

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578614EA/019

ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПРОТИВ ИНФЕКЦИИ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей белки *Streptococcus pneumoniae*, к новой вакцине, которая является эффективной против бактерии *Streptococcus pneumoniae*, и настоящее изобретение также включает способы лечения или профилактики бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* и способы иммунизации против бактериальных инфекций *Streptococcus pneumoniae*. Кроме того, в объем настоящего изобретения входят нуклеиновые кислоты, кодирующие белки *Streptococcus pneumoniae*, для включения в программу вакцинации на основе ДНК/РНК.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Streptococcus pneumoniae представляет собой носоглоточную комменсальную бактерию, которая также может проникать в обычно стерильные участки и вызывать пневмонию, инфицирование кровотока и менингит, а также неинвазивные заболевания, такие как отит среднего уха. Хотя структура популяции пневмококков и эволюционная генетика хорошо определены, однако, неясно, отличаются ли генетически пневмококки, вызывающие инвазивные заболевания, от пневмококков, которые не вызывают такие заболевания. Kulohoma et al. (Infection and Immunity; 2015, 83, 10, 4165-4896) сообщали о полногеномном секвенировании 140 изолятов *S. pneumoniae*, выделенных из кровотока и из участка, пораженного менингитом, и обнаружили, что эти изоляты имеют общую коровую область из 1427 генов, и что отсутствуют какие-либо различия в содержании основного генома или в содержании дополнительных генов, ответственных за проявление таких заболеваний. Таким образом, присутствие/отсутствие гена само по себе не объясняет инвазивную природу пневмококков, и факторами, способствующими развитию таких заболеваний, могут быть генетические модификации, такие как полиморфизмы нуклеотидов или антигенные единицы.

Из предшествующего уровня техники известно, что существует более 100 пневмококковых серотипов, каждый из которых продуцирует биохимически отличающийся капсулярный полисахарид (CPS), и все они различаются по предрасположенности вызывать инвазивное заболевание. Серотип 1 является одной из наиболее частых причин инвазивной болезни легких (ИБЛ) во всем мире, на которую приходится 11,7% случаев заболеваний в Африке, и, в отличие от других серотипов, серотип 1 связан со вспышками заболеваний в закрытых сообществах и вспышками летального менингита в Западной Африке. Большой вред, который наносит серотип 1 при ИБЛ, подчеркивает необходимость создания эффективной вакцины против этого серотипа. Cornick et al. (Vaccine, 2017, 35(6), 972-980) показали преобладание семи потенциальных белков-кандидатов на вакцину (CbpA, PcpA, PhtD, PspA, SP0148, SP1912, SP2108) среди 445 пневмококков серотипа 1 из 26 разных стран на четырех континентах. CbpA (76%), PspA (68%), PhtD (28%), PcpA (11%) не всегда присутствуют у людей исследуемой группы

и не обеспечивают полного охвата против серотипа 1. Так, например, хотя PspA широко распространен в Европейских странах (82%), однако, он редко встречается в Африканских странах (2%). Авторы предположили, что поливалентная вакцина, включающая SbpA, PspA, PhtD и PspA, может обеспечить охват 86% населения всего мира, и выступили за дальнейшее исследование белковой вакцины, дополнительно включающей один вариант SP0148, SP1912 и/или SP2108 из *Streptococcus pneumoniae* TIGR4.

Пневмококковые вакцины защищают от серьезных и потенциально смертельных пневмококковых инфекций у людей с высоким риском развития заболевания, таких как младенцы в возрасте до двух лет, взрослые старше 65 лет и дети, а также лица с ослабленным иммунитетом с определенными хроническими заболеваниями, такими как болезни сердца и почек. В настоящее время, в Великобритании обычно используются два типа пневмококковой вакцины, и, в зависимости от возраста, их по-разному вводят младенцам и лицам старше 65 лет. Prevenar 13® (также известный как PCV-13) представляет собой пневмококковую полисахаридную конъюгированную вакцину (PCV), которая обеспечивает защиту от 13 серотипов бактерии *Streptococcus pneumoniae* и используется для вакцинации детей в возрасте до двух лет, тогда как пневмококковая полисахаридная вакцина PPV-23 (также известная как Pneumovax), защищающая от 23 серотипов, назначается людям в возрасте 65 лет и старше. Проблема, связанная с этой вакциной, заключается в том, что она не особенно эффективна для детей моложе двух лет. Действительно, считается, что обе эти вакцины только на 50-70% эффективны в предотвращении пневмококковой инфекции. Кроме того, основным ограничением применения PCV является то, что они вызывают выработку защитных антител только против серотипов, включенных в состав вакцины. В результате, невакцинные серотипы могут увеличиваться по своей частоте при ИБЛ и являются инвазивными после введения PCV, как это наблюдалось после внедрения PCV7 в США (Weinberger et al; Lancet, 2011, 378; 1968-1973).

Предпосылками для эффективной пневмококковой вакцины являются консервативная экспрессия и минимальная вариабельность антигена-мишени в популяции пневмококков, а также способность индуцировать сильный иммунный ответ у человека.

Еще одна цель состоит в том, чтобы получить пневмококковую вакцину, эффективную для людей всех возрастов, а в частности, для новорожденных и детей грудного возраста.

В настоящем изобретении продемонстрирована эффективная пневмококковая вакцина с потенциально высокой способностью индуцировать устойчивый иммунный ответ у человека. Эта вакцинация будет эффективна для людей всех возрастов, а в частности, для новорожденных, младенцев, пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом.

Более 100 различных штаммов *S. pneumoniae* являются основной глобальной причиной заболеваемости и смертности среди детей и взрослых. Имеющиеся в продаже пневмококковые вакцины, такие как Превенар-13 (для детей) и Пневмовакс-23 (для взрослых), широко используются в настоящее время, однако, для их производства

используются штаммоспецифические углеводные антигены, что делает их производство дорогостоящим (самые дорогие вакцины в мире, до пандемии Covid) и резко ограничивает их охват. Вакцины согласно изобретению были разработаны совершенно иначе, чем существующие в настоящее время пневмококковые вакцины, то есть, вместо нацеливания на молекулы сахара на поверхности бактерий, которые варьируются от штамма к штамму, что ограничивает диапазон защиты, вакцины согласно изобретению были разработаны так, чтобы они нацеливались на высококонсервативные белки, присутствующие во всех 100 штаммах пневмококков. Проведенные авторами исследования показали, что иммунологические композиции согласно изобретению способны индуцировать эквивалентный или лучший защитный иммунный ответ против пневмококковых штаммов, покрываемых вакциной Pfizer PCV-13, а также штаммов, которые не покрываются этими вакцинами. Сочетание широкого охвата и низких производственных затрат отличает иммунологические композиции согласно изобретению от всех существующих и находящихся на стадии разработки вакцин против пневмококка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В своем первом аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере две антигенные детерминанты, где антигенные детерминанты происходят по меньшей мере из двух белков, выбранных из ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

В своем втором аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей генетическую конструкцию или конструкции, кодирующие по меньшей мере две антигенные детерминанты, где антигенные детерминанты происходят по меньшей мере из двух белков, выбранных из ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

В своем третьем аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере одну антигенную детерминанту и генетическую конструкцию или конструкции, кодирующие по меньшей мере одну другую антигенную детерминанту, где антигенные детерминанты происходят по меньшей мере из двух белков, выбранных из ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

Настоящее изобретение также относится к вакцине, содержащей иммуногенную композицию согласно первому, второму или третьему аспектам изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения, профилактики, диагностики или скрининга бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума, включающему введение достаточного количества иммунологической композиции согласно первому, второму или третьему аспектам изобретения или вакцины согласно изобретению для лечения, профилактики, диагностики или скрининга бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума, нуждающегося в этом.

Настоящее изобретение также относится к способу иммунизации индивидуума против инфекции, инициируемой бактериями *Streptococcus pneumoniae*, где указанный

способ включает введение эффективного количества иммунологической композиции согласно первому, второму или третьему аспекту изобретения или вакцины согласно изобретению индивидууму, нуждающемуся в этом.

Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что иммунизация комбинацией антигенных детерминант, полученных из любых двух белков ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*, обеспечивает хороший иммуногенный ответ. Антигенные детерминанты могут быть использованы непосредственно или их можно вводить в виде генетической конструкции, кодирующей антигенную детерминанту, а также может быть использована смесь антигенных детерминант и генетических конструкций, кодирующих различные антигенные детерминанты. Таким образом, иммуногенные композиции согласно изобретению могут содержать по меньшей мере две антигенные детерминанты или одну или более генетических конструкций, кодирующих по меньшей мере две антигенные детерминанты, или по меньшей мере одну антигенную детерминанту и по меньшей мере одну генетическую конструкцию, кодирующую по меньшей мере одну другую антигенную детерминанту.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенная композиция получена на основе антигенных детерминант, происходящих от каждого из белков ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*, и они могут быть представлены в виде любой комбинации антигенных детерминант и генетических конструкций, кодирующих одну или несколько антигенных детерминант (например, могут присутствовать три антигенные детерминанты, две антигенные детерминанты и одна генетическая конструкция, кодирующая третью антигенную детерминанту; одна антигенная детерминанта и генетическая конструкция или конструкции, кодирующие вторую и третью антигенные детерминанты, или генетическая конструкция или конструкции, кодирующие все три антигенные детерминанты).

В вариантах осуществления изобретения, в которых две или более антигенных детерминант кодируются генетическими конструкциями, каждая отдельная антигенная детерминанта может кодироваться другой генетической конструкцией, или две или более различных антигенных детерминант могут кодироваться одной генетической конструкцией. Так, например, в иммуногенной композиции согласно изобретению, содержащей генетическую конструкцию или конструкции, кодирующие антигенные детерминанты, происходящие от каждого из белков ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*, каждая антигенная детерминанта может кодироваться отдельной генетической конструкцией, или две антигенные детерминанты могут кодироваться одной генетической конструкцией, а другая - второй генетической конструкцией, или все три антигенные детерминанты могут кодироваться одной генетической конструкцией.

Генетические конструкции, подходящие для их использования в настоящем изобретении, включают любые структуры на основе нуклеиновых кислот, которые являются эффективными для экспрессии антигенных детерминант при введении реципиенту. Подходящие генетические конструкции включают ДНК-конструкции

(например, ДНК-плазмиду или ДНК-вакцину), РНК-конструкции (например, РНК-вакцину или информационную РНК), конструкции на основе бактерий и конструкции на основе вирусов (такие как конструкции на основе инактивированного или живого аттенуированного вируса).

ДНК-вакцины содержат ДНК, кодирующую специфические белки (антигены) патогена. ДНК вводят в организм, после чего она поглощается клетками, в которых обычные метаболические процессы синтезируют белки на основе генетического кода в плазмиде, которую они поглощают.

РНК-вакцины или мРНК-вакцины (на основе матричной РНК) представляют собой тип вакцины, в которой используется искусственная копия природного химического вещества для выработки иммунного ответа. Вакцина переносит молекулы синтетической РНК в клетки человека и стимулирует адаптивный иммунный ответ, а обычно, молекулу мРНК покрывают носителем для доставки лекарственного средства, а именно, наночастицами на основе ПЭГилированного липида.

Настоящее изобретение также предусматривает возможность использования ДНК/РНК посредством систем доставки, таких как живые аттенуированные вирусы, такие как, например, но не ограничивающиеся ими, ретровирус, аденовирус, вирус простого герпеса, вирус осповакцины, или систем доставки на основе липосом, например, эмульсий, микрочастиц, иммуностимулирующих комплексов ISCOM и липосом.

Иммуногенная композиция согласно изобретению может быть предназначена для введения человеку. Предпочтительно, эта композиция предназначена для введения индивидууму. Предпочтительным индивидуумом является человек. В одном варианте осуществления изобретения, индивидуумом является взрослый человек, такой как пожилой человек старше 65 лет; младенец в возрасте до 1 года; малыш от 1 до 2 лет; ребенок от 2 до 5 лет; или человек любого возраста с ослабленным иммунитетом.

В одном из вариантов осуществления изобретения, антигенная детерминанта, полученная из ABC-T, если она присутствует, имеет размер от 30 до 50 кДа, а в идеальном случае, приблизительно 40 кДа; антигенная детерминанта, полученная из P_{av}A, если она присутствует, имеет размер от 55 до 70 кДа, а в идеальном случае, приблизительно 63 кДа; и антигенная детерминанта, полученная из Z_{mp}B, если она присутствует, имеет размер от 125 до 155 кДа, а в идеальном случае, приблизительно 148 кДа. Эти последовательности охватывают экспонированные на поверхности фрагменты белков, которые, как предполагается, содержат иммунные эпитопы во фланкирующих областях.

В варианте иммуногенной композиции согласно изобретению, содержащей антигенную детерминанту, полученную из ABC-T, или генетическую конструкцию, кодирующую антигенную детерминанту, полученную из ABC-T, антигенная детерминанта содержит последовательность белка или состоит из последовательности белка SEQ ID NO:1, или ее иммунологически эффективного фрагмента, или иммунологически эффективного аналога последовательности или ее фрагмента.

В варианте иммуногенной композиции согласно изобретению, содержащей

антигенную детерминанту, полученную из P_{av}A, или генетическую конструкцию, кодирующую антигенную детерминанту, полученную из P_{av}A, антигенная детерминанта содержит последовательность белка или состоит из последовательности белка SEQ ID NO:2, или ее иммунологически эффективного фрагмента, или иммунологически эффективного аналога последовательности или ее фрагмента.

В варианте иммуногенной композиции согласно изобретению, содержащей антигенную детерминанту, полученную из Z_{mp}B, или генетическую конструкцию, кодирующую антигенную детерминанту, полученную из Z_{mp}B, антигенная детерминанта содержит последовательность белка или состоит из последовательности белка SEQ ID NO:3, или ее иммунологически эффективного фрагмента, или иммунологически эффективного аналога последовательности или ее фрагмента.

Предпочтительно, иммуногенная композиция согласно изобретению дополнительно включает иммуностимулирующий агент, а более предпочтительно, иммуностимулирующий агент представляет собой адъювант, описанный ниже.

Предпочтительно, композиция может включать дополнительный набор из одной или более антигенных детерминант бактерии *Streptococcus pneumoniae*, которые могут быть инкапсулированы или конъюгированы и выбраны из группы, включающей пневмококковый поверхностный белок А (P_{sp}A), пневмококковый холинсвязывающий белок А (P_{cr}A), секретируемый белок Usp45-гидролазу размером 45 кДа (P_{cs}B), серин/треониновую протеинкиназу (StkP), пептидный фермент пермеазу, переносчик марганца-ABC (P_{sa}A), пневмолизин D (PlyD), пневмолизиновый токсоид (dPly), холинсвязывающий белок А (C_{bp}A) и D (C_{bp}D), белок гистидиновой триады D (PhtD), белок гистидиновой триады E (PhtE), белок гистидиновой триады А (PhtA), белок гистидиновой триады В (PhtB); пневмококковый белок поглощения железа А (P_{iu}A), белок отделения клеточной стенки (P_{cs}B), пневмококковую серин-треонинкиназу (StkP) и их аналоги, плазмин и фибронектин-связывающий белок А (P_{fb}B), SP0148, SP1912 и SP2108, SP0785, SP1500, SP2216.

В соответствии с еще одним своим аспектом, настоящее изобретение относится к описанной здесь иммуногенной композиции в форме набора, например, запечатанного в подходящем контейнере, который защищает ее содержимое от внешней среды. Такой набор может включать инструкции по его применению.

Предпочтительно, иммуногенную композицию упаковывают в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или саше с указанием количества композиции. В одном варианте осуществления изобретения, композиция поставляется в виде жидкости, суспензии, таблетки или спрея. В другом варианте осуществления изобретения, композиция поставляется в виде сухого стерилизованного лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, при этом, композиция может быть разведена, например, водой или физиологическим раствором, для получения подходящей концентрации для введения индивидууму.

Если вакцину согласно изобретению вводят системно, например, путем подкожной

или внутримышечной инъекции, то можно использовать иглу и шприц или безыгольное устройство для введения, например, доставка может включать, но не ограничивается ими, ингаляционную или интраназальную доставку. Вакцинная композиция может быть заключена в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы из стекла или пластика, содержащие дробные дозы.

