновой кислоты или амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот, иммунобиологических методов, например rIMS, иммунофлуоресценции или анализ ELISA, или методов, основанных на распознавании клеточного материала бактерий, как то энзим-анализы с использованием протеинов, чувствительных к определенным группам или видам бактерий (например,  $\beta$ -галактозидаза для энтеробактерий, коагулаза для коагулаз-позитивных штаммов).

В расширенном аспекте заявленное изобретение относится к использованию слитого белка в соответствии с заявленным изобретением для устранения, уменьшения и/или профилактики заражения грамположительными бактериями пищевых продуктов, оборудования на пищевых перерабатывающих предприятиях, различных поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами, как, например, полки и места хранения пищевых продуктов, а также в любой другой области, где присутствует вероятность заражения пищевых продуктов, медицинского инструментария или прочих поверхностей в клиниках и хирургических блоках патогенными, потенциально болезнетворными и пр. нежелательными бактериями.

В частности, слитые белки в соответствии с заявленным изобретением можно применять в профилактических целях в качестве обеззараживающего средства. Такое обеззараживающее средство можно использовать до или после хирургических вмешательств или, например, во время гемодиализа. Кроме

того, слитый белок в соответствии с заявленным изобретением можно применять как компонент терапии у недоношенных детей, пациентов с ослабленной иммунной реакцией или пациентов с протезными устройствами. Данную терапию можно проводить как профилактику, так и в острый период. В этом же контексте внутрибольничные инфекции, в особенности вызванные резистентными к антибиотикам штаммами, как, например, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Propionibacterium acnes*, multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, можно лечить - как профилактически, так и на стадии острого обострения - с использованием слитого белка в соответствии с заявленным изобретением. В связи с этим слитый белок в соответствии с заявленным изобретением можно использовать в качестве дезинфицирующего средства, а также в сочетании с другими ингредиентами в составе дезинфицирующего раствора, как, например, детергенты, поверхностно-активные вещества, растворители, антибиотики, лантибиотики или бактериоцины.

Применение слитого белка в соответствии с заявленным изобретением в качестве дезинфицирующего средства, например, в клиниках, стоматологических и ветеринарных кабинетах, кухне или ванной комнате сопровождается приготвлением состава в виде жидкости, порошка, геля или ингредиента дезинфицирующих салфеток или простыней. В данный состав можно дополнительно включить подходящий носитель, добавки, растворители и/или эксципиенты для различных способов применения, а также агенты, которые способствуют повышению антимикробной активности, такие, как, например, ЭДТК или агенты, повышающие антимикробную активность слитых белков. Слитые белки можно использовать с традиционными дезинфицирующими агентами, такими как, например, этиловые спирты, альдегиды, окислители, фенолы, четвертичные аммониевые соединения или УФ-излучение. Для дезинфекции, например, поверхностей, объектов и/или приборов слитый белок можно наносить на указанные поверхности, объекты и/или приборы. Нанесение можно осуществлять при помощи мягкой ткани, смоченной в дезинфицирующем составе, нанесенном при помощи спрея или окунания. Слитые белки можно использовать в различных концентрациях, в зависимости от соответствующего способа нанесения и времени воздействия для достижения эффекта полного обеззараживания.

Далее по тексту описания заявленного изобретения следует расширенное описание применимости заявленного изобретения; тем не менее, следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, при том, что таковые служат исключительно цели продемонстрировать примеры практического воплощения заявленного изобретения, не носят ограничительный характер, поскольку различные изменения и модификации, не выходящие за рамки цели и задач изобретения, понятны специалистам в данной области техники. Необходимо понимать, что как описание, так и примеры носят иллюстративный характер и не являются ограничительными касательно сути заявленного изобретения.

Если не указано иначе, в нижеследующих примерах использованы стандартные методики, принятые в молекулярной биологии, как, например, описано в издании Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Пример 1. Клонирование, экспрессия и очистка Cpl-1, Ply511, LysK, Lysostaphin (Lss) PA6-gr20 энзимов, модифицированных с использованием различных пептидных цепей на N-конце или C-конце.