Иммуногенные композиции и вакцины согласно изобретению обычно представляют собой единую композицию, то есть, единую композицию, включающую все требуемые компоненты, однако, следует отметить, что настоящее изобретение также относится к композициям и вакцинам, которые представлены в виде нескольких композиций, например, первой композиции, содержащей одну или несколько антигенных детерминант и/или генетических конструкций, кодирующих одну или несколько антигенных детерминант, и второй композиции, содержащей другую из указанных антигенных детерминант, и/или генетическую конструкцию, кодирующую другую из указанных антигенных детерминант; или в виде первой композиции, содержащей одну или несколько указанных антигенных детерминант, и/или одну или несколько генетических конструкций, кодирующих одну или несколько антигенных детерминант из числа указанных антигенных детерминант, и второй композиции, содержащей один или более адъювантов, либо в комбинации с дополнительными антигенными детерминантами и/или генетическими конструкциями, кодирующими дополнительные антигенные детерминанты, либо в их отсутствии. В этом случае может быть введено множество композиций одновременно или последовательно. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума или иммунизации против бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума, где указанный способ включает введение достаточного количества по меньшей мере одной антигенной детерминанты, полученной из белка, выбранного из ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*, и одновременное или последовательное введение достаточного количества по меньшей мере одной антигенной детерминанты, полученной из белка, выбранного из других ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

Настоящее изобретение также относится к иммунологической композиции согласно изобретению или к вакцине согласно изобретению для применения в целях лечения или профилактики бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума и/или для иммунизации против бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума и/или для диагностики или скрининга бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему иммуногенную композицию согласно изобретению или вакцину согласно изобретению, и средства для введения иммуногенной композиции или вакцины индивидууму. Наборы согласно изобретению могут включать, но необязательно, дополнительные компоненты, выбранные из одного или нескольких носителей и средств для ресуспендирования лиофилизированной композиции или вакцины.

Следует отметить, что предпочтительные признаки, приписываемые одному аспекту изобретения, применимы с соответствующими изменениями к каждому аспекту изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Варианты осуществления изобретения далее описаны со ссылкой на прилагаемые чертежи, где:

На фигуре 1 показана SEQ ID NO:1, усеченный сегмент последовательности белка-переносчика пневмококкового АТФ-связывающего кластера пермеазы (ABC-T). ID гена: 13695552, обозначение гена: HMPREF1038_02239, белок WP_000834690.1.

На Фигуре 2 показана SEQ ID NO:2, последовательность белка пневмококкового фактора адгезии и вирулентности A (PavA).

На фигуре 3 показана SEQ ID NO:3, усеченный сегмент последовательности белка пневмококковой цинк-металлопротеазы B (ZmpB).

На Фигуре 4 показана иммуносвязывающая активность сывороток человека, взятых у детей: n=13, у внебольничных пациентов (ВП): n=5, у пожилых пациентов: n=3, у здоровых добровольцев: n=5 и взрослых людей с ВИЧ: n=5. Мышиную сыворотку, полученную от мышей дикого типа, не участвующих в эксперименте, использовали в качестве негативного контроля (контрольная сыворотка), чтобы показать отсутствие связывания. Планшеты покрывали либо только PavA, либо только ABC-T, либо только ZmpB, либо всеми 3 белками в комбинации (PAZ).

На Фигуре 5 показано подтверждение роли трех пневмококковых антигенов ABC-T, PavA и ZmpB в инвазии центральной нервной системы. Количество жизнеспособных клеток, собранных в тканях головного мозга мышей с моделью менингита, определяли в различные моменты времени (дни) после заражения.

На фигуре 6 показаны клинические оценки у мышей, иммунизированных комбинацией из трех антигенных детерминант, полученных из ABC-T, PavA и ZmpB, отдельно или в комбинации с квасцами или CpG-хитозаном, где на фигуре 6A показана оценка для новорожденных, а на фигуре 6B - для взрослых. Сокращения: Ag: смесь антигенов ABC-T, PavA и ZmpB; PCV-13: Пневмококковая конъюгированная вакцина (PCV-13/Превенар-13).

На фигуре 7A показаны результаты исследований по иммунизации в зависимости от дозы антитела, на **фигуре 7B** показаны результаты клеточно-опосредованного иммунного ответа при вакцинации вакцинными составами, на **фигуре 7C** (антитело-опосредованный иммунитет) и на **фигуре 7D** (клеточно-опосредованный иммунитет) показано, что результаты вакцинации вакцинными составами обеспечивают усиленную защиту от болезней по сравнению с обычным адьювантом из квасцов.

На фигуре 8 показана эффективность препаратов вакцины и адьюванта по сравнению с коммерчески доступным препаратом Prevenar 13® (PCV-13) у взрослых и новорожденных мышей с моделью пневмококкового сепсиса и пневмонии. Кривые выживаемости Каплана-Мейера были построены по данным заражения пневмококками у

взрослых (**Фигура 8А**) и новорожденных (**Фигура 8В**) мышей. Количество жизнеспособных бактерий в тканях легких и крови новорожденных мышей показано на **фигурах 8С** и **8D**, соответственно. Сокращения: Ag: антиген (комбинация трех антигенных детерминант, полученных из ABC-T, PavA и ZmpB); PrPV: композиция согласно изобретению, описанная в настоящей заявке.

На Фигуре 9 показано, что вакцинные составы согласно изобретению обеспечивают лучшую иммунозащитную эффективность против нечувствительных к PCV13 серотипов (то есть, серотипов 8, 11А и 33F) по сравнению с PCV-13 в отношении процента выживаемости (**Фигура 9А**) и показателей клинической боли (**Фигура 9В**).

На фигуре 10 показано, что вакцинные составы согласно изобретению активируют/стимулируют ответы CD4⁺-Т-клеток *ex vivo*, а именно, мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК).

На фигуре 11 показано, что вакцинный состав согласно изобретению активирует В-клетки плазмы в человеческих МКПК.

На Фигуре 12 показаны результаты экспериментов по пассивному переносу: сыворотка мышей, иммунизированных вакцинными препаратами согласно изобретению, обеспечивает пассивный иммунитет у интактных мышей, о чем свидетельствует выживаемость мышей (**Фигура 12А**) и колониеобразующие единицы (КОЕ) (**Фигура 12В**) в крови и в легких.

На Фигуре 13 показаны результаты экспериментов по пассивному переносу человеческих МКПК: концентрированный супернатант из культур человеческих МКПК, стимулированных вакцинными композициями согласно изобретению, сообщает пассивный иммунитет интактным мышам, на что указывает выживаемость мышей (**Фигура 13А**) и наличие колониеобразующих единиц (КОЕ) (**Фигура 13В**) в крови и в легких.

На Фигуре 14 показаны результаты анализа на удаление опсонофагоцитоза у мышей: иммунизация вакцинным составом согласно изобретению (PrPv) способствует опсонизации пневмококков *in vitro* и превосходит Превенар-13 (PCV-13).

На Фигуре 15 показано, что вакцинация составом со смешанными белками согласно изобретению демонстрирует повышенную иммуногенность по сравнению с составами с одним белком, содержащим CpG-хитозан в качестве адъюванта, на **Фигуре 15А** показана доза-ответ антител для антиген-специфических IgG1 и IgG2a, а на **Фигуре 15В** показан клеточно-опосредованный иммунный ответ после вакцинации.

На Фигуре 16 показано, что вакцинация смешанным белковым составом согласно изобретению обеспечивает усиленную защиту от заболевания по сравнению с одиночными белками, содержащими CpG-хитозан в качестве адъюванта. **На Фигуре 16А** показаны кривые выживаемости для взрослых мышей, а на **Фигуре 16В** указаны колониеобразующие единицы (КОЕ) в крови и легких.

На фигуре 17 показано, что комбинации белков (ABC-T+PavA+ZmpB) и (ABC-T+ZmpB) обеспечивают 100% защиту (n=5 мышей на группу), и что комбинации белков (PavA+ABC-T) и (PavA+ZmpB) обеспечивают 60% защиту, в то время как 80% мышей,

получавших только раствор носителя, погибали от инфекции в течение 46 часов после введения (17А). Также показано количество жизнеспособных клеток (КОЕ), определенное в крови (17В) и тканях легких (17С). Все составы также включали СрG-хитозан.

На Фигуре 18 показаны результаты назальной колонизации *Streptococcus pneumoniae* после иммунизации (первая первичная и вторая бустер-иммунизация) только антигенами (показано зеленым), только СрG-хитозаном (показано синим) и антигенами, смешанными с СрG-хитозаном (показано красным) в течение 0, 1, 3, 9 и 15 дней после иммунизации, как показано на панелях А, В, С, D и Е, соответственно. Сокращения: КОЕ: колониеобразующие единицы; NP: носоглотка; pi: после инфицирования.

На Фигуре 19 показаны результаты пролиферации иммунных клеток *ex vivo* (CD3⁺CD4⁺-клеток, собранных из брыжеечных лимфатических узлов), полученных у мышей, иммунизированных составом смешанного белка согласно изобретению и впоследствии колонизированных *S. pneumoniae*. Показана панель окрашивания: CD4-FITC; CD3-APC; Ki67-PEcy7.

На Фигуре 20 показано индуцирование IL-17A-позитивных Т-клеток памяти (CD62L⁺CD44⁺) в тканях легких мышей, иммунизированных носителем, СрG-хитозаном отдельно или композицией согласно изобретению (PrPV), то есть, ABC-T+PavA+ZmpB+СрG-хитозан. Репрезентативные графики проточной цитометрии показаны на фигуре 20А, а групповые сравнения показаны на фигуре 20В. Сокращение: MFI, средняя интенсивность флуоресценции.

На Фигуре 21 показана защитная эффективность иммунизации мышей составом вакцинного антигена согласно изобретению, включающим адъювант на основе бета-глюкана, отличающийся от СрG-хитозана.

На Фигуре 22 показана SEQ ID NO:4, последовательность мРНК усеченного сегмента пневмококкового АТФ-связывающего кластера-переносчика пермеазы (ABC-T), соответствующая аминокислотной последовательности, представленной на Фигуре 1 (SEQ ID NO:1).

На Фигуре 23 показана SEQ ID NO:5, последовательность мРНК пневмококкового фактора адгезии и вирулентности А (PavA), соответствующая аминокислотной последовательности, представленной на Фигуре 2 (SEQ ID NO:2).

На Фигуре 24 показана SEQ ID NO:3, последовательность мРНК усеченного сегмента цинк-металлопротеазы В пневмококка (ZmpB), соответствующая аминокислотной последовательности, представленной на Фигуре 3 (SEQ ID NO:3).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Термин «иммуногенная композиция» относится к любой композиции, которая обладает способностью вызывать иммунный ответ в организме человека или другого животного, и этот термин может включать, например, вырабатывание антител, вырабатывание иммунного ответа, опосредуемого Т-клетками и/или В-клетками, или вырабатывание любого другого ответа на введение вакцины в организм, обеспечивающего защиту в будущем от заболевания или инфекции.

Используемый здесь термин «вакцина» относится к биологическому препарату, который является подходящим для введения в организм человека или животного и для индуцирования иммунного ответа, как определено выше.

Используемые здесь термины «лечение» и «терапия» относятся к любому и ко всем видам применений, которые способствуют излечиванию состояний или симптомов, предотвращают возникновение состояния или заболевания или иным образом предотвращают, препятствуют, замедляют, устраняют или обращают вспять прогрессирование состояния или заболевания или других нежелательных симптомов каким-либо другим образом.

Используемый здесь термин «антиген вакцинного белка» относится к антигену, независимо от того, является ли он белок-содержащим клеточным фрагментом, очищенным белком, синтетическим пептидом или состоит ли он по своей природе только из аминокислот или из аминокислот в комбинации с другими биологическими молекулами, такими как углеводы или липиды, выделенные из инфекционного организма, для защиты от которого предназначена данная вакцина. Целью включения антигена вакцинного белка является выработка специфического и защитного иммунитета против инфекции, вызванной организмом, из которого был получен вакцинный белок.

Используемый здесь термин «антигенная детерминанта» относится к части белкового антигена, на которую могут быть направлены антитела, В-клетки или Т-клетки, и этот термин является синонимом термина «эпитоп».

Используемое здесь выражение «антигенная детерминанта, происходящая от конкретного белка» относится к пептиду, соответствующему всему или части определенного белка, или являющемуся аналогом всего белка или его части и обладающему антигенным действием, сходным с действием белка. Так, например, антигенная детерминанта, полученная из белка ABC-T бактерии *Streptococcus pneumoniae*, может включать полноразмерную последовательность или состоять из полноразмерной последовательности белка ABC-T, либо она может включать любой сегмент белка или состоять из любого сегмента белка при условии, что этот белок будет давать по меньшей мере один антигенный эффект. Альтернативно, антигенная детерминанта, происходящая от белка ABC-T бактерии *Streptococcus pneumoniae*, может содержать аналог или состоять из аналога всей последовательности белка ABC-T или сегмента аналога белка, при условии, что белок ABC-T будет давать по меньшей мере один антигенный эффект. То же самое относится к антигенным детерминантам, происходящим от белков PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*. Примеры подходящих антигенных детерминант, происходящих из белков ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*, включают последовательности белков или состоят, соответственно, из последовательностей белков SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 или из их иммунологически эффективных фрагментов, или из иммунологически эффективных аналогов последовательностей или их фрагментов. В конкретных вариантах осуществления изобретения, антигенная детерминанта, полученная из ABC-T, составляет от 30 до 50 кДа, и/или антигенная

детерминанта, полученная из PavA, составляет от 55 до 70 кДа; и/или антигенная детерминанта, полученная из ZmpB, составляет от 125 до 155 кДа.

Белки, показанные на фигурах 1, 2 и 3/SEQ ID NO: 1, 2 и 3, могут включать дополнительные аминокислоты, которые не являются частью нативной последовательности, но включены для облегчения рекомбинантного продуцирования и/или очистки белка, при условии, что они не будут влиять на иммунологические свойства антигена. Примерами подходящих дополнительных аминокислот являются полигистидиновая метка, такая как (НННННН). В некоторых вариантах осуществления изобретения, усеченный сегмент ABC-T, показанный на фигуре 1, и/или последовательность PavA, показанная на фигуре 2, и/или усеченный сегмент ZmpB, показанный на фигуре 3, могут включать концевую полигистидиновую метку НННННН. При определении или вычислении процента идентичности/гомологии, полигистидиновая метка может не учитываться при расчете.

Используемый здесь термин «аналог» конкретного белка относится к белку, имеющему идентичность/гомологию (эти термины используются здесь как синонимы) с белком, достаточную для выработки по меньшей мере одного антигенного эффекта этим белком.

Для определения процента идентичности/гомологии двух аминокислотных последовательностей, эти последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, могут быть введены пробелы в одну из первой и второй аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот или в обе эти последовательности для оптимального выравнивания, при этом, для сравнения, негомологичные последовательности можно не рассматривать). В предпочтительном варианте осуществления изобретения, длина эталонной последовательности, выровненной для сравнения, составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере 60%, а еще более предпочтительно, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% от длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении (в настоящей заявке, термин «идентичность аминокислот или нуклеиновых кислот» эквивалентен термину «гомология аминокислот или нуклеиновых кислот»). Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для этих последовательностей, с учетом количества пробелов и длины каждого пробела.

В одном варианте осуществления изобретения, антигенная детерминанта, которая является аналогом ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*, и которая используется в настоящем изобретении, имеет аминокислотную последовательность, в

значительной степени или практически идентичную аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 1, 2 или 3 или их фрагментам. Используемые здесь термины «достаточно идентичный» или «по существу идентичный» применяются здесь для обозначения первой аминокислотной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное количество аминокислотных остатков (например, с аналогичной боковой цепью), идентичных или эквивалентных остаткам второй аминокислотной последовательности, таким образом, чтобы первая и вторая аминокислотные последовательности имели общий структурный домен или общую функциональную активность. Так, например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, имеющий по меньшей мере приблизительно 60% или 65% идентичность, вероятно, 75% идентичность, а более вероятно, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность, определены здесь как достаточно идентичные или по существу идентичные.

Используемый здесь термин «иммунологически эффективный аналог или часть» белка включает фрагмент белка, который участвует во взаимодействии, вызывающем иммунологический ответ. Обычно, иммунологически эффективные аналоги или части белка содержат домен или мотив по меньшей мере с одной активностью белка, например, иммунологически эффективный аналог или часть могут сохранять одну или несколько иммуногенных частей. Полипептид обладает иммунологической эффективностью в отношении *S. pneumoniae*, как определено в настоящей заявке, если он обладает одним, двумя, а предпочтительно несколькими из следующих свойств, а именно: (1) если при экспрессии в процессе инфицирования, вызванного *S. pneumoniae*, он может стимулировать или опосредовать прикрепление *S. pneumoniae* к клетке; (2) он обладает ферментативной активностью, структурной или регуляторной функцией, характерной для белка *S. pneumoniae*; (3) или ген, который его кодирует, может «спасать» летальную мутацию в гене *S. pneumoniae*; (4) этот полипептид участвует в «ускользании» бактерии от иммунного ответа. Этот полипептид обладает иммунологической эффективностью, если он является антагонистом, агонистом или суперагонистом полипептида, обладающего одним из вышеперечисленных свойств.

Иммунологически эффективный «фрагмент» или «аналог» представляет собой фрагмент, обладающий активностью *in vivo* или *in vitro*, которая характерна для полипептидов *S. pneumoniae* согласно изобретению, а в частности, белки имеют последовательности SEQ ID NO: 1-3 или другие встречающиеся в природе полипептиды *S. pneumoniae*, например, обладающие одним или несколькими видами биологической активности, описанными в настоящей заявке. Особенно предпочтительными являются фрагменты, которые существуют *in vivo*, например, фрагменты, которые возникают в результате посттранскрипционного процессинга или которые возникают в результате трансляции альтернативно сплайсированной РНК. Фрагменты включают фрагменты, экспрессируемые в нативных или эндогенных клетках, а также фрагменты, полученные в системах экспрессии, например, в клетках CHO. Поскольку пептиды, такие как

полипептиды *S. pneumoniae*, часто обладают рядом физиологических свойств, и поскольку такие свойства могут быть связаны с различными частями молекулы, то подходящим фрагментом *S. pneumoniae* или аналогом *S. pneumoniae* является фрагмент или аналог, который обладает биологической активностью в любом биологическом анализе на активность *S. pneumoniae*.

Используемый здесь термин «генетическая конструкция, кодирующая антигенную детерминанту» относится к любой структуре нуклеиновой кислоты, подходящей для экспрессии антигенной детерминанты при введении реципиенту, включая конструкции ДНК (например, плазмидную ДНК), конструкции РНК (например, матричную РНК), конструкции на основе бактерий и конструкции на основе вирусов (такие как инактивированные или живые аттенуированные вирусные конструкции). Генетическая конструкция может кодировать антигенные детерминанты, соответствующие полноразмерной последовательности нативного белка, или она может кодировать его иммунологически эффективные фрагменты или иммунологически эффективные аналоги нативной последовательности или ее фрагментов.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, включающих генетическую конструкцию, кодирующую белок, содержащий фрагмент ABC-T, соответствующий последовательности SEQ ID NO:1, генетическая конструкция может содержать последовательность нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), соответствующую SEQ ID NO:4 (то есть, последовательность РНК, показанную на Фигуре 22, хотя эквивалентная последовательность ДНК также является вариантом осуществления настоящего изобретения), или ее аналог.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, включающих генетическую конструкцию, кодирующую белок, содержащий белок PavA, соответствующий последовательности SEQ ID NO:2, генетическая конструкция может содержать последовательность нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), соответствующую SEQ ID NO:5 (то есть, последовательность РНК, показанную на фигуре 23, хотя эквивалентная последовательность ДНК также является вариантом осуществления настоящего изобретения), или ее аналог.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, включающих генетическую конструкцию, кодирующую белок, содержащий фрагмент ZmpB, соответствующий последовательности SEQ ID NO:3, генетическая конструкция может содержать последовательность нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), соответствующую SEQ ID NO:6 (то есть, последовательность РНК, показанную на Фигуре 24, хотя эквивалентная последовательность ДНК также является вариантом осуществления настоящего изобретения), или ее аналог.

Используемый здесь термин «иммуностимуляция» относится к иммуностимуляторам и иммуностимуляторам, которые стимулируют иммунную систему, посредством индуцирования активацию или повышения активности любого из ее компонентов.

Используемый здесь термин «адъювант» включает фармакологический или иммунологический агент, который модифицирует действие других агентов, а в данном случае, вакцинных композиций согласно изобретению. Адъюванты, используемые в настоящем изобретении, увеличивают или повышают величину и/или устойчивость иммунного ответа вакцинной композиции, что также может приводить к снижению количества антигенов, необходимых для индуцирования защитного и длительного иммунитета.

Белки, белковые фрагменты и генетические конструкции, используемые в вакцинных композициях, часто конъюгируют или смешивают с иммуностимулирующими или иммунопотенцирующими веществами/адъювантами. Включение адъювантов в состав вакцин направлено на усиление, ускорение и пролонгирование специфического иммунного ответа на вакцинные антигены. К преимуществам адъювантов относятся усиление иммуногенности более слабых антигенов, снижение количества антигена, необходимого для успешной иммунизации, снижение частоты бустерных иммунизаций для достижения адекватного уровня защитного иммунитета. Адъюванты также могут быть выборочно использованы для оптимизации желаемого иммунного ответа, например, в отношении классов иммуноглобулинов и индуцирования ответов цитотоксических или хелперных Т-лимфоцитов.

В одном варианте осуществления изобретения, иммуногенные композиции согласно изобретению могут содержать одно или более веществ, выбранных из веществ, оказывающих стимулирующее действие на ловушко-подобные рецепторы (TLR), цитозольные рецепторы распознавания паттерна (PRR), такие как рецепторы, подобные нуклеотид-связывающему домену (NOD) олигомеризации (NLR), лектиновые рецепторы С-типа (CLR), чувствительные к нуклеиновым кислотам рецепторы, такие как ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), или сенсоры питательных веществ, такие как mTOR и GCN2; веществ, действующих по меньшей мере на один из следующих путей: MyD88/TLR-сигнальные пути, путь cGAS-стимулятора генов интерферона (STING), путь NF-κB, любые пути стресса, гибели клеток и повреждения тканей (такие как некроз/некроптоз, апоптоз, аутофагия), что приводит к высвобождению ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP), таких как нуклеиновые кислоты, мочевая кислота, АТФ и белки, которые активируют врожденную иммунную систему, любые сигнальные пути, приводящие к рекрутингу иммунных клеток или к эпигенетическим изменениям, поддерживающим врожденную иммунную систему в возбужденном состоянии в течение длительных периодов времени, то есть, в состоянии, подобном памяти; веществ, обладающих способностью индуцировать активацию инфламмосомы в результате дифференцировки клеток в клетки с иммунитетом, опосредуемым CD4⁺-Th2 (интерлейкином-4), Th1 (интерфероном-гамма) или Th17 (IL17A); иммуностимуляторов; веществ на основе полисахаридов, действующих на сигнальные пути IL-1β, CLR и TNF-α; систем доставки и адъювантов слизистой оболочки.

Дополнительно или альтернативно, иммуногенные композиции согласно

изобретению могут содержать одно или более веществ, выбранных из бактериальных белков и/или полисахаридных веществ, таких как капсулы и их аналоги, токсина/токсоида и их аналогов, лигандов TLR и их аналогов, агонистов, таких как Pam3CSK4, Pam2CSK4, MPLA (производное ЛПС), CpG (короткие одноцепочечные синтетические молекулы ДНК, которые содержат неметилированный дезоксинуклеотид цитозинтрифосфат («С»), за которым следует дезоксинуклеотид гуанинтрифосфат («G»), где «р» означает фосфодиэфирную связь между последовательно расположенными нуклеотидами, хотя некоторые ODN вместо этого имеют модифицированный фосфортиоатный (PS) остов), мотивы PolyI:C, CpG; микрочастиц и наночастиц, таких как хитозан или бета-глюканы, флагеллин, сополимер молочной и гликолевой кислоты или сополимер PLGA и 1-лизина/гамма-глутаминовой кислоты (PLGA-PLL/gammaPGA), или веществ, изготовленных из липидного остова на основе любых других иммуностимулирующих агентов, таких как монофосфориллипид А (MPLA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), олигоманноза, Poly(I:C), внеклеточные везикулы (EV), такие как везикулы наружной мембраны (OVM); систем для инкапсуляции на основе масла или систем на основе эмульсии, включая эмульсии типа «вода-в-масле», «масло-в-воде» и термообратимые эмульсии «масло-в-воде», такие как Montanide ISA-51, Montanide ISA-720 и их аналоги, квасцы или адъюванты на основе солей алюминия, липосомы, вирусомы, археосомы, везикулы наружной мембраны, ниосомы, сапонины и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), полимерные частицы, цитокины, включая провоспалительные цитокины, такие как IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-17A/F, GM-CSF и MPI, вирусоподобные частицы (VLP), бактериальные компоненты, такие как детоксифицированный вариант LPS, такой как монофосфориллипид А (MPL), мурамилдипептид (липофильный и гидрофобный MDP), QS21, PLGA, СТ, катионный адъювант на основе липосом, например, CAF 01-09 (состоящий из Span80, полиоксиэтиленцетилстеарилового эфира, маннита, сквалена) и аналоги, состоящие из холестерина, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина, или альфа-Gal-церамид, NOD-подобный рецептор белка инфламмосомы 3 (NLRP3), ассоциированный с апоптозом белок пятнистости, содержащий CARD (ASC), белок инфламмосомы 4, содержащий домен NLR-семейства CARD (NLRC4), белок инфламмосомы 2, отсутствующий в меланоме (AIM2), дцРНК: поли(I:C), poly-IC:LC, монофосфориллипид А (MPL), LPS, флагеллин, имидазохинолины: имихимод (R837), резихимод (848), CpG-олигодезоксинуклеотиды (ODN), мурамилдипептид (MDP), сапонины (QS-21); бактериальных молекул или производных, включая полисахаридные капсулы и их аналоги, токсин/токсоид и их аналоги, неметилированную ДНК (CpG) и их аналоги, цитокины, такие как IL-2, IL-12, TNF- α и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), хемокины, такие как RANTES (регулируемые при активации, и экспрессируемые и секретируемые нормальными Т-клетками), макрофагальный воспалительный белок (MIP)-1 α , костимулирующие или адгезивные молекулы, такие как CD80, антиген-3, ассоциированный с функцией лимфоцитов, и полиаргининовые хвосты; веществ на основе полисахаридов со свойствами, подобными свойствам хитозана, таких как

СрG-дельта-инулин, кохлеаты, вирусоподобные частицы (VLP), микрочастицы, такие как виросомы, PLA (полимолочная кислота), PLG (сополимер лактида и гликолида), производные холерного токсина (СТ) и термолабильный энтеротоксин (LTK3 и LTR72).

В конкретных вариантах осуществления изобретения, иммунологические композиции согласно изобретению могут содержать одно или несколько веществ, выбранных из агонистов TLR, агентов, способных индуцировать опосредованный CD4⁺-Т-клетками иммунный ответ (в частности, с Th1- и/или Th17-дифференцированным профилем), эмульсий типа «масло-в-воде», эмульсий типа «вода-в-масле», агентов, действующих на сигнальный путь MyD88/TLR, агентов, действующих на путь cGAS-стимулятора генов интерферона (STING), и полисахаридных веществ в виде частиц. В особенно предпочтительных вариантах иммунологических композиций согласно изобретению, адъювант содержит комбинацию агониста TLR и агента, способного действовать на сигнальный путь MyD88/TLR или путь cGAS-стимулятора генов интерферона (STING); например, комбинацию СрG с хитозаном и/или бета-глюканами.

Лиофилизация вакцин хорошо известна специалистам в данной области. Обычно, жидкую вакцину лиофилизуют в присутствии агента, ингибирующего свертывание крови, такого как сахарид, например, сахароза или лактоза (которые присутствуют в исходной концентрации от 10 до 200 мг/мл). Лиофилизацию обычно проводят в несколько стадий, например, цикл начинают при -69°C, а затем постепенно доводят температуру до -24°C в течение 3 часов, после чего эту температуру поддерживают в течение 18 часов, а затем постепенно доводят до -16°C, после чего ее доводят до 1°C в течение нескольких часов, а затем эту температуру поддерживают в течение 6 часов, доводят до +34°C в течение 3 часов и, наконец, поддерживают в течение 9 часов.

Лиофилизация состава приводит к получению более стабильного состава (например, предотвращается разложение полисахаридных антигенов). Было неожиданно обнаружено, что этот процесс также отвечает за более высокие титры антител против пневмококковых полисахаридов. Этот процесс также наблюдается, в частности, для конъюгатов PS6B и адъюванта 3DMPL (предпочтительно на основе адъюванта без алюминия) и пневмококкового белка, выбранного из группы, состоящей из: PhtA, PhtB, PhtD, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Spl25, Spi01, Spl28, Spl30 и Spi33.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммуногенная композиция или вакцина могут быть лиофилизованы.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение охватывает: вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид *S. pneumoniae* или вариант полипептида *S. pneumoniae*, как описано в настоящей заявке; клетку-хозяина, трансфицированную вектором; и способ получения рекомбинантного полипептида *S. pneumoniae* или варианта полипептида *S. pneumoniae*, включая культивирование клетки, например, в среде для культивирования клеток, и выделение полипептида *S. pneumoniae* или варианта полипептида *S. pneumoniae*, например, из клетки или из среды для культивирования клеток.

Настоящее изобретение также относится к способам вырабатывания антител у животного-хозяина. Способы согласно изобретению включают иммунизацию животного по меньшей мере одним иммуногенным компонентом, полученным из *S. pneumoniae*, где иммуногенный компонент включает иммуногенную композицию или вакцину согласно изобретению, или их консервативные по последовательности или консервативные по функции варианты, или полипептиды, которые содержатся в любых ОРС, включая полноразмерные кодирующие белок последовательности, частью которых является любая из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3; или полипептидные последовательности, содержащиеся в любой из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3, или полипептиды, частью которых является любая из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3. Животными-хозяевами являются любые теплокровные животные, включая, но не ограничиваясь ими, млекопитающие и птицы. Такие антитела могут быть использованы в качестве реагентов для иммунологических анализов для оценки количества и распределения антигенов, специфичных для *S. pneumoniae*.

Системы доставки, которые были изучены для разработки более эффективных пептидных вакцин, включают наноразмерные (<1000 нм) вещества, такие как вирусоподобные частицы (VLP), везикулы наружной мембраны (OMV), липосомы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), полимерные и неразлагаемые наносферы, которые привлекли внимание в качестве потенциальных средств доставки вакцинных антигенов, которые могут стабилизировать вакцинные антигены и действовать как адъюванты. Кроме того, они дают возможность разрабатывать вакцины, содержащие множество белковых антигенных фрагментов, которые специфически нацелены на иммунные клетки, что приводит к более эффективному поглощению антигенпрезентирующими клетками.

Альтернативные системы доставки могут включать биоразлагаемые вещества, например, природные полимерные соединения, такие как крахмал, альгинаты и целлюлоза, биосинтетические вещества, такие как поли-бета-гидроксипропионат (PHB), и сополимеры, такие как полимолочная кислота (PLA), полиуретан, сополимер молочной и гликолевой кислоты (PLGA) и полиметилметакрилатная смола (PMMA), которые привлекли большое внимание специалистов в исследованиях вакцин из-за их биосовместимости, биоразлагаемости и, в большинстве случаев, к низкой токсичности, и которые могут защитить антигены от разложения, повышать стабильность антигена и обеспечивать медленное высвобождение, что приводит к повышению общей иммуногенности. Эти системы также представляют собой перспективные адъюванты/системы доставки для новых пневмококковых вакцин согласно изобретению.

Другими системами доставки являются, но не ограничиваются ими, например, пробиотики, например, происходящие от видов *Lactobacilli* и *Bifidobacteria*; вирусные векторные системы, такие как модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) и другие различные вирусы, включая поксвирусы и аденовирусы; и бактериофаги, такие как фаг T4.

Следует отметить, что вакцина согласно изобретению может быть использована в комбинации с другими уже существующими вакцинами/конъюгированными вакцинами. Вакцина согласно изобретению может быть использована в качестве белка-носителя для улучшения доступных в настоящее время составов, например, такой вакциной является, но не ограничивается ею, Превенар, который содержит белок-носитель CRM197. Соответственно, CRM197 может быть заменен одним или несколькими или всеми белками/полипептидами согласно изобретению.

Описанная здесь композиция может быть введена отдельно или в комбинации с другими способами терапии, либо одновременно, либо последовательно. Введение может быть осуществлено повторно ежедневно, два раза в неделю, еженедельно или ежемесячно. Схема лечения для отдельного индивидуума может зависеть от таких факторов, как способ введения и тяжесть состояния, подвергаемого лечению.

Настоящее изобретение также охватывает комбинированные вакцины, обеспечивающие защиту от различных патогенов. В настоящее время, многие вакцины для детей вводят в виде комбинированных вакцин, чтобы уменьшить количество инъекций, которые должен получить ребенок. Таким образом, вакцины для детей, содержащие антигены других патогенов, могут быть приготовлены вместе с вакцинами согласно изобретению. Так, например, вакцины согласно изобретению могут быть приготовлены в комбинации (или введены отдельно, но одновременно) с хорошо известной «трехвалентной» комбинированной вакциной, содержащей дифтерийный токсид (DT), столбнячный токсид (TT), коклюшный токсид [обычно детоксифицированный нитчатый гемугглютинин (FHA), необязательно с пертактином (PRN) и/или аглитомомом, 1+2], например, с имеющейся в продаже вакциной INFANRIXDTPa™ (SmithKline Beecham Biologicals), содержащей антигены DT, TT, PT, FHA и PRN, или с цельноклеточным компонентом коклюшного токсоида, таким как вакцина, поставляемая компанией SmithKline Beecham Biologicals SA как препарат Tritanrix™. Комбинированная вакцина может также содержать дополнительный антиген, такой как поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), антигены вируса полиомиелита (например, инактивированный трехвалентный вирус полиомиелита - IPV), белки внешней мембраны *Moraxella catarrhalis*, нетипичные белки *Haemophilus influenzae*, белки внешней мембраны *N. meningitidis* В.