Энзимы.

Cpl-1 в соответствии с SEQ ID NO: 57 является эндолизином, полученным из *Streptococcus pneumoniae* фага Cpl-1. Эндолизин Cpl-1 кодируют молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 91. Молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 91 получили синтетическим путем с сайтом рестрикции BamH I (5'-GGA TCC-3') на 5'-конце молекулы нуклеиновой кислоты и сайтом рестрикции Xho I (5'-CTC GAG-3') на 3'-конце молекулы нуклеиновой кислоты.

Ply511 в соответствии с SEQ ID NO: 58 является эндолизином, полученным из *Listeria monocytogenes* фага A511. Эндолизин Ply511 кодируют молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 92. Молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 92 получили синтетическим путем с сайтом рестрикции BamH I (5'-GGA TCC-3') на 5'-конце молекулы нуклеиновой кислоты и сайтом рестрикции Xho I (5'-CTC GAG-3') на 3'-конце молекулы нуклеиновой кислоты.

LysK в соответствии с SEQ ID NO: 59 является эндолизином, полученным из *Staphylococcus aureus* фага K. Эндолизин LysK кодируют молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 93. Молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 93 получили синтетическим путем с сайтом рестрикции BamH I (5'-GGA TCC-3') на 5'-конце молекулы нуклеиновой кислоты и сайтом рестрикции Xho I (5'-CTC GAG-3') на 3'-конце молекулы нуклеиновой кислоты.

Lysostaphin (Lss) в соответствии с SEQ ID NO: 60 является бактериоцином, полученным из *Staphylococcus simulans*. Бактериоцин Lss кодируют молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 94. Молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 94 получили синтетическим путем с сайтом рестрикции BamH I (5'-GGA TCC-3') на 5'-конце молекулы нуклеиновой кислоты и сайтом рестрикции Xho I (5'-CTC GAG-3') на 3'-конце молекулы нуклеиновой кислоты.

PA6-gr20 в соответствии с SEQ ID NO: 61 является эндолизином, полученным из *Propionibacterium acnes* фага. Эндолизин PA6-gr20 кодируют молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 123. Молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 123 получили синтетиче-

ским путем с сайтом рестрикции BamH I (5'-GGA TCC-3') на 5'-конце молекулы нуклеиновой кислоты и сайтом рестрикции p Xho I (5'-CTC GAG-3') на 3'-конце молекулы нуклеиновой кислоты.

Приведенные в табл. 5 пептидные цепи использовали для получения слитых белков с энзимами Cpl-1, Ply511, LysK, Lysostaphin (Lss) и PA6-gp20.

Таблица 5

| Пептидная цепь                              | Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая пептидную цепь |
|---|---|
| Pseudin I<br>(SEQ ID NO:51)                 | SEQ ID NO: 95   |
| WLBU2-Variant<br>(SEQ ID NO:55)             | SEQ ID NO: 96   |
| LL-37<br>(SEQ ID NO: 5)                     | SEQ ID NO: 97   |
| Indolicidin<br>(SEQ ID NO: 7)               | SEQ ID NO: 98   |
| Magainin<br>(SEQ ID NO:4)                   | SEQ ID NO: 99   |
| Pleurocidin<br>(SEQ ID NO:1)                | SEQ ID NO: 100  |
| Cecropin A (A.<br>aegypti)<br>(SEQ ID NO:9) | SEQ ID NO:101   |
| Bufoforin II<br>(SEQ ID NO:3)               | SEQ ID NO: 102  |
| Sarcotoxin IA<br>(SEQ ID NO:11)             | SEQ ID NO: 103  |
| PK<br>(SEQ ID NO:13)                        | SEQ ID NO:104   |
| Pentapeptide<br>(SEQ ID NO:12)              | SEQ ID NO:105   |
| PK2<br>(SEQ ID NO: 31)                      | SEQ ID NO:106   |

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие соответствующие пептидные цепи, получили синтетическим путем с Nde I (5'-CAT ATG-3') сайтом рестрикции на 5'-конце молекулы нуклеиновой кислоты и BamH I (5'-GGA TCC-3') сайтом рестрикции на 3'-конце молекулы нуклеиновой кислоты, за исключением молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей PK и PK2 для лигандирования с бактериоцином Lss, который получили с Nco I сайтом рестрикции плюс два дополнительных нуклеотида (5'-CCA TGG GC-3') на 5'-конце молекулы нуклеиновой кислоты.