Композиции могут быть введены в виде одной или нескольких доз, после которых могут быть введены одна или несколько дополнительных «бустерных» доз, которые вводят через несколько дней, недель или лет. Так, например, при введении композиции детям, первую дозу можно вводить детям в возрасте от 1 до 12 лет, а бустерную дозу - в возрасте 16 лет. Подросткам, получившим первую дозу в возрасте 13-15 лет, бустерная доза может быть введена в возрасте 16-18 лет. Людям, которые, возможно, не получали какую-либо пневмококковую вакцину в раннем детстве, можно вводить первичную и/или бустерную дозу иммуногенной композиции или вакцины согласно изобретению или ее можно вводить вместе с сезонными вакцинами, такими как сезонная вакцина против гриппа. Иммуногенную композицию или вакцину согласно изобретению можно также вводить в

качестве первичной или бустерной дозы взрослым старше 65 лет, которые могли получить одну или две дозы PPSV-23 (Pneumovax) с интервалом в 1 или 2 года. Инъекции могут содержать одинаковую дозу активного ингредиента или могут содержать различные дозы. Предпочтительно, доза может быть введена путем инъекции, хотя безыгольное введение также входит в объем изобретения.

Иммуногенную композицию или вакцину можно вводить детям, подросткам или взрослым. Под словом «дети» подразумеваются младенцы, обычно, в возрасте до 2 лет. В некоторых странах, младенцам обычно вводят две дозы, а третью «бустерную» дозу вводят на втором году жизни; в некоторых странах можно вводить только две дозы, а в других странах можно вводить четыре дозы.

Конкретный уровень дозы и частота введения доз любому конкретному пациенту могут варьироваться и будут зависеть от множества факторов, включая возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, режим питания, способ введения препарата индивидууму, проходящему лечение. Обычно, подходящая доза может быть определена врачом. Композиция может быть введена в дозе от 0,00001 мкг/кг массы тела до 5 мг/кг массы тела, предпочтительно от 0,0001 мкг/кг до 5 мг/кг, предпочтительно от 0,001 г/кг до 1 мг/кг, предпочтительно 0,01 мкг/кг до 500 г/кг, а еще более предпочтительно от 0,02 мкг/кг до 300 г/кг массы тела.

В настоящее время существует два типа лицензированных пневмококковых вакцин, обе из которых нацелены на капсулярные полисахариды: (а) 23-валентная пневмококковая вакцина на основе полисахарида (PPV-23, поставляемая под торговым знаком Pneumovax) и (б) 7-, 10- и 13-валентные пневмококковые конъюгированные вакцины (PCV-7, -10, -13, поставляемые под торговым знаком Превенар). Однако, PPV-23 является слабо иммуногенной у детей в возрасте до двух лет и не вызывает ни реакции иммунной памяти, ни коллективного иммунитета. Конъюгирование пневмококкового полисахарида с белком-носителем превращает вакцины на основе полисахарида из Т-клеточно-независимых в Т-клеточно-зависимые антигены, повышая их иммуногенность. Конъюгированные вакцины вызывают эффективную иммунную память и индуцируют соответствующий коллективный иммунитет.

Другие подходящие пневмококковые вакцины, которые можно использовать в комбинации с вакциной согласно изобретению, включают цельноклеточную пневмококковую вакцину, которая представляет собой инактивированный клеточный препарат неинкапсулированного штамма *S. pneumoniae*, в котором делетирован ген аутолизина (*lytA*), а ген *pdT* был заменен на ген пневмолизина (*ply*). Кроме того, другие подходящие кандидаты включают один или более кандидатов, выбранных из группы, включающей пневмококковый поверхностный белок А (*PspA*), пневмококковый холин-связывающий белок А (*PcpA*), секретлируемый белок *Usp45*-гидролазы размером 45 кДа (*PcsB*), серин/треониновую протеинкиназу (*StkP*), пептидный фермент пермеазы, переносчик марганца-ABC (*PsaA*), пневмолизин D (*PlyD*), пневмолизиновый токсоид (*dPly*), холин-связывающие белки А (*CbpA*) и D (*CbpD*), белок гистидиновой триады D

(PhtD), белок гистидиновой триады E (PhtE), белок гистидиновой триады A (PhtA), белок гистидиновой триады B (PhtB); пневмококковый белок поглощения железа A (PiuA), белок отделения клеточной стенки (PcsB), пневмококковую серин-треонинкиназу (StkP) и аналоги, плазмин и фибронектин-связывающий белок A (PfbB), SP0148, SP1912 и SP2108, SP0785, SP1500, SP2216.

Вакцинные композиции согласно изобретению могут быть введены любым обычным способом, например, перорально (например, в виде таблетки или капсулы), интраназально (например, в виде спрея), путем ингаляции, местно (например, в виде крема или лосьона) и путем инъекции. Введение может быть, например, внутривенным, внутривнутрибрюшинным, внутримышечным, внутривнутриполостным, подкожным или интрадермальным. Вакцинные композиции согласно изобретению вводят в эффективных количествах. «Эффективное количество» представляет собой такое количество вакцинной композиции, которое само по себе или вместе с дополнительными дозами дает желаемый ответ. В случае профилактики пневмококковой инфекции, желательным ответом является обеспечение защиты при заражении инфекционным агентом.

Композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть приготовлены вместе с фармацевтически приемлемым носителем, наполнителем, буфером, стабилизатором или разбавителем или другими веществами, хорошо известными специалистам в данной области. Подходящие фармацевтически приемлемые носители, наполнители или разбавители описаны, например, в имеющихся руководствах (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, AR Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000] и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Точная природа носителя или другого вещества будет зависеть от способа введения.

Композиция может быть приготовлена в форме, подходящей для предполагаемого способа введения. Так, например, она может быть приготовлена в виде порошка, спрея, таблетки, раствора или суспензии, необязательно вместе с подходящими носителями, наполнителями или разбавителями (или их комбинацией). Для парентерального введения, композиция может быть приготовлена в форме стерильного водного раствора и может, но необязательно, содержать другие вещества, например соли или буферы. Специалисты в данной области могут приготовить подходящие растворы с использованием, например, изотонических носителей, таких как инъекция хлорида натрия, инъекция раствора Рингера, инъекция раствора Рингера с лактатом. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки, включая буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3'-пентанол и м-крезол);

низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, лактоза, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

«Терапевтически эффективное количество» означает количество композиции, достаточное для оказания желаемого эффекта индивидууму, включая, помимо прочего, индуцирование/усиление иммунного ответа против бактерий *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума и/или снижение тяжести или продолжительности заболевания индивидуума. Фактически вводимое количество, а также скорость и продолжительность введения будут зависеть от природы и тяжести заболевания, подвергаемого лечению. Назначение лечения, например, решение о введении дозы и т.п., входит в компетенцию врачей общей практики и других врачей и может зависеть от тяжести симптомов и/или прогрессирования заболевания, подвергаемого лечению.

Иммунный ответ индуцируют или усиливают, если наблюдается обнаруживаемое различие в показателях иммунологического ответа, оцененных до и после введения конкретной композиции. Показатели иммунного ответа включают, но не ограничиваются ими: титр или специфичность антител, оцененные с помощью анализа, такого как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), бактерицидный анализ, проточная цитометрия, иммунопреципитация, иммунодиффузия Охтерлони; анализы на связывание, например, спот-анализ, Вестерн-блот-анализ или анализ с использованием антигенных массивов; анализы на цитотоксичность, ELISpot, *ex vivo* анализы на стимуляцию моноцитарных клеток и лимфоцитов периферической крови, анализы на мышцах с моделью перитонита и заражения и т.п.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективное количество состава или композиции вакцины, описанной в настоящей заявке, представляет собой количество, достаточное для образования антиген-специфических антител (например, против бактерии *Streptococcus pneumoniae*). В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективное количество является достаточным для обеспечения серопротективного эффекта у индивидуума; то есть, для образования достаточного количества антиген-специфических антител для профилактики инфекции/защиты от инфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, серопротективный эффект обеспечивается по меньшей мере у 60%, 70%, 80%, 90% или по меньшей мере у 95% вакцинированных индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективное количество иммуногенных композиций или вакцин согласно изобретению является достаточным для сероконверсии у индивидуума с вероятностью по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

терапевтически эффективное количество является достаточным для сероконверсии у индивидуума с вероятностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или по меньшей мере 95%. Сероконверсию у индивидуума можно оценить любым способом, известным специалистам в данной области, например, путем взятия пробы сыворотки или периферической крови у индивидуума и проведения анализа для выявления антител против *Streptococcus pneumoniae* или лимфоцитарных ответов, индуцированных *S. pneumoniae*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, у индивидуума наблюдается сероконверсия, если проба сыворотки индивидуума содержит определенное количество антител против *Streptococcus pneumoniae* или наблюдается определенный уровень опосредованных лимфоцитами ответов, которые превышают пороговое или заданное исходное значение.

Исследования in vitro

Бактериальные изоляты.

Streptococcus pneumoniae серотипа 2, лабораторно-адаптированный штамм D39 (NCTC 7466), был получен из Национальной коллекции типовых культур (Лондон, Великобритания). Все другие штаммы пневмококка, использованные в исследовании, например, гипервирулентный пневмококк серотипа 1, представляли собой клинические изоляты, полученные из биобанка изолятов, хранящихся в архиве Королевской больницы Ливерпуля (RLBUHT) или в Центре Malawi Wellcome Trust, Blantyre, Malawi. Идентификация пневмококка была подтверждена в тесте на чувствительность к оптохину, а серотипы были определены с использованием стандартной реакции Хеллинга с пневмококковой капсулярно-специфической антисывороткой (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark). Все изоляты хранили в лаборатории при температуре -80°C на криогранулах Protect™ (Pro-Diagnostics Lab, Inc.) и пересеивали в чашки с 5% агаром с лошадиной кровью, а затем инкубировали при 37°C в анаэробных условиях в течение 18 часов. Для всех изолятов также проводили мультилокусное типирование последовательностей (MLST).

Образцы тканей для подсчета количества жизнеспособных бактерий.

Через указанные промежутки времени после пневмококковой инфекции определяли количество жизнеспособных бактерий в крови и в легких. Образцы тканей измельчали с помощью гомогенизатора IKA T10. Количество жизнеспособных клеток в суспензии клеток легких и в пробах крови определяли путем серийного разведения в стерильном PBS и посева на кровяной агар, содержащий 5% (об./об.) дефибринизированной лошадиной крови (Oxoid) и 10 мкг/мл гентамицина (sigma). После сушки, планшеты инкубировали в 5% (об./об.) CO_2 при 37°C в течение ночи и подсчитывали число бактериальных колоний на следующий день.

Мутагенез Streptococcus pneumoniae.

Получение компетентных клеток *S. pneumoniae* и последующую трансформацию осуществляли с применением метода трансформации в полной среде (среде C+Y, pH=6,8) (Lacks and Hotchkiss, 1960). Мутанты с одиночной делецией были сконструированы путем

замены открытой рамки считывания (ОРС) кластером *aphA3* (сообщающим резистентность к канамицину) и последующего отбора резистентных к канамицину рекомбинантов в среде на основе кровяного агара с добавлением канамицина. Рекомбинацию подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Получение и адсорбция рекомбинантного белка на CpG-хитозане.

Синтетические гены, оптимизированные по *Escherichia coli* для каждой вакцины-кандидата были получены от GeneArt (Thermo Fisher Scientific). Эти гены включали усеченный сегмент ABC-T, соответствующий последовательности, показанной на фигуре 1 (SEQ ID NO: 1), полную последовательность *PavA*, соответствующую последовательности, показанной на фигуре 2 (SEQ ID NO: 2), и усеченный сегмент *ZmpB*, соответствующий последовательности, показанной на Фигуре 3 (SEQ ID NO:3).

Для каждого антигена, 6xHis-меченые С-концевые рекомбинантные пневмококковые белки клонировали в *E. Coli* BL21 (DE3), культивируемые в бульоне Terrific (Thermo Fisher Scientific). ABC-T представляет собой крупный комплексный трансмембранный белок: последовательность от Met435 до Gly790 (SEQ ID NO:1, приблизительно 40 кДа) была амплифицирована и субклонирована как рекомбинантная молекула С-конца промотора T7 с 6xHis-меткой. *PavA* экспрессировался по своей полной длине, то есть, от Met1 до Ser551 (SEQ ID NO:2, приблизительно 63 кДа) в виде рекомбинантного белка С-конца промотора T7 с 6xHis-меткой. Самый большой внеклеточный домен *ZmpB*, то есть, от Met140 до Ala1876 (SEQ ID NO:3, приблизительно 148 кДа), был амплифицирован и субклонирован как усеченный белок промотора T7 с С-концевой 6xHis-меткой. Все 6xHis-меченые белки были выделены из колонок с никелем IMAC (лаборатории Bio-Rad) и четыре раза пропущены через центрифужные колонки высокой емкости Pierce™ (Thermo Scientific Fisher) для удаления эндотоксинов, при этом было подтверждено, что остаточные уровни эндотоксина составляют менее 0,05 единиц/мл. Затем экспрессированные белки объединяли с полимером хитозана (CS) (торговый знак Protosan, Novomatrix) в виде составов с одним белком или комбинацией белков (то есть, составов, содержащих пары белков или все три белка), то есть, 1-10 мкг антигена на состав вакцины. Наночастицы CS, адсорбированные пневмококковыми антигенами, образовывались при перемешивании стерильного водного забуференного фосфатом физиологического раствора, содержащего 100 мкг/мл пневмококковых антигенов (в виде отдельной или комбинированной композиции, 1-10 мкг антигена на вакцинную композицию). Затем наночастицы CS смешивали с CpG (неметилованным цитозин-фосфортиоатом-гуаниновыми олигодезоксинуклеотидами или CpG ODN 1826 (группа 2)), поставляемым компанией Integrated DNA Technologies Inc.

Смесь трех антигенов, соответствующих SEQ ID NO: 1, 2 и 3, в отсутствии каких-либо адъювантов представляет собой иммунологическую композицию согласно изобретению и упоминается здесь как «антигены».

Вышеупомянутые композиции, содержащие смесь двух из трех антигенов, соответствующих SEQ ID NO: 1, 2 и 3, адсорбированных на микрочастицах хитозана, в

комбинации с CpG, представляют собой иммунологические композиции согласно изобретению и упоминаются здесь посредством ссылки на их соответствующие антигенные детерминанты, то есть, «ABC-T+ZmpB», «PavA+ZmpB» и «PavA+ABC-T».

Вышеупомянутая композиция, содержащая смесь из трех антигенов, соответствующих SEQ ID NO: 1, 2 и 3, абсорбированных микрочастицами хитозана, в комбинации с CpG, является предпочтительной иммунологической композицией согласно изобретению и обозначается здесь как «PrPV» (пневмококковая вакцина на основе белка).

Было обнаружено, что ABC-T представляет собой крупный, комплексный трансмембранный домен, который является почти нерастворимым/токсичным для *E. coli*. Самые крупные внешние домены были экспрессированы в соответствии с их конструкцией на основе анализа, описанного на сервере ТМНММ. Был экспрессирован полноразмерный белок PavA. Было установлено, что ZmpB представляет собой очень крупный, комплексный функциональный домен, как было определено путем поиска гомологии доменов NCBI. Пробную экспрессию фрагментов белка проводили для того, чтобы подтвердить, какая наибольшая часть дает наилучшую экспрессию.

Анализ на опсонофагоцитоз (ОПК).

Целью этого анализа является воспроизводимая оценка опсонизирующей способности образцов тестируемой сыворотки против *Streptococcus pneumoniae* с применением метода, адаптированного на основе опубликованного стандартизированного метода CDC (Steiner et al. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 4: 415: 1997). Этот анализ имитирует условия *in vitro*, которые являются основным механизмом *in vivo* для элиминации инвазии *Streptococcus pneumoniae* с последующим фагоцитозом и последующим уничтожением микроорганизмов. «Фагоцитоз» представляет собой процесс, при котором клетки поглощают вещество и заключают его в вакуоли (фагосомы) в цитоплазме. Пневмококки погибают при их фагоцитозе здоровыми фагоцитами млекопитающих. «Опсонизация» представляет собой процесс, который облегчает фагоцитоз в результате осаждения опсоинов, таких как антитела и комплемент, на антигене.

В литературе описано множество анализов на опсонофагоцитоз. Стандартизированный метод CDC был протестирован во многих лабораториях (Steiner et al., ICAAC, Sept. 16-20, 2000, Toronto). Затем этот тест был изменен в SB, что обеспечило основу для сравнения в других лабораториях с использованием общедоступных реагентов и контролей и последующим выражением результатов в виде титра сыворотки (разведения), которое способствует уничтожению 50% жизнеспособных пневмококков, то есть, единицы, которая обычно используется для испытаний этого типа. Кроме того, было показано, что этот модифицированный тест может давать результаты, которые четко соответствуют результатам 4 других лабораторий (Steiner et al., ICAAC, Sept. 16-20, 2000, Toronto).

ОПК проводили для проверки способности антисыворотки вакцинированных мышей опсонизировать жизнеспособные пневмококки и опосредовать их уничтожение. С небольшими изменениями был проведен эталонный анализ на опсонофагоцитоз,

описанный в литературе (Bangert et al, 2012 JID). Приготовливали реакционную смесь, состоящую из термоинактивированной сыворотки, полученной от вакцинированных и невакцинированных мышей, дифференцированных клеток HL-60 или свежевыделенных нейтрофилов человека, пневмококков и комплемента крольчат. Контрольные реакции без комплемента и/или антитела, эффекторных клеток или всех компонентов, кроме пневмококков, проводили параллельно и инкубировали при 37°C при встряхивании. Аликвоты отбирали до и после инкубирования, серийно разводили в стерильном PBS и образцы помещали на чашки с кровавым агаром для подсчета КОЕ. Всего 5×10^4 клеток HL-60, дифференцированных в ДМФ, инкубировали с 5×10^2 опсонизированных *S. pneumoniae* и комплемента в течение 45 минут при 37°C/5% CO₂. Подсчет жизнеспособных колоний проводили приблизительно через 18 часов инкубирования в анаэробных условиях при 37°C. IVIG в конечном разведении 1:16 использовали в качестве источника патоген-специфических антител для опсонизации. В качестве контроля использовали лунки, содержащие неопсонизированные пневмококки и термоинактивированный комплемент.

Исследования ex vivo

Выделение МКПК и анализ на стимуляцию ex vivo

МКПК выделяли из цельной крови с помощью Фиколла-Пака Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). Вкратце, цельную кровь собирали в пробирки с гепарином и разводили равным объемом DPBS в пробирках Falcon объемом 50 мл. 30 мл разведенной крови наносили поверх Фиколла и центрифугировали при 400g в течение 30 минут при комнатной температуре. Мононуклеарные клетки (МНК) образуют определенный клеточный слой на границе раздела плазмы и Фиколла. Верхний слой (плазму) осторожно удаляли, а затем слой МНК собирали в свежую пробирку Falcon объемом 50 мл. МНК промывали добавлением DPBS и центрифугировали при 300g в течение 10 минут. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в полной среде RPMI1640 с добавлением 10% FBS, 1% пенициллина/стрептомицина и 200 мМ L-глутамин. Анализы на внутриклеточные цитокины (IFN-гамма и IL-17A) проводили с использованием МКПК для изучения их антигенспецифического и Т-клеточного ответов на 3 пневмококковых антигена. Вкратце, МКПК (1×10^6 /лунку) культивировали в свежем виде в течение 72 часов (37°C, 5% CO₂) в RP10 (в RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 1 мМ добавку GlutaMAX-I, 55 мкМ 2-меркаптоэтанола, 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 10 мМ NEPES) в присутствии пневмококковых антигенов, адсорбированных на CpG-хитозане. Брефелдин А (BFA; 5 мкг/мл; Sigma-Aldrich) был введен в последние 14 часов. Затем МКПК фиксировали, пермеабелизировали и метили антителами, специфичными к маркерам клеточной поверхности (FITC-конъюгированным антителом против CD3, PerCP-конъюгированным антителом против CD4 Cy5.5 и APC-конъюгированным антителом против CD8; все от BD Biosciences) и PE-конъюгированным антителом против IFN и APC-конъюгированным антителом против IL-17A (Invitrogen Corporation) для обнаружения внутриклеточных цитокинов. Пролиферативные ответы оценивали путем мечения Ki67.

Исследования на мышах in vivo

Модель переноса в носоглотку мыши.

S. pneumoniae высевали штрихами на кровяной агар и выращивали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. *S. pneumoniae* идентифицировали по наличию зоны альфа-гемолиза вокруг каждой колонии и зоны ингибирования вокруг оптохинового диска. Набор колоний инокулировали в бульон с сердечно-мозговым экстрактом (ВНІ) и выращивали в статических условиях в течение ночи при 37°C. На следующий день, 750 мкл ночной культуры субкультивировали в ВНІ, содержащем 20% (об./об.) фетальной телячьей сыворотки (FCS), и выращивали в статических условиях в течение 4-6 часов до середины логарифмической фазы роста (OD500 0,8), после чего бульон разделяли на аликвоты по 500 мкл и хранили при -80°C в бульоне ВНІ с FCS не более 1 месяца до использования. Мышей анестезировали 2,5% изофлураном в кислороде и всего 10⁶ КОЕ/10 мкл суспензии бактерий в стерильном PBS вводили интраназально с помощью микропипетки. В заранее определенные моменты времени, животных подвергали эвтаназии в камере с CO₂ и иссекали различные ткани.

Модель менингита, оцененная путем переноса из носоглотки в головной мозг

Мышей анестезировали смесью O₂ и изофлурана и интраназально инфицировали 10⁸ КОЕ/10 мкл на мыш. Мышей периодически оценивали на наличие клинических признаков заболевания и отбраковывали в заранее определенные моменты времени после заражения путем смещения шейных позвонков, а ткани удаляли в асептических условиях для определения количества жизнеспособных клеток. Пробы крови брали путем сердечной пункции.

Исследования заражения мышей с моделью пневмонии и сепсиса

Пневмококковые изоляты высевали штрихами на чашки с 5% кровяным агаром. Отдельные колонии выращивали в течение ночи в ВНІ, а затем субкультивировали в ВНІ+20% сыворотки для хранения при -80°C. Инокуляты вводили мышам в стерильном растворе носителя PBS с различной плотностью: мышей с моделью пневмонии анестезировали и инфицировали интраназально 10⁶ КОЕ/50 мкл/мыш, а мышам с моделью сепсиса вводили внутривенно 10⁶ КОЕ/100 мкл/мыш. Все эксперименты проводили в течение 72-часового мониторинга.

Протокол иммунизации.

Иммуногенность трехвалентной вакцины на основе белка согласно изобретению+составов с CpG-хитозаном (PrPV) оценивали на мышах C57BL/6 (однонедельных мышатах по сравнению с 6-недельными взрослыми мышами) после интраназальной иммунизации. Объем 10 мкл раствора вводили внутримышечно в дни 7, 14 и 21 группам мышат, n=10/группу. Взрослых мышей иммунизировали таким же образом на 6-ю неделю (первичная иммунизация), 8-ю неделю (бустер-иммунизация 1) и 10-ю неделю (бустер-иммунизация 2). Контрольным группам вводили либо PBS, либо раствор свободного антигена, то есть, раствор антигена без адьюванта. В предварительных экспериментах, оптимальную дозу вакцины (в диапазоне от 1 до 10 мкг/животное) определяли путем оценки гуморального ответа через 2 недели после третьей вакцинации. В

дополнение к группе негативного/плацебо-контроля, вакцинные составы также оценивали по сравнению с лицензированной в настоящее время вакциной PCV-13 (торговый знак Prevenar13®).

Исследования с применением пассивного переноса.

Взрослых мышей, иммунизированных либо носителем, либо вакцинным составом PrPV, содержащим ABC-T+PavA+ZmpB, адсорбированные в CpG-хитозане, отбраковывали путем сердечной пункции, и сыворотку (100-150 мкл/мышь) вводили интактным животным путем внутривенного введения. Через 4 часа после переноса, животных заражали либо интраназально (с моделью пневмонии), либо внутривенно (с моделью сепсиса) *S. pneumoniae*. Затем регистрировали выживаемость мышей и количество жизнеспособных тканей.

Оценка иммунных ответов.

Для характеристики противопневмококкового адаптивного иммунитета, уровни антиген-специфических сывороточных антител (общего IgG, антиген-специфических IgG1, IgG2a) определяли с помощью коммерчески доступных сэндвич-ELISA-анализов (R&D systems). Клеточно-опосредованный иммунитет также определяли путем оценки ответов CD3⁺-CD4⁺-Т-клеток, специфичных к пневмококковому антигену: суспензии отдельных клеток приготавливали из брыжеечных лимфатических узлов и повторно стимулировали *ex vivo* в присутствии или в отсутствии пневмококковых антигенов (ABC-T+PavA+ZmpB). Цитокиновые ответы определяли с использованием наборов для внутриклеточного окрашивания (BD Biosciences) для панелей Th1/Th2 и Th17, при этом, особое внимание уделяли цитокинам IFN- γ /IL-4 и IL-17.

Сравнительный геномный анализ

Секвенированию Illumina подвергали 140 изолятов пневмококка, взятых у взрослых и детей с менингитом в Малави ($n=70$) по сравнению с инфекцией кровотока без клинического менингита (бактериемия; $n=70$). Картированные гены были сгруппированы и разделены на три категории: ортологичные гены, общие для всех изолятов (коровые гены), ортологичные гены, общие для двух или более изолятов (дополнительные гены), и гены, уникальные для одного изолята. Всего было обнаружено 3164 кластера ортологичных генов: 45% (1428 коровых генов) присутствовали во всех исследуемых изолятах, тогда как 1612 (51%) присутствовали в двух или более изолятах, а остальные 124 гена (4%) не были сгруппированы внутри кластера. Неожиданно не было обнаружено различий между содержимым коровых геномов или дополнительных генов 140 изолятов. Подход, основанный на вероятностной смеси (GLOOME), был использован для сравнения эволюционной истории событий приобретения/утраты генов (неопубликовано). Авторами настоящей заявки было идентифицировано небольшое подмножество генов, специфичных для менингита, а именно, фактор вирулентности пневмококковой адгезии А (PavA, идентификатор гена: 12889101); АТФ-связывающий кластер/пермеаза-переносчик (ABC-T, идентификатор гена: 13695552); и цинк-металлопротеаза В (ZmpB, идентификатор гена NCBI: 7680834) и т.п. Эти гены представляют определенный интерес из-за их низкой

гомологии последовательностей с человеческими белками, их документально подтвержденных функций и характера поверхностной экспрессии. Впоследствии, геномный анализ был расширен до набора данных, состоящего из более, чем 250000 изолятов пневмококка. В целях разработки состава вакцины, обеспечивающей глобальный охват для всех возрастов, был оценен набор изолятов, включающий 44 различных серотипа пневмококка, полученных у пациентов как из развитых, так и из развивающихся стран и охватывающих 6 континентов (Азию, Африку, Северную Америку, Южную Америку, Европу, Австралию) и 36 других стран.

Ввиду значительной роли этих изолятов в вирулентности пневмококка ожидалось, что три пневмококковых белка также могут быть наиболее переменными по своим последовательностям. Так, например, это было продемонстрировано в случае пневмолизина, для которого уже был идентифицирован 21 отдельный аллельный вариант. Таким образом, для каждого идентифицированного гена-кандидата определяли степень изменчивости генных последовательностей (аллельных вариантов) и оценивали их генетическое родство, распространенность на глобальном уровне и серотип-специфическую ассоциацию, а затем отбирали наиболее распространенную вариантную форму.

Статистический анализ

Для сравнения нескольких групп, статистическую значимость конечных точек оценивали с помощью одностороннего дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным критерием множественных сравнений Тьюки в случае нормального распределения данных. Если данные не были нормально распределены, то статистическую значимость конечных точек оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса с последующим апостериорным критерием множественных сравнений Данна. Для сравнения двух групп использовали непарный двусторонний t-критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего на гистограммах. Для анализа кривых выживаемости при заражении пневмококком использовали логранговый критерий (Мантеля-Кокса). Результаты со значениями p менее 0,05 считались значимыми при *значении $p < 0,05$, **значении $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Статистический анализ был выполнен с помощью программы Graph Pad Prism.

Во всем описании и в формуле изобретения, слова «включать» и «содержать» и их варианты означают «включая, но не ограничиваясь ими», и они не относятся к другим фрагментам, добавкам, компонентам, целым числам или стадиям (но не исключают их). Во всем описании и в пунктах формулы изобретения, существительное в единственном числе может относиться и к существительному во множественном числе, если это не оговорено особо. В частности, если в описании используются неопределенные артикли, то они могут относиться как к существительным во множественном числе, так и к существительным в единственном числе, если это не оговорено особо.

Признаки, целые числа, свойства, соединения, химические фрагменты или группы, описанные в соответствии с конкретным аспектом, вариантом или примером изобретения,

следует рассматривать как применимые к любому другому аспекту, варианту или примеру, описанным в настоящей заявке, если только они не являются несовместимыми. Все признаки, раскрытые в настоящем описании (включая любые прилагаемые пункты формулы изобретения, рефераты и чертежи), и/или все стадии любого способа или процесса, раскрытые таким образом, могут быть объединены в любую комбинацию, за исключением комбинаций, в которых по меньшей мере некоторые из таких признаков и/или стадий являются взаимоисключающими. Настоящее изобретение не ограничивается конкретными деталями любых предшествующих вариантов осуществления изобретения. Настоящее изобретение распространяется на любой новый элемент или любую новую комбинацию признаков, раскрытых в настоящем описании (включая любые прилагаемые пункты формулы изобретения, реферат и чертежи), или на любой новый элемент или любую новую комбинацию стадий любого способа или процесса, раскрытого в настоящей заявке.

Внимание читателя следует обратить на все статьи и документы, которые были поданы одновременно с этой заявкой или до нее, но в связи с этой заявкой, и которые были выложены для публичного ознакомления с настоящим описанием, и содержание всех таких статей и документов включено в настоящее описание посредством ссылки. Нижелесующие примеры приводятся лишь в иллюстративных целях и не рассматриваются как ограничение объема изобретения.

ПРИМЕР 1

Уровни специфических антител IgG против ZmpB, AbcT и PavA определяли иммуноферментным методом в сыворотках, взятых у n=12 детей (в возрасте от 2 до 7 лет), n=12 здоровых взрослых (в возрасте 18-45 лет), n=12 взрослых пациентов с пневмококковой внебольничной пневмонией (CAP), n=12 взрослых с ВИЧ, и n=12 пожилых пациентов в возрасте 65-75 лет. Планшеты для микротитрования с высоким уровнем связывания (Corning) покрывали 5 мкг/мл общих белков (либо в виде отдельных AbcT, PavA, ZmpB, либо в комбинации AbcT+PavA+ZmpB) в карбонатно-бикарбонатном буферном физиологическом растворе (50 мМ, pH 9,2) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Блокирование осуществляли с использованием 1% масс./об. BSA в PBS. Сыворотки серийно разводили 1:20-1:40,960 в 0,5% BSA масс./об. в PBS. В качестве второго антитела использовали конъюгированные со щелочной фосфатазой моноклональные антитела против человеческих IgG (Sigma, A2064-1ML). $OD \geq 0,04$ (два стандартных отклонения для контрольной сыворотки) для всех измерений считались позитивными. Образцам с недетектируемыми антителами против ZmpB или против AbcT/PavA присваивали значение, эквивалентное половине предела детектирования. Результаты для белок-специфических IgG были представлены полуколичественно на основе значений OD (единицы OD на 405 нм). Они были рассчитаны из средних показаний OD образцов с тремя повторами после вычитания показаний OD контрольных лунок, негативных по сыворотке.

На фигуре 4 показана связывающая активность сывороточных антител человека, взятых у здоровых взрослых добровольцев или у лиц, предрасположенных к

пневмококковым инвазивным заболеваниям, а именно, у детей, пожилых людей и пациентов с ВИЧ. Результаты позволяют предположить, что 3 описанных здесь белка, то есть, ABC-T, PavA и ZmpB, содержат области связывания антител (или В-клеточный эпитоп), распознаваемые человеческими антителами, что подтверждает возможность их использования в качестве потенциальных кандидатов на вакцины.

ПРИМЕР 2

На фигуре 5 показаны результаты подтверждения повсеместно экспрессируемых консервативных пневмококковых антигенов у мышей с моделью менингита. *S. pneumoniae* в 10 мкл стерильного физиологического раствора наносили на нос или вводили в большую цистерну. 100 мкл гомогената ткани головного мозга переносили в лунку 96-луночного планшета и делали десятикратные серийные разведения в стерильном PBS. Аликвоты по 60 мкл наносили пятнами на чашки с кровяным агаром, содержащим 10 мкг/мл гентамицина. Бактериальную нагрузку (КОЕ) определяли для гомогенатов тканей, подсчитанных для инфицированных животных с моделью доклинического менингита через 0, 1, 3, 7, 10 и 14 дней после заражения. Эти результаты показали, что если экспрессия белков ABC-T, PavA и ZmpB равна нулю, то вирулентность, то есть, способность *Streptococcus pneumoniae* распространяться и проникать в ткани хозяина, значительно снижается. Эти наблюдения убедительно подтверждают возможность использования этих белков в качестве кандидатов на вакцины.

ПРИМЕР 3

Мышей иммунизировали смесью трех антигенных детерминант, соответствующих SEQ ID NO: 1, 2 и 3 согласно изобретению, либо отдельно (Ag), либо в сочетании с квасцами (квасцы+Ag) или CpG-хитозаном (CpG-хитозан+Ag)/PrPV с использованием схемы первичной бустерной иммунизации и контрольного заражения 5×10^5 КОЕ/мышь в 50 мкл интраназально. Мышей отслеживали на появление нижеследующих признаков заболевания, и регистрировали показатели клинической боли у взрослых мышей C57BL/6 (фигура 6A), и у новорожденных мышей (фигура 6B) (n=10 на группу).