Слитые белки получают путем соединения как минимум двух последовательностей нуклеиновых кислот с использованием стандартных методов клонирования, описанных, например, в публикации Sambrook et al. 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Таким образом, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие пептидные цепи, частично расщепили с соответствующими энзимами рестрикции Nde I и BamH I и в случае молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей пептидную цепь PK и PK2 для лигандирования с Lss, поглощение осуществили с энзимами рестрикции Nco I и BamH I. После этого расщепленные нуклеиновые кислоты, кодирующие пептидные цепи, лигандировали в рЕТ21b экспрессионном векторе (Novagen, Darmstadt, Germany), который также до этого подвергли расщеплению с соответствующими энзимами рестрикции Nde I и BamH I. Расщепленную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую пептидную цепь PK и PK2 для лигандирования с Lss лигандировали в модифицированный рЕТ32b экспрессионный вектор (немодифицированный вектор производства компании Novagen, Darmstadt, Germany), который также до этого подвергли расщеплению с соответствующими энзимами рестрикции Nco I и BamH I. Модификация рЕТ32b экспрессионного вектора относится к делеции последовательности, кодирующей S-tag и центральный His<sub>6</sub>-tag.

После этого молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие энзимы Cpl-1, Ply511, PA6-gp20, LysK и Lss частично расщепили с энзимом рестрикции BamH I и Xho I таким образом, чтобы было возможно лигандировать эндолизин в рЕТ21b экспрессионном векторе (Novagen, Darmstadt, Germany) и в модифицированном рЕТ32b экспрессионном векторе соответственно, который также до этого подвергли расщеплению с соответствующими энзимами рестрикции BamH I и Xho I.

В случае пептидной цепи PK, которую лигандировали в С-конец лизостафина и LysK, полученный слитый белок имеет His<sub>6</sub>-tag на N-конце, причем His<sub>6</sub>-tag связан с N-концом при помощи линкера. Для клонирования соответствующих молекул нуклеиновых кислот использовали рЕТ32b экспрессионный вектор (Novagen, Darmstadt, Germany).

Таким образом, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую пептидную цепь, лигандировали в соответствующем векторе на 5'-конце молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей соответствующий энзим. Помимо этого, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую соответствующий энзим, лиганди-

рвали в соответствующей плазмиде таким образом, чтобы молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая His<sub>6</sub>-таг, состоящий из шести гистидиновых остатков, ассоциировалась на 3'-конце молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей эндолизин.

Поскольку некоторые слитые белки могут либо проявлять токсичность после экспрессии в бактериальных клетках, либо терять гомогенность вследствие деградации белка, стратегическим выходом из сложившейся дилеммы была бы экспрессия данных слитых белков в слиянии или соединении с другими белками. Примером такого прочего дополнительного белка является тиоредоксин, который показал способность опосредовать экспрессию токсичных антимикробных пептидов в клетках *E. coli* (TrxA mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. Zhou L., Zhao Z., Li B., Cai Y., Zhang S. *Protein Expr. Purif.* 2009 Apr; 64(2):225-230). В случае слитого белка, состоящего из N-концевого РК или РК2 пептида и бактериоцина Lss, пептид лигандируют в модифицированном pET32b экспрессионном векторе таким образом, чтобы дополнительный тиоредоксин ассоциировался на 5'-конце пептида. Тиоредоксин можно удалить из экспрессированного слитого белка путем использования энтерокиназы, причем сайт рестрикции энтерокиназы вводят между молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид и молекулой, кодирующей тиоредоксин.

Последовательность слияний эндолизин-пептид контролировали при помощи секвенирования ДНК, а корректные клоны трансформировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) и в *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Darmstadt, Germany) для экспрессии белка.