Исследования дозы-ответа при иммунизации антителами проводили с использованием смесей трех антигенных детерминант, соответствующих SEQ ID NO: 1, 2 и 3 согласно изобретению (Ag) в различных количествах, каждая в комбинации с постоянным количеством CpG-хитозана. Уровни антиген-специфических антител (Spe-IgG1, Spe-IgG2a) в антисыворотке оценивали у мышей (n=10), вакцинированных первичными и бустерными дозами рекомбинантных белковых антигенов (Ag), адсорбированных на CpG-хитозане в количестве 0,1, 1,0 и 10 мкг антигена/мышь. В качестве контроля использовали антисыворотку от животных, вакцинированных PBS/носителем. Результаты представлены как среднее значение \pm SEM (фигура 7A). Клеточно-опосредованный иммунный ответ определяли с использованием брыжеечных лимфатических узлов, собранных на 35-й день после иммунизации при повторной стимуляции *ex vivo* PavA+ABC-T+ZmpB (500 мкг/мл) в течение 72 часов. Для определения продуцирования цитокинов IL-17 и IFN- γ были проведены твердофазные

иммуноферментные анализы (ELISA) (фигура 7B).

Мышей вакцинировали PBS (носителем), только адьювантом (квасцами или CpG-хитозаном) или адьювантом+антигеном (квасцами+1,0 мкг Ag; CpG-хитозаном+1,0 мкг Ag). Через 35 дней после вакцинации, мышей интраназально заражали 5×10^5 КОЕ клинического изолята гипервирулентного пневмококка серотипа 1 и отбраковывали при появлении симптомов заболевания. Ответы, специфичные для вакцинных антигенов в брыжеечных лимфатических узлах, собранных на 35-й день после иммунизации, определяли путем повторной стимуляции *ex vivo* PavA+ABC-T+ZmpB (500 мкг/мл) в течение 72 часов. Для определения продуцирования цитокинов IL-17 (Th1) и IL-4 (Th2) проводили твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, вычисленные с использованием апостериорного критерия Крускала-Уоллиса с поправкой Данна (по сравнению с носителем (фигуры 7C и 7D). Вакцинация составом PrPV обеспечивает усиленную защиту от заболевания по сравнению с обычным адьювантом на основе квасцов.

ПРИМЕР 4

Защитную эффективность PrPV сравнивали с PCV-13 у взрослых (Фигура 8A) и новорожденных (Фигура 8B) мышей с моделью пневмококкового сепсиса и пневмонии. Мышей иммунизировали рекомбинантными ZmpB, ABC-T и PavA в сочетании с альгидрогелем («квасцы+Ag») и интраназально заражали *S. pneumoniae* 5×10^5 КОЕ. В течение 7 дней после заражения проводили мониторинг выживаемости животных. Число выживших мышей показано на графике как процент от общего количества мышей (n=10 мышей на группу). На фигуре 8C показана плотность бактерий в легких отдельных новорожденных мышей на 3-й день после заражения. Кровь брали путем сердечной пункции и наносили на чашки с кровяным агаром для подсчета жизнеспособных КОЕ (Фигура 8D). Во всех экспериментах, в качестве негативного контроля служили неиммунизированные мыши и мыши, иммунизированные только адьювантом.

В другом эксперименте, мышей иммунизировали рекомбинантными ZmpB, ABC-T и PavA, соответствующими SEQ ID NO: 1, 2 и 3, в комбинации с CpG-хитозаном (PrPV), а затем интраназально заражали *S. pneumoniae* 1×10^5 КОЕ. В течение 5 дней после заражения проводили мониторинг выживаемости животных. Число выживших мышей показано на графике как процент от общего количества мышей (n=10 мышей на группу). Невакцинные пневмококковые серотипы, например, 8, 11A и 33F, о которых сообщалось как о новых серотипах в Англии и Уэльсе, тестировали для оценки широты охвата защитного действия состава вакцины. Для сравнения использовали PCV-13, n=10 мышей на группу. Затем проводили мониторинг показателей выживаемости мышей (фигура 9A) и показателей клинической боли (фигура 9B). Эти результаты показали, что состав PrPV согласно изобретению обеспечивает лучшую иммунозащитную эффективность против невакцинных серотипов по сравнению с коммерчески доступной вакциной PCV-13 (Превенаром-13).

ПРИМЕР 5

Выделенные МКПК человека стимулировали PCV-13 (1:50) и PrPV, соответственно,

в течение 72 часов, и ответы Т-клеток исследовали путем внутриклеточного окрашивания. На фигуре 10 показаны (А) CD3⁺CD4⁺-Т-клетки, которые были стробированы для иллюстрации пролиферирующихся Ki67⁺-Т-клеток в прямоугольных стробах с процентами, указанными сверху. Процентное содержание клеток, имеющих IFN γ ⁺CD4⁺Th1 (В) и IL-17A⁺CD4⁺Th17 (С), показано в верхних правых квадрантах точечных графиков. Данные, полученные от двух отдельных доноров, были систематизированы на гистограммах. МС: контрольная среда. Результаты показали, что PrPV активирует ответы CD4⁺-Т-клеток в человеческих МКПК. В аналогичном эксперименте, выделенные человеческие МКПК стимулировали РСV-13 (1:50), CpG-хитозаном и PrPV соответственно в течение 7 дней с последующим определением активации В-клеток плазмы. Проценты В-клеток плазмы (отображенных как CD27^{high}CD38^{high}) в В-клетках памяти (CD19⁺CD27⁺IgD⁻) показаны на нижних контурных графиках (фигура 11). Данные являются репрезентативными для двух отдельных доноров. Эти результаты показали, что PrPV активирует В-клетки плазмы в человеческих МКПК.

ПРИМЕР 6

Взрослых мышей (n=10/группу), иммунизированных либо носителем, либо составом PrPV (содержащим ABC-Т/PavA/ZmpB, соответствующие SEQ ID NO: 1, 2 и 3, адсорбированные в CpG-хитозане), отбраковывали путем сердечной пункции и сыворотку (100-150 мкл/мышь) вводили неиммунизированным животным путем внутривенного введения. Через 4 часа после переноса, животным (с моделью сепсиса) внутривенно вводили болезнетворную дозу *S. pneumoniae*. Затем регистрировали время выживания мышей (фигура 12А) и количество жизнеспособных КОЕ в крови и в легких (фигура 12В). Эти результаты показали, что сыворотка мышей, иммунизированных PrPV, обеспечивает пассивный иммунитет у мышей, не подвергавшихся обработке.

Человеческие МКПК, взятые у здоровых добровольцев, выделяли из цельной крови с помощью Фиколла-Пака Plus путем разделения в градиенте плотности и культивировали в течение 7-8 часов в присутствии композиции PrPV. Затем супернатанты собирали, концентрировали с использованием концентраторов Vivaspin (10K MWCO) и вводили внутривенно взрослым неиммунизированным мышам. Через 4 часа после переноса, животных (n=5/группу) заражали либо интраназально (с моделью пневмонии), либо внутривенно (с моделью сепсиса) *S. pneumoniae*. После этого регистрировали время выживания мышей (фигура 13А) и количество жизнеспособных КОЕ в крови и легких (фигура 13В). Эти результаты показали, что концентрированные супернатанты PrPV-стимулированных культур МКПК человека обеспечивают пассивный иммунитет у ранее не подвергавшихся обработке мышей.

ПРИМЕР 7

Взрослых мышей (n=10/группу), иммунизированных либо носителем, либо составом PrPV, отбраковывали путем сердечной пункции и брали сыворотку (100-150 мкл/мышь, разведенную 1:16) для использования в анализе на функциональное уничтожение посредством опсонофагоцитоза (анализ на ОРК). ОРК проводили для тестирования

способности антисыворотки вакцинированных мышей опсонизировать жизнеспособные пневмококки и опосредовать их уничтожение. Был проведен эталонный анализ на опсонофагоцитоз, при котором приготавливали реакционную смесь, состоящую из термоинактивированной сыворотки, полученной от вакцинированных и невакцинированных мышей; дифференцированных клеток HL-60 или свежевыделенных нейтрофилов человека, пневмококков и комплемента крольчат. Контрольные реакции без комплемента и/или антитела, эффекторных клеток или всех компонентов, кроме пневмококков, проводили параллельно и инкубировали при 37°C со встряхиванием. Результаты показали, что сыворотка мышей, иммунизированных PrPV, способствует опсонизации пневмококков *in vitro* и превосходит лицензированную вакцину PCV-13 (фигура 14).

ПРИМЕР 8

Было проведено исследование реакции выработки антител в зависимости от дозы для отдельных белков в комбинации с CpG-хитозаном по сравнению с композицией PrPV. Затем оценивали уровни антиген-специфических антител (Spe-IgG1, Spe-IgG2a) в антисыворотке, взятой у мышей (n=10), вакцинированных первичными+бустерными дозами одного белка или композиции PrPV (обозначенной «CpG-хитозан+смесь») в дозе 1,0 мкг/мышь. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (фигура 15A). Также исследовали клеточно-опосредованный иммунный ответ при вакцинации отдельным белком по сравнению со смешанными препаратами белка. Ответы, специфичные для вакцинных антигенов в брыжеечных лимфатических узлах, собранных на 35-й день после иммунизации, определяли путем повторной стимуляции *ex vivo* P_{avA}, ABC-T или ZmpB (500 мкг/мл) в течение 72 часов. Для определения продуцирования цитокинов IL-17A (Th17) и IFN-гамма (Th1) проводили твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) (фигура 15B). Эти результаты показали, что вакцинация препаратом смешанного белка демонстрирует повышенную иммуногенность по сравнению с препаратами, содержащими CpG-адьювант, и по сравнению с одним белком.

Взрослых мышей (n=10 на группу) вакцинировали PBS (носителем), одним антигеном плюс CpG-хитозан или PrPV. Через 35 дней после вакцинации, мышей интраназально заражали 5×10^5 КОЕ клинического изолята гипервирулентного пневмококка серотипа 1 и отбраковывали при появлении симптомов заболевания. На фигуре 16A показана кривая выживаемости. Количество жизнеспособных бактерий в крови и в легких определяли через заранее выбранные интервалы времени после интраназального заражения (фигура 16B). Образцы тканей гомогенизировали с помощью гомогенизатора IKA T10. Количество жизнеспособных клеток в суспензии клеток легких и в пробах крови определяли путем серийного разведения в стерильном PBS и посева на кровяной агар, содержащий 5% (об./об.) дефибринизированной лошадиной крови (Oxoid) и 10 мкг/мл гентамицина (sigma). После сушки, планшеты инкубировали в 5% (об./об.) CO₂ при 37°C в течение ночи и на следующий день оценивали количество бактериальных колоний. Эти результаты показали, что вакцинация препаратом смешанного белка согласно изобретению

обеспечивает усиленную защиту от заболевания по сравнению с препаратом, содержащим один белок в качестве адъюванта.

Взрослых мышей ($n=5$ на группу) вакцинировали PBS (носителем) или адъювантом+антигеном (CpG-хитозаном+1,0 мкг Ag в композициях с парами белков). Составы пар белков представляли собой белки, соответствующие SEQ ID NO: 1, 2 и 3 (PavA+ABC-T или ABC-T+ZmpB или PavA+ZmpB). Через 35 дней после вакцинации, мышей интраназально заражали 5×10^5 КОЕ клинического изолята гипервирулентного пневмококка серотипа 1 и отбраковывали при появлении симптомов заболевания. На фигуре 17А показана кривая выживаемости. Количество жизнеспособных бактерий в крови (фигура 17В) и в легких (фигура 17С) определяли через заранее выбранные интервалы времени после интраназальной инфекции. Образцы тканей гомогенизировали с помощью гомогенизатора ИКА Т10. Количество жизнеспособных клеток в суспензии клеток легких и в пробах крови определяли путем серийного разведения в стерильном PBS и посева на кровяной агар, содержащий 5% (об./об.) дефибринизированной лошадиной крови (Oxoid) и 10 мкг/мл гентамицина (Sigma). После сушки, планшеты инкубировали в 5% (об./об.) CO_2 при 37°C в течение ночи и на следующий день оценивали количество бактериальных колоний. Эти результаты показали, что вакцинация препаратами с парами белков индуцирует защитную эффективность в следующем порядке: PavA+ZmpB, PavA+ABC-T, ABC-T+ZmpB.

ПРИМЕР 9

Влияние иммунологической композиции согласно изобретению (PrPV) на пневмококковую колонизацию и «слушивание» оценивали на мышах C57BL/6 после внутримышечной иммунизации. Объем 10 мкл раствора вводили внутримышечно на 7, 14 и 21 дни постнатального периода, $n=10$ мышат/группу. Контрольным группам вводили либо только адъювант, либо раствор свободного антигена, то есть, раствор антигена без адъюванта. Через две недели после введения второй бустер-дозы, инокуляты вводили мышам интраназально в стерильном растворе носителя PBS в концентрации 10^5 пневмококковых КОЕ/10 мкл/мышь. Плотность бактерий (определенную путем гомогенизации тканей и постукивания по носу) определяли в течение периода мониторинга, составляющего 15 дней (Фигура 18). Элиминация пневмококка из носоглотки человека может иметь пагубные последствия. Поэтому, разумным подходом является разработка вакцин, которые позволяют пневмококку оставаться в носоглотке, но предотвращают его распространение на другие участки тела, которое может приводить к инфицированию. Композиция PrPV согласно изобретению обеспечивает защитную эффективность против пневмококковой инфекции, но не влияет на экологию пневмококка в носоглотке мыши.

ПРИМЕР 10

Иммунологический ответ, индуцированный PrPV у мышей, оценивали с помощью проточной цитометрии. Объем 10 мкл раствора PrPV вводили внутримышечно на 7, 14 и 21 дни постнатального периода $n=10$ мышатам/группу. Дополнительным группам мышей вводили либо только адъювант («CpG-хитозан»), либо контрольный раствор носителя.

Через две недели после введения второй бустер-дозы, мышей иммунизировали 2×10^5 КОЕ пневмококка серотипа 1 в 50 мкл/мышь. Пролиферация иммунных клеток, оцененная в брыжеечных лимфатических узлах через 3 дня после пневмококковой инфекции, показана на Фигуре 19. Результаты показали, что композиция согласно изобретению (PrPV) способна индуцировать пролиферативные ответы (оцененные по процентному содержанию CD3⁺CD4⁺-Ki-67-позитивных клеток) в лимфоидных структурах мышей, иммунизированных PrPV.

ПРИМЕР 11

Взрослых мышей (n=5 на группу) вакцинировали PBS (носителем), только адьювантом CpG-хитозаном («CpG-хитозан») или PrPV (то есть, CpG-хитозан+1,0 мкг SEQ ID NO:1, 1,0 мкг SEQ ID NO:2+1,0 мкг SEQ ID NO:3/мышь). Через 35 дней после вакцинации, мышей интраназально заражали 5×10^5 КОЕ клинического изолята гипервирулентного пневмококка серотипа 1 и отбраковывали через 24 часа. Антиген-специфические ответы на действие вакцины в суспензии одиночных клеток легких, собранных в конце эксперимента, определяли путем повторной стимуляции *ex vivo* с помощью PavA, ABC-T или ZmpB (500 мкг/мл) в течение 24 часов. Вкратце, легкие мышей вырезали и переносили в миниатюрную пробирку, содержащую буфер Хэнкса (HBSS). Любую оставшуюся ткань трахеи осторожно удаляли, а легочную ткань разрезали на мелкие кусочки и помещали в чашки Петри. Раствор для гидролиза, содержащий коллагеназу в количестве 300 ед./мл и ДНКазу I в количестве 75 мкг/мл, добавляли к кусочкам легкого (2 мл/мышь) и инкубировали при 37°C в течение 40 минут - 1 часа. Гидролизованную ткань пропускали через клеточный фильтр, центрифугировали и осадок ресуспендировали в 5 мл 1×буфера для лизиса эритроцитов (при инкубировании в течение 4 минут), а затем клетки подсчитывали и высевали при плотности 4×10^6 клеток/мл. Полученные суспензии одиночных клеток окрашивали антителами против CD62L, против CD44 или против IL-17A, конъюгированными с их соответствующими флуорофорами, и анализировали с помощью проточной цитометрии. На фигуре 20A показаны репрезентативные точечные диаграммы для каждой группы, а именно, для контроля, для антигенов, для CpG-хитозана (только с адьювантом) и для PrPV, где в верхнем правом квадранте указан процент CD62L⁺CD44⁺IL17A-позитивных клеток. На фигуре 20B показано, что процент CD62L⁺CD44⁺IL17A-позитивных клеток у мышей, иммунизированных PrPV, значительно выше, чем во всех других группах (**<p<0,01; ***p<0,001). Эти результаты позволяют предположить, что вакцинация PrPV приводит к IL-17A-опосредованному защитному иммунитету, который значительно выше по сравнению с группами, получающими только носитель или только адьювант.