Рекомбинантную экспрессию слитого белка в соответствии с SEQ ID NO: 107 до 122 и 124 осуществили в клетках *E. coli* BL21 (DE3) и *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Darmstadt, Germany). Клетки росли до достижения уровня значения оптической плотности OD<sub>600 нм</sub> 0,5-0,8. Затем индуцировали экспрессию слитого белка с 1 mM IPTG (изопропилтиогалактозидом) и осуществляли экспрессию при 37°C в течение 4 ч.

Клетки *E. coli* BL21 собрали центрифугированием в течение 20 мин при 6000g и дезинтегрировали путем разрушения ультразвуком на льду. Суммарный экстракт растворимой и нерастворимой фракций клеток *E. coli* сепарировали центрифугированием (Sorvall, SS34, 30 мин, 15000 rpm). Все белки очистили при помощи Ni<sup>2+</sup> аффинной хроматографии (Akta FPLC, GE Healthcare) с использованием C-концевого His<sub>6</sub>-тага, кодируемого векторами pET21b или pET32b.

Как описано выше, некоторые слитые белки экспрессировали с использованием модифицированного вектора pET32b (S-таг и центральный His<sub>6</sub>- таг удалили), который соединяет слиянием тиоредоксин на N-конце необходимых белков. Вектор также содержит сайт расщепления энтерокиназы, как раз непосредственно перед необходимым белком. Данный сайт позволяет осуществить протеолитическое расщепление между тиоредоксином и необходимым белком, который может быть очищен через оставшийся C-концевой His<sub>6</sub>-таг. Для повышения антимикробной активности слитого белка может возникнуть необходимость удаления тиоредоксина путем электролитического расщепления. В связи с этим слитый белок расщепили с использованием 2-4 юнитов/мг рекомбинантной энтерокиназы (Novagen, Darmstadt, Germany) для удаления тиоредоксина в соответствии с протоколом производителя. После энтерокиназного расщепления слитый белок очистили при помощи His<sub>6</sub>-таговой очистки, как описано далее по тексту.

Ni<sup>2+</sup> аффинную хроматографию осуществили в 4 последовательных этапа, все при комнатной температуре:

1) эквilibрация HiTrap FF 5 мл колонки (GE Healthcare) с 10 объемами колонки отмывочного буфера (20 mM имидазола, 1 M NaCl и 20 mM Hepes (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислоты) при pH 7,4) при скорости потока 3-5 мл/мин;

2) загрузка всего лизата (с требуемым объемом слитого белка) в HiTrap FF 5 ml колонки при скорости потока 3-5 мл/мин;

3) отмывка колонки с 10 объемами колонки отмывочного буфера для удаления несвязанного образца, с последующей повторной отмывкой с 10% элюирующего буфера (500 mM имидазола, 0,5 M NaCl и 20 mM Hepes при pH 7,4) при скорости потока 3-5 мл/мин;

4) элюирование связанных слитых белков из колонки с линейным градиентом 4 объемов колонки элюирующего буфера (500 mM имидазола, 0,5 M NaCl и 20 mM Hepes при pH 7,4) до 100% при скорости потока 3-5 мл/мин.

Очищенные стоковые растворы слитых белков в элюирующем буфере (20 mM Hepes pH 7,4; 0,5 M NaCl; 500 mM имидазола) показали как минимум 90% степень чистоты в соответствии с визуальным контролем на SDS-PAGE гелях (данные не приведены).

Пример 2. Антимикробная активность энзимов Cpl-1, модифицированных с использованием различных пептидных цепей на N-конце.