ПРИМЕР 12

Защитную эффективность антигенов согласно изобретению тестировали при совместном приготовлении с бета-глюканами (β -1,3/1,6-D-глюканом, IRI 1501, выделенным из *Saccharomyces cerevisiae*). Взрослых мышей вакцинировали PBS (носителем), только адьювантом (в составе на основе бета-глюкана с добавлением CpG или без него) или

адьювантом+смесью антигенов ZmpB и PavA, соответствующих SEQ ID NO: 3 и 2 (адьювантом на основе бета-глюкана+1,0 мкг Ag с добавлением CpG или без него). Через 35 дней после вакцинации, мышей интраназально заражали 5×10^5 КОЕ клинического изолята гипервирулентного пневмококка серотипа 1 и отбраковывали при появлении симптомов заболевания. Затем строили кривые выживаемости (Фигура 21А) и определяли количество жизнеспособных клеток (КОЕ) в крови (Фигура 21В) и в тканях легких (Фигура 21С). Защитная эффективность 40% была достигнута у мышей, которым вводили либо только антигены, либо антиген+CpG+бета-глюканы, что позволяет предположить, что адьювантная композиция на основе бета-глюкана не влияет на защитную эффективность, сообщаемую антигенами согласно изобретению, и может быть превращена в сильнодействующую пневмококковую вакцину после дальнейшей оптимизации, например, дозировки, схемы иммунизации и/или изменения состава с использованием других иммуностимулирующих соединений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере две антигенные детерминанты, где антигенные детерминанты происходят из по меньшей мере двух белков, выбранных из ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

2. Иммуногенная композиция, содержащая генетическую конструкцию или конструкции, кодирующие по меньшей мере две антигенные детерминанты, где антигенные детерминанты происходят из по меньшей мере двух белков, выбранных из ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

3. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере одну антигенную детерминанту и генетическую конструкцию или конструкции, кодирующие по меньшей мере одну другую антигенную детерминанту, где антигенные детерминанты происходят из по меньшей мере двух белков, выбранных из ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

4. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-3, где антигенные детерминанты происходят от всех трех белков ABC-T, PavA и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

5. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-4, где антигенная детерминанта, полученная из ABC-T, содержит белковую последовательность SEQ ID NO:1 или состоит из белковой последовательности SEQ ID NO:1, или ее иммунологически эффективного фрагмента, или иммунологически эффективного аналога последовательности, или его фрагмента; и/или

где антигенная детерминанта, полученная из PavA, содержит белковую последовательность SEQ ID NO:2 или состоит из белковой последовательности SEQ ID NO:2, или ее иммунологически эффективного фрагмента, или иммунологически эффективного аналога последовательности или ее фрагмента; и/или

где антигенная детерминанта, полученная из ZmpB, содержит белковую последовательность SEQ ID NO:3 или состоит из белковой последовательности SEQ ID NO:3, или ее иммунологически эффективного фрагмента, или иммунологически эффективного аналога последовательности или ее фрагмента.

6. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-5, дополнительно содержащая иммуностимулирующий агент, где предпочтительно иммуностимулирующий агент представляет собой адъювант.

7. Иммуногенная композиция по п.6, где адъювант содержит одно или более веществ, выбранных из веществ, оказывающих стимулирующее действие на ловушко-подобные рецепторы (TLR), цитозольные рецепторы распознавания паттерна (PRR), такие как рецепторы, подобные нуклеотид-связывающему домену (NOD) олигомеризации (NLR), лектиновые рецепторы С-типа (CLR), чувствительные к нуклеиновым кислотам рецепторы, такие как ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), или сенсоры питательных веществ, такие как mTOR и GCN2; веществ, действующих по меньшей мере на один из следующих путей: MyD88/TLR-сигнальные пути, путь cGAS-стимулятора генов интерферона (STING), путь NF-κB, любые пути стресса, гибели клеток и повреждения

тканей (такие как некроз/некроптоз, апоптоз, аутофагия), приводящие к высвобождению ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP), таких как нуклеиновые кислоты, мочевая кислота, АТФ и белки, которые активируют врожденную иммунную систему, любые сигнальные пути, приводящие к рекрутингу иммунных клеток или к эпигенетическим изменениям, поддерживающим врожденную иммунную систему в возбужденном состоянии в течение длительных периодов времени, то есть, в состоянии, подобном памяти; веществ, обладающих способностью индуцировать активацию инфламмосомы в результате дифференцировки клеток в клетки с иммунитетом, опосредуемым CD4⁺-Th2 (интерлейкином-4), Th1 (интерфероном-гамма) или Th17 (IL17A); иммуностимуляторов; веществ на основе полисахаридов, действующих на сигнальные пути IL-1 β , CLR и TNF- α ; систем доставки и адъювантов слизистой оболочки.

8. Иммуногенная композиция по п.6 или п.7, где адъювант содержит одно или более веществ, выбранных из бактериальных белков и/или полисахаридных веществ, таких как капсулы и их аналоги, токсина/токсоида и их аналогов, лигандов TLR и их аналогов, агонистов, таких как Pam3CSK4, Pam2CSK4, MPLA (производное ЛПС), CpG, мотивы PolyI:C, CpG; микрочастиц и наночастиц, таких как хитозан или бета-глюканы, флагеллин, сополимер молочной и гликолевой кислоты или сополимер PLGA и 1-лизина/гамма-глутаминовой кислоты (PLGA-PLL/gammaPGA), или веществ, изготовленных из липидного остова на основе любых других иммуностимулирующих агентов, таких как монофосфориллипид А (MPLA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), олигоманноза, Poly(I:C), внеклеточные везикулы (EV), такие как везикулы наружной мембраны (OVM); систем для инкапсуляции на основе масла или систем на основе эмульсии, включая эмульсии типа «вода-в-масле», «масло-в-воде» и термообратимые эмульсии «масло-в-воде», такие как Montanide ISA-51, Montanide ISA-720 и их аналоги, квасцы или адъюванты на основе солей алюминия, липосомы, виросомы, археосомы, везикулы наружной мембраны, ниосомы, сапонины и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), полимерные частицы, цитокины, включая провоспалительные цитокины, такие как IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-17A/F, GM-CSF и MPI, вирусоподобные частицы (VLP), бактериальные компоненты, такие как детоксицированный вариант LPS, такой как монофосфориллипид А (MPL), мурамилдипептид (липофильный и гидрофобный MDP), QS21, PLGA, СТ, катионный адъювант на основе липосом, например, CAF 01-09 (состоящий из Span80, полиоксиэтиленцетилстеарилового эфира, маннита, сквалена) и аналоги, состоящие из холестерина, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина, или альфа-Gal-церамид, NOD-подобный рецептор белка инфламмосомы 3 (NLRP3), ассоциированный с апоптозом белок пятнистости, содержащий CARD (ASC), белок инфламмосомы 4, содержащий домен NLR-семейства CARD (NLRC4), белок инфламмосомы 2, отсутствующий в меланоме (AIM2), дцРНК: поли(I:C), поли-IC:LC, монофосфориллипид А (MPL), LPS, флагеллин, имидазохинолины: имихимод (R837), резихимод (848), CpG-олигодезоксинуклеотиды (ODN), мурамилдипептид (MDP), сапонины (QS-21); бактериальных молекул или производных, включая полисахаридные капсулы и их аналоги, токсин/токсоид и их

аналоги, неметилованную ДНК (CpG) и их аналоги, цитокины, такие как IL-2, IL-12, TNF- α , и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), хемокины, такие как RANTES (регулируемые при активации, и экспрессируемые и секретируемые нормальными Т-клетками), макрофагальный воспалительный белок (MIP)-1 α , костимулирующие или адгезивные молекулы, такие как CD80, антиген-3, ассоциированный с функцией лимфоцитов, и полиаргининовые хвосты; веществ на основе полисахаридов со свойствами, подобными свойствам хитозана, таких как CpG-дельта-инулин, кохлеаты, вирусоподобные частицы (VLP), микрочастицы, такие как виросомы, PLA (полимолочная кислота), PLG (сополимер лактида и гликолида), производные холерного токсина (СТ) и термолабильный энтеротоксин (LTK3 и LTR72).

9. Иммуногенная композиция по любому из пп. 6-8, где адъювант содержит одно или более веществ, выбранных из агонистов TLR, агентов, способных индуцировать опосредованный CD4⁺-Т-клетками иммунный ответ (в частности, с Th1- и/или Th17-дифференцированным профилем), эмульсий типа «масло-в-воде», эмульсий типа «вода-в-масле», агентов, действующих на сигнальный путь MyD88/TLR, агентов, действующих на путь cGAS-стимулятора генов интерферона (STING), и полисахаридных веществ в виде частиц, где предпочтительно адъювант содержит комбинацию агониста TLR и агента, способного действовать на сигнальный путь MyD88/TLR или путь cGAS-стимулятора генов интерферона (STING); например, комбинацию CpG с хитозаном и/или бета-глюканом.

10. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащая одну или более дополнительных антигенных детерминант бактерии *Streptococcus pneumoniae*, которая является инкапсулированной или конъюгированной, и которая выбрана из группы, включающей пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый холинсвязывающий белок А (PcpA), секретируемый белок Usp45-гидролазу размером 45 кДа (PcsB), серин/треониновую протеинкиназу (StkP), пептидный фермент пермеазу, переносчик марганца-ABC (PsaA), пневмолизин D (PlyD), пневмолизининовый токсид (dPly), холинсвязывающие белки А (CbpA) и D (CbpD), белок гистидиновой триады D (PhtD), белок гистидиновой триады E (PhtE), белок гистидиновой триады А (PhtA), белок гистидиновой триады В (PhtB); пневмококковый белок поглощения серина-треонина А (PiuA), белок отделения клеточной стенки (PcsB), пневмококковую серин-треонинкиназу (StkP) и их аналоги, плазмин и фибронектин-связывающий белок А (PfbB), SP0148, SP1912 и SP2108, SP0785, SP1500, SP2216.

11. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-10, которая представляет собой жидкость, суспензию, таблетку или спрей, или является лиофилизованной.

12. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-11, которая доставляется посредством носителя, выбранного из группы, включающей вирусоподобные частицы (VLP), везикулы наружной мембраны (OMV), липосомы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), полимерные, неразлагаемые, биоразлагаемые вещества, природные полимерные соединения, крахмал, альгинаты, целлюлозу, биосинтетические вещества,

полибета-гидроксibuтират (ПГБ), сополимеры полимолочной кислоты (PLA), полиуретан, сополимер молочной и гликолевой кислоты (PLGA), полиметилметакрилатную смолу (PMMA), пробиотики, бактерии вида *Lactobacilli* и *Bifidobacteria*; вирусные векторные системы; модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), поксвирусы, аденовирусы и бактериофаги.

13. Вакцина, содержащая иммуногенную композицию по любому из пп. 1-5.

14. Вакцина по п.13, включающая один или более признаков по любому из пп. 6-12.

15. Способ лечения или профилактики бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума, включающий введение достаточного количества иммунологической композиции по любому из пп. 1-12 или вакцины по пп. 13 и 14 для лечения или профилактики бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума, нуждающегося в этом.

16. Способ иммунизации индивидуума против бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae*, включающий введение эффективного количества иммунологической композиции по любому из пп. 1-12 или вакцины по пп. 13 и 14 индивидууму, нуждающемуся в этом.

17. Способ по п.15 или п.16, где иммунологическую композицию или вакцину вводят перорально, интраназально, путем ингаляции или инъекции.

18. Способ по п.17, где введение осуществляют способом, выбранным из группы, включающей внутривенное, внутривнутрибрюшинное, внутримышечное, внутривнутриполостное, подкожное, интрадермальное, интраназальное введение и введение путем ингаляции.

19. Иммунологическая композиция по любому из пп. 1-12 или вакцина по п.13 или п.14 для применения в лечении или профилактике бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума и/или иммунизации против бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума, и/или диагностике или скрининге бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума.

20. Набор, содержащий иммуногенную композицию по любому из пп. 1-12 или вакцину по п.13 или п.14, и средство для введения иммуногенной композиции или вакцины индивидууму.

21. Способ лечения или профилактики бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума или иммунизации против бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae* у индивидуума, включающий введение достаточного количества по меньшей мере одной антигенной детерминанты, полученной из белка, выбранного из ABC-T, P_{av}A и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae* и одновременное или последовательное введение достаточного количества по меньшей мере одной антигенной детерминанты, полученной из белка, выбранного из других ABC-T, P_{av}A и ZmpB бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

По доверенности

Фиг. 1

MDGIAKEWGFASRSAYSRDILAMESFSTYIGNQFTRTEKLQTQTGNDSMKFNNGI
SQFSSVRNRSSSSTLDKLGFKSSGTNLNLRANNILADSLFGIQYNISDSPIDKYGF
KDIYQKDNLTLYENQYSLPIAVASQSVYNDVKFNEHTLDNQASFLNQLANVNFYFS
PIPYEKTEKIENTNDLISVTSSSNEDAAIQYQIEVPENSQVYLSFINLHFSNDKQKVV
DILVNGEKKTFTTDNVFSFFNLGYTKEKKTFNINVSFPGNSQVSFESPTFYRLDTKTF
TEAIQKIKEQPVTVSTSKNKVFATYDVQQDTSIFFTIPYDKGWSAYQDGKKIEIKQA
QTGFMKVDIPKGGSG

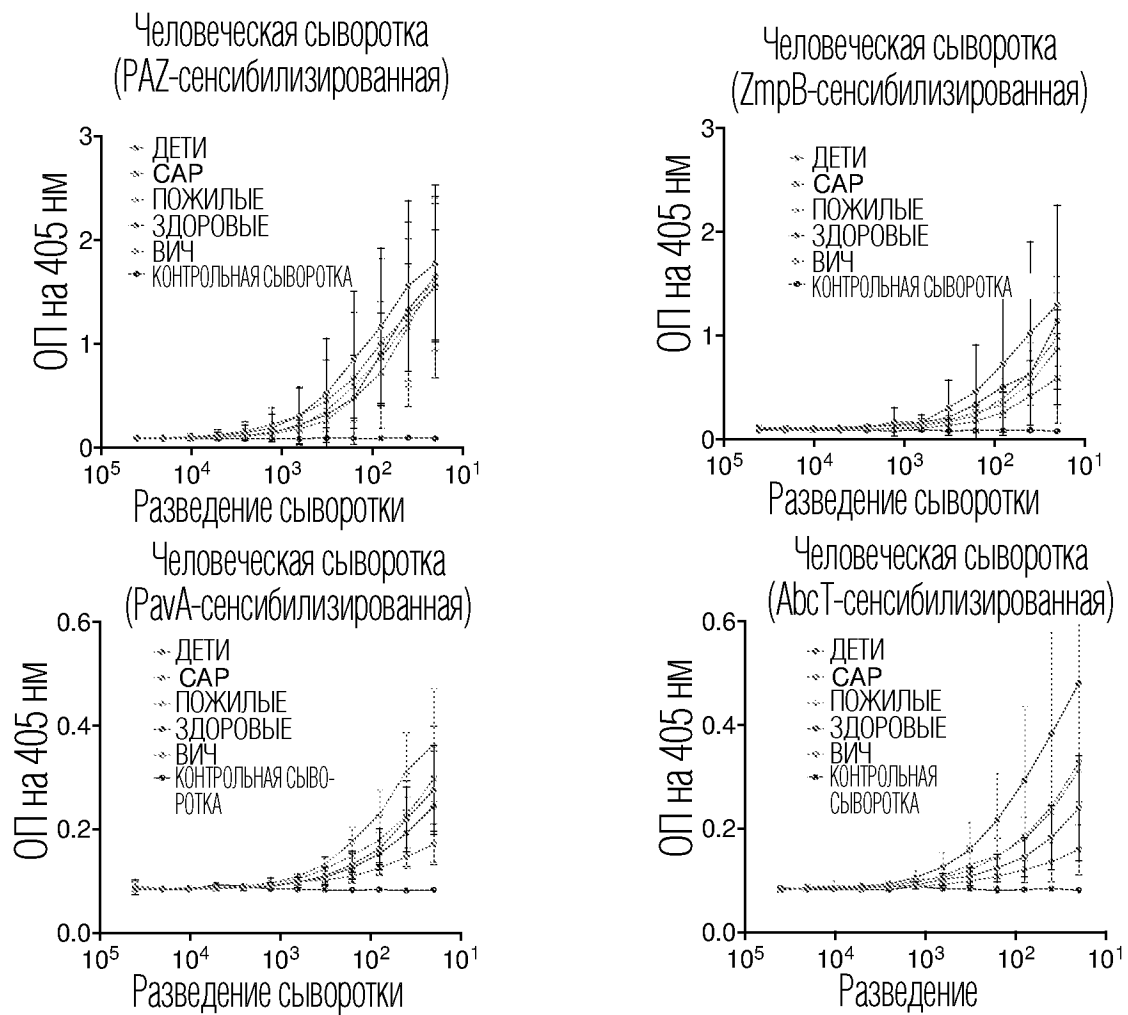
Фиг. 2

MSFDGFFLHHIVEELRSELVNGRIQKINQPFEQELVLQIRSNRQSHRLLLSAHPVFGR
IQLTQTTFENPAQPSTFIMVLRKYLQGALIESIEQVENDRIVEITVSNKNEIGDHIQAT
LIIIEIMGKHSNILLVDKSSHKILEVIKHVGFQNSYRLLPGSTYIAPPSTKSLNPFTIK
DEKLFELQTQELTAKNLQSLFQGLGRDTANELERILVSEKLSAFRNFFNQETKPCLTE
TSFSPVPFANQVGEPFANLSDLLDTYYKDKAERDRVKQQASELIRRVENELQKNRHK
LKKQEKELLATDNAEEFRQKGELLTTFHQPNDQDQVILDNYTNPIMIALDKALT
PNQNAQRYFKRYQKLKEAVKYLTDLIEETKATILYLESVETVLNQAGLEEIAEIREELIQ
TGFIRRRQREKIQKRKKLEQYLASDGKTIIVGRNNLQNEELTFKMARKEELWFHAK
DIPGSHVVISGNLDPDAVKTDAEELAAAYFSQGRLSNLVQVDMIEVKKLNKPTGGPK
GFVYTYGQKTLRVTPDSKKIASMKKSGSG