Слитые белки Cpl-1 с N-концевыми пептидными цепями Pseudin 1, WLBU2-Variant, LL-37, Indolicidin, Magainin, Pleurocidin, Cescropin A (*A. aegypti*), Buforin II, Sarcotoxin IA и РК построили в соответствии с описанием в примере 1. Антимикробную активность упомянутого слитого белка в отношении *Streptococcus pneumoniae* DSMZ 11967 и *Streptococcus pneumoniae* DSMZ 14378 установили методом чашечного анализа (анализа выращивания) в соответствии с приведенным ниже описанием. Антимикроб-

ная активность данного слитого белка представлена в табл. 6. Результаты, представленные в табл. 6, подтверждают высокую антибактериальную активность всех слитых белков в отношении *Streptococcus pneumoniae* DSMZ 11967 и *Streptococcus pneumoniae* DSMZ 14378.

Анализ выращивания.

Экспоненциально растущие клетки, например *Streptococci*, *Listeria*, *Propionibacteria* или *Staphylococci*, (1 мл) охладил на льду и промыл с использованием дистиллированной воды. Бактерии ресуспендировали в 20 мМ Tris pH 7,0, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 М сахарозы. Слитые белки разбавили в ресуспензионном буфере, с добавлением сахарозы, до конечной концентрации 0,5 М и инкубировали (конечная концентрация слитого белка примерно 10 мкг/мл) с соответствующим бактериями в течение 60 мин при комнатной температуре. После этого поместили бактерии в чашки с подходящим агаром (например, *Streptococci*: колумбийский кровяной агар), с содержанием 0,5 М сахарозы и полученные колонии пересчитали после инкубации.

Остаточные колонии пересчитали после ночной инкубации при 37°C. На основе чисел клеток рассчитали антибактериальную активность в логарифмических юнитах ( $=\log_{10}N_0/N_i$ , где  $N_0$  = число необработанных клеток, а  $N_i$  = число обработанных клеток). Все образцы реплицировали как минимум в 4 раза.

Таблица 6

| Слитый белок  | Энзимная составляющая | Пептидная цепь (N-концевая, если не указано иначе) | Активность в отношении <i>Streptococcus pneumoniae</i> DSMZ 11967 | Активность в отношении <i>Streptococcus pneumoniae</i> DSMZ 14378 |
|---------------|-----------------------|--|---|---|
| SEQ ID NO:107 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | Pseudin 1 (SEQ ID NO:51)                           | +++   | +++   |
| SEQ ID NO:108 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | WLBU2-Variant (SEQ ID NO:55)                       | ++  | ++  |
| SEQ ID NO:109 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | LL-37 (SEQ ID NO:5)                                | +++   | +++   |
| SEQ ID NO:110 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | Indolicidin (SEQ ID NO:7)                          | +++   | +++   |
| SEQ ID NO:111 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | Magainin (SEQ ID NO:4)                             | +++   | +++   |
| SEQ ID NO:112 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | Pleurocidin (SEQ ID NO:1)                          | +++   | +++   |
| SEQ ID NO:113 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | Cecropin A (A. aegypti) (SEQ ID NO:9)              | +++   | +++   |
| SEQ ID NO:114 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | Bufoforin II (SEQ ID NO:3)                         | +++   | +++   |
| SEQ ID NO:115 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | Sarcotoxin IA (SEQ ID NO:11)                       | +++   | +++   |
| SEQ ID NO:116 | Cpl-1 (SEQ ID NO:57)  | PK (SEQ ID NO:13)                                  | +++   | +++   |

Сокращения: +: 1 лог; ++: 2-3 лог; +++: 4 или более лог.

Пример 3. Антимикробная активность энзима Ply511, модифицированного с использованием пентапептида на N-конце.

Слитый белок Ply511 с N-концевой пептидной цепью-пентапептидом в соответствии с SEQ ID NO: 12 построили в соответствии с описанием в примере 1. Антимикробную активность упомянутого слитого белка в отношении *Listeria monocytogenes* DSMZ 15675 и *Listeria monocytogenes* DSMZ 20600 установили методом чашечного анализа (анализа выращивания) в соответствии с приведенным в примере 2 описанием. Антимикробная активность слитого белка представлена в табл. 7.

Результаты, представленные в табл. 7, подтверждают высокую антибактериальную активность слитого белкового пентапептида в отношении: Ply511 against *Listeria monocytogenes* DSMZ 15675 and *Listeria monocytogenes* DSMZ 20600.

Таблица 7

| Слитый белок  | Энзимная составляющая | Пептидная цепь (N-концевая, если не указано иначе) | Активность в отношении <i>Listeria monocytogenes</i> DSMZ 15675 | Активность в отношении <i>Listeria monocytogenes</i> DSMZ 20600 |
|---------------|-----------------------|--|---|---|
| SEQ ID NO:117 | Ply511 (SEQ ID NO:58) | Пентапептид (SEQ ID NO:12)                         | +++   | +++   |

Сокращения: +: 1 лог; ++: 2-3 лог; +++: 4 или более лог.

Пример 4. Антимикробная активность энзима Lss и LysK, модифицированного с поликатионными пептидами на N-конце или C-конце.

Слитые белки Lss и LysK соответственно с N-концевой пептидной цепью PK в соответствии с SEQ ID NO: 13, слитый белок Lss с N-концевой пептидной цепью PK2 в соответствии с SEQ ID NO: 31, а также слитые белки Lss и LysK соответственно с C-концевой пептидной цепью PK построили в соответствии с описанием в примере 1. Антимикробную активность упомянутых слитых белков в отношении *Staphylococcus aureus* DSMZ 346 и *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20041 установили методом чашечного анализа (анализа выращивания) в соответствии с приведенным в примере 2 описанием, а также согласно лизисному анализу, как приведено ниже.

Лизисный анализ.

Лизисный анализ провели для исследования антимикробной активности слитых модифицированных белков LysK и Lysostaphins.

Стафилококковые клетки вырастили в среде ВНИ до достижения оптической плотности 600 нм 0,7-1 (показатель присутствия экспоненциального роста). Клетки собрали центрифугированием и ресуспендировали в лизирующем буфере (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>). Клетки ресуспендировали при оптической плотности 600 нм 1,0 и инкубировали со слитыми белками. Активность определили спектрофотометрическим методом при 600 нм.

Антимикробная активность слитого белка представлена в табл. 8.

Результаты, представленные в табл. 8, подтверждают высокую антибактериальную активность слитых белков Lss с N-концевым пептидом PK или PK2 в отношении *Staphylococcus aureus* DSMZ 346 и *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20041. Антибактериальную активность в отношении двух протестированных бактериальных штаммов показали также другие слитые белки.

Таблица 8

| Слитый белок  | Энзимная составляющая      | Пептидная цепь (N-концевая, если не указано иначе) | Активность в отношении <i>Staphylococcus aureus</i> DSMZ 346 | Активность в отношении <i>Staphylococcus epidermidis</i> DSMZ 20041 |
|---------------|----------------------------|--|--|---|
| SEQ ID NO:118 | LysK (SEQ ID NO:59)        | PK (SEQ ID NO:13)                                  | +  | +   |
| SEQ ID NO:119 | Lysostaphin (SEQ ID NO:60) | PK (SEQ ID NO:13)                                  | +++  | +++   |
| SEQ ID NO:120 | Lysostaphin (SEQ ID NO:60) | PK2 (SEQ ID NO:31)                                 | +++  | +++   |
| SEQ ID NO:121 | LysK (SEQ ID NO:59)        | PK (C-terminal) (SEQ ID NO:13)                     | +  | +   |
| SEQ ID NO:122 | Lysostaphin (SEQ ID NO:60) | PK (C-terminal) (SEQ ID NO:13)                     | +  | +   |

Сокращения: +: 1 лог; ++: 2-3 лог; +++: 4 или более лог.

Пример 5. Антимикробная активность энзима PA6-gp20, модифицированного с гидрофобной пептидной цепью Walmagh 1.

Слитый белок PA6-gp20 с N-концевой пептидной цепью Walmagh 1 в соответствии с SEQ ID NO: 56 построили в соответствии с описанием в примере 1. Антимикробную активность упомянутого слитого белка в отношении *Propionibacterium acnes* DSMZ 1897 и *Propionibacterium acnes* DSMZ 16379 установили методом чашечного анализа (анализа выращивания) в соответствии с приведенным в примере 2 описанием. Антимикробная активность слитого белка представлена в табл. 9.

Результаты, представленные в табл. 9, подтверждают антибактериальную активность слитого белка в отношении обоих бактериальных штаммов *Propionibacterium acnes*.

Таблица 9

| Слитый белок      | Энзимная составляющая      | Пептидная цепь (N-концевая, если не указано иначе) | Активность в отношении <i>Propionibacterium acnes</i> DSMZ 1897 | Активность в отношении <i>Propionibacterium acnes</i> DSMZ 16379 |
|-------------------|----------------------------|--|---|--|
| SEQ ID NO:<br>124 | PA6-gp20<br>(SEQ ID NO:61) | Walmagh 1<br>(SEQ ID NO:56)                        | ++  | ++   |

Сокращения: ++: 2-3 лог.

Слитые белки в табл. 6-9 без тагов (меток) и линкеров также были протестированы в соответствии с вышеописанными опытами по определению активности. Все они показали антимикробную активность в отношении используемых бактериальных штаммов, приведенных в табл. 6-9.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, состоящий из эндолизина с функцией разрушения клеточной стенки грамположительных бактерий и амфипатичной пептидной цепи, слитой с эндолизином со стороны N-конца и/или C-конца, причем амфипатичная пептидная цепь содержит от 5 до 100 аминокислотных остатков, и при этом один или более аминокислотных остатков амфипатичной пептидной цепи представляют собой положительно заряженные остатки лизина и/или аргинина и как минимум 60% аминокислотных остатков амфипатичной пептидной цепи представляют собой гидрофобные остатки валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, треонина, серина, пролина и/или глицина.

2. Слитый белок по п.1, характеризующийся тем, что амфипатичная пептидная цепь содержит от 5 до 50 аминокислотных остатков.

3. Слитый белок по п.1 или 2, характеризующийся тем, что амфипатичная пептидная цепь представляет собой природный пептид.

4. Слитый белок по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что содержит дополнительный аминокислотный остаток на N-конце.

5. Слитый белок по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что амфипатичная пептидная цепь связана с эндолизином по меньшей мере через один дополнительный аминокислотный остаток

6. Слитый белок по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что грамположительные бактерии относятся к классу бактерий *Bacilli*.

7. Слитый белок п.6, характеризующийся тем, что грамположительные бактерии относятся к родам бактерий *Staphylococcus* и/или *Streptococcus*.

8. Слитый белок по любому из пп.1-6, характеризующийся тем, что эндолизин имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, 57, 58, 60 или 61.

9. Слитый белок по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что как минимум 30% аминокислотных остатков амфипатичной пептидной цепи являются положительно заряженными остатками лизина и/или аргинина.

10. Слитый белок по любому из пп.1-8, характеризующийся тем, что амфипатичная пептидная цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 7, 2, 6, 1, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 23, 48, 49, 50, 51, 52 или 53.

11. Слитый белок по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что содержит tag-метку на C- и/или N-концах.

12. Слитый белок по п.11, характеризующийся тем, что указанная tag-метка связана со слитым белком по меньшей мере через один дополнительный аминокислотный остаток.

13. Слитый белок по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, 63-65, 67, 70 или 73-81.

14. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок по любому из пп.1-13.

15. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.14.

16. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.14 или вектор по п.15.

17. Применение слитого белка по любому из пп.1-12 в качестве компонента косметического препарата.

18. Применение слитого белка по любому из пп.1-13 в качестве медикаментозного препарата для лечения или профилактики инфекций, вызываемых грамположительными бактериями.

19. Применение слитого белка по любому из пп.1-13 в качестве дезинфектанта.

20. Применение слитого белка по любому из пп.1-13 для обработки или профилактики заражения грамположительными бактериями пищевых продуктов, оборудования на предприятиях пищевой промышленности, поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами, медицинского оборудования, поверхностей в стационарах и хирургических блоках.

21. Применение слитого белка по любому из пп.1-13 в качестве средства диагностики инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, в медицине, пищевой промышленности и природоохранной деятельности.

22. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, содержащая слитый белок по любому из пп.1-13.