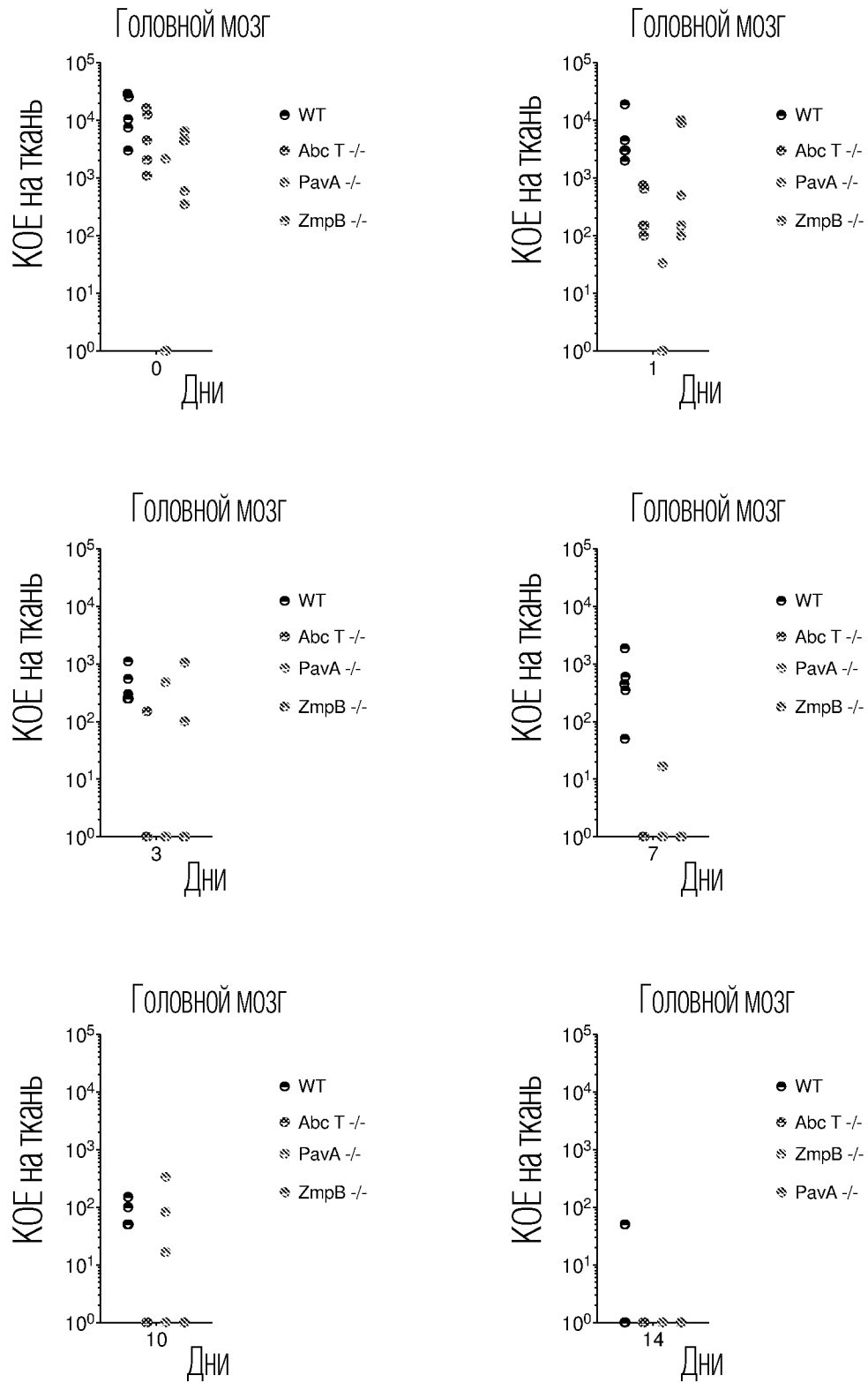
ФИГ. 3

MDKLYYYQGYTLSTTMVYDRGEGEETEKLEDKQIQLDLKKVEIKNIKETSLMNVDAE
GNETDKSLLSEKPTDVSQLYLRVTTHDNKVTRLAVSSVEEVVVDGKTLTKVAKAPD
LVQRRADDTLSEEVVHYFEKQLPKVNNVYYNFNELVKDMQANPMGEFKLGADLNAV
NVKPAKAYVMAKFRGTLSSVENHQYTIHNLERPLFNEAEGATLKNFNLGNVNINMP
WADKVAPIGNMFKKSTLENIKVVGSVTGNNVDVTGAVNKLDEANMRNVAFIGKINSL
GDKGWWSSGGLVSESWRSNTDSVYFDGDIVGNNSKFGGLVAKVNHGNSNQWDVK
QKGRLTNSVVKGTMTLKNHGQSGGLVHENYDWGWVENNISMMKVNNGEIMYGS
GSIDGDPYFGFDYFKNNYYVKDVATGESTYKRSKQIQSISQAEADAKIANMGITANT
FAIQDPVVNKLNRIIDRDSEYKAIQDYQETRNLAYRNLEKLQPFYNKEWIVNQGNKL
TDESNLVKKTVLSVTGMKSGQFVTDLSSVDKIMIHADGTKEEFGVSAISDSRVKQ
VKEYNVDDLGVVYTPNMVDKNRDSLITKVKEKLSSVALDSADEVKSITNNPASLYLEE
SFAEVRETLDKLVKSLENEHDHQLNSDEVAEKALLKKVEDNKAKIILALTYLNRYYGI
DYDGLNFKHLMMPDFYFKTPSILDFLIRIGSAEKNLKGDRSLEAYREVIGGTIGKG
ELNGLLGYNMRLFTKYTDLNDWFIHAAKNVYVSEPETTTEDFKDKRHRIDGLNNDV
HGRMILPLLNLKKAHIFVISTYNTIAFSSFEKYGKNTEEERNAYKAEIDRVAKAQRYL
DFWSRLALPKVRNQLLKSQNSVPTPVWDNQVYVGLGGANRMGYGDGGRVVTPVR
ELFGPTDRWHQINWNMGAMAKIYERPWKDDQVYFMVTNMMEPFGISAFTHETTHV
NDRMAYYGGDWHREGTDLEAFAQGMLQTPDKSTTNGEYGALGINMAYERKNDGE
QLYNYDPEKLDREKIDSYMKNYNESMMMLDYLEASAVIRQNLSDNSKWFKKMDK
EWRTNADRNRILIGEPHQWDLRDLTEEEKLPIDSIDKLVENNFVTLHGMPKNGRY
RTEGFDSSYQPVNMMAGVFGGNTSKSTVGSISFKHNAFRMWGYGYENGFIYVVS
NKLKGAANKENKGLLGDDFIKKVSKNQFQNLLEWKKHWYHEVYDKAQKGFVEIEV
DGVKISTYAQLQSLFEEAVSKDLAGMDDKNIKHYQYTENLKWKIYKQLLKNTDGF
SSDLFTAPQAGSG

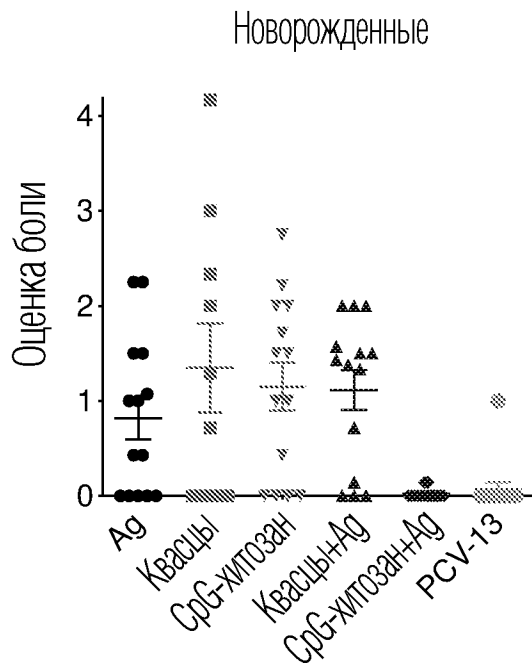
ФИГ. 4



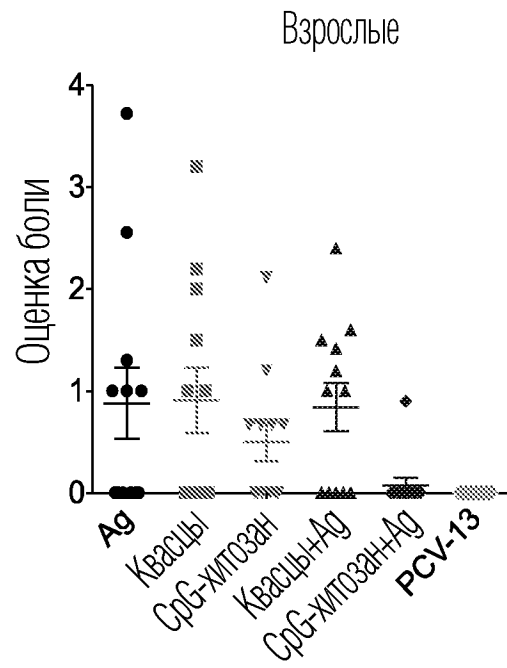
ФИГ. 5



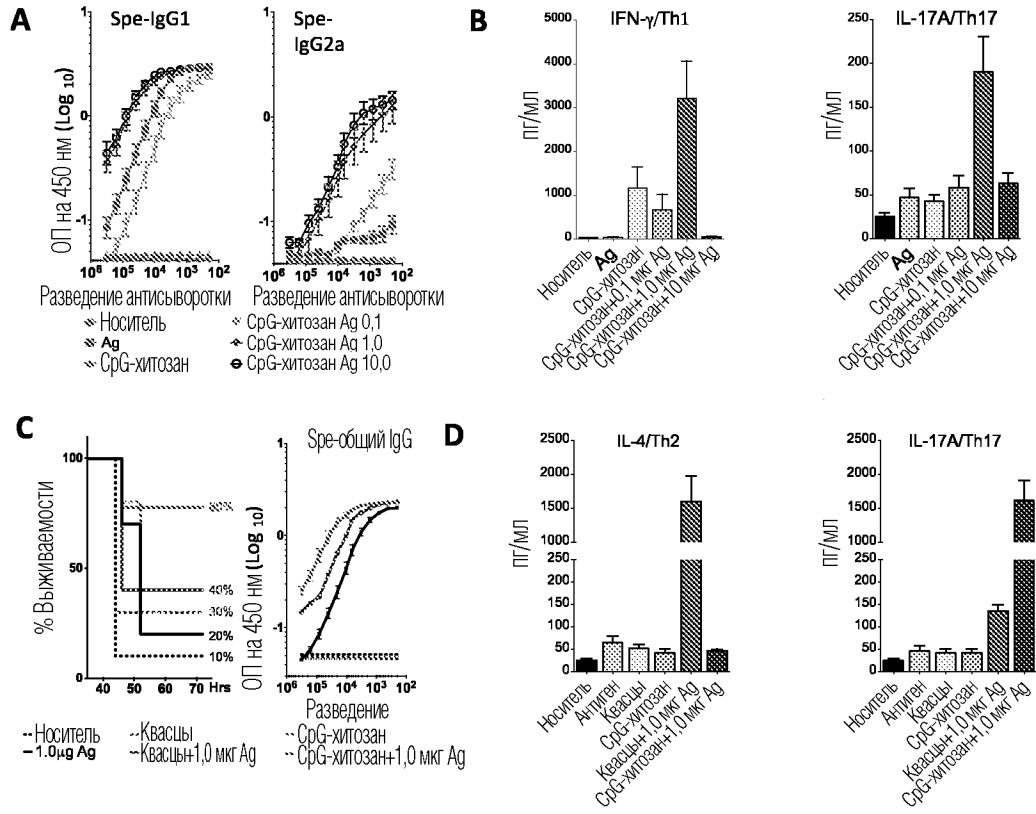
ФИГ. 6А



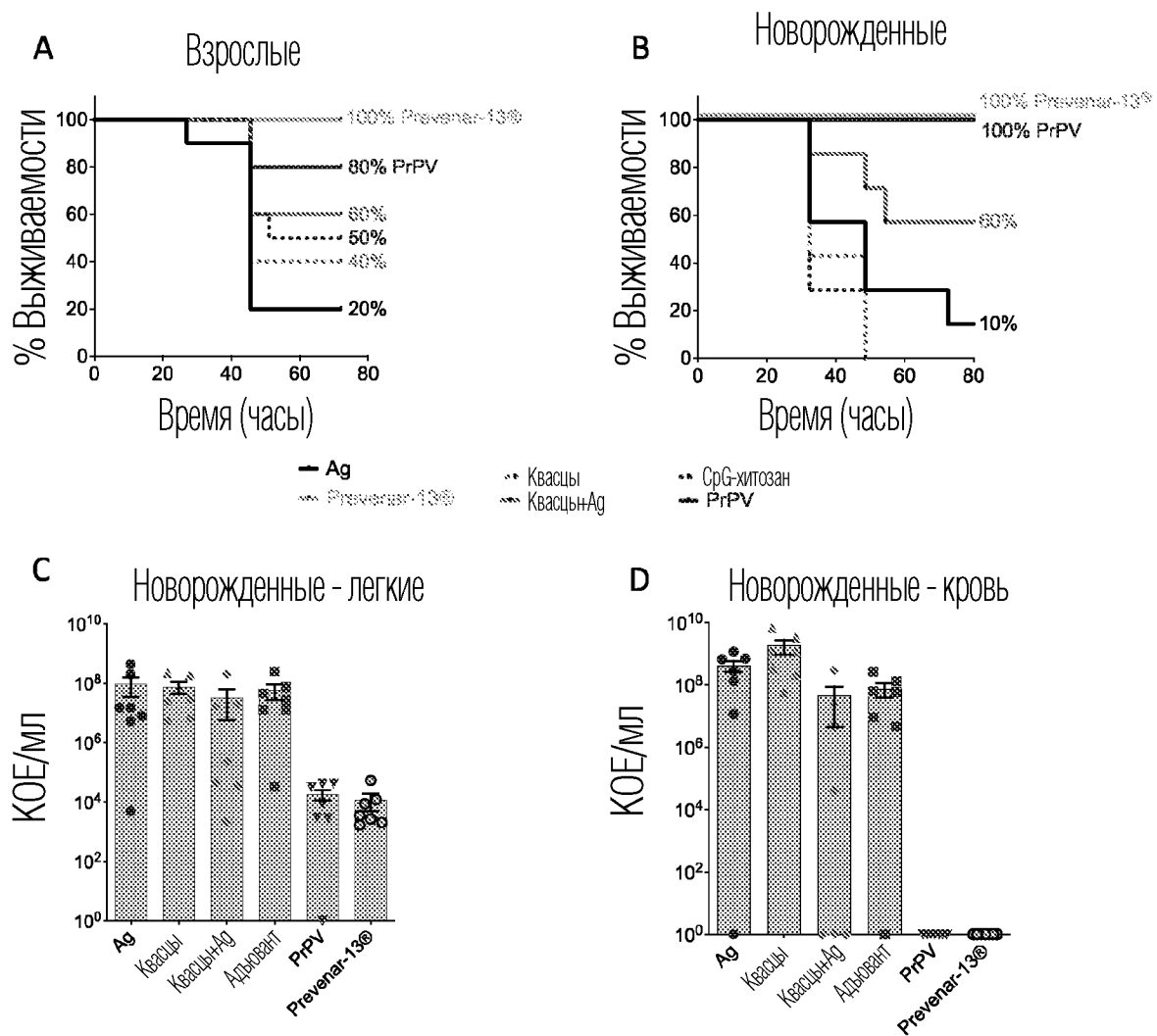
ФИГ. 6В



ФИГ. 7

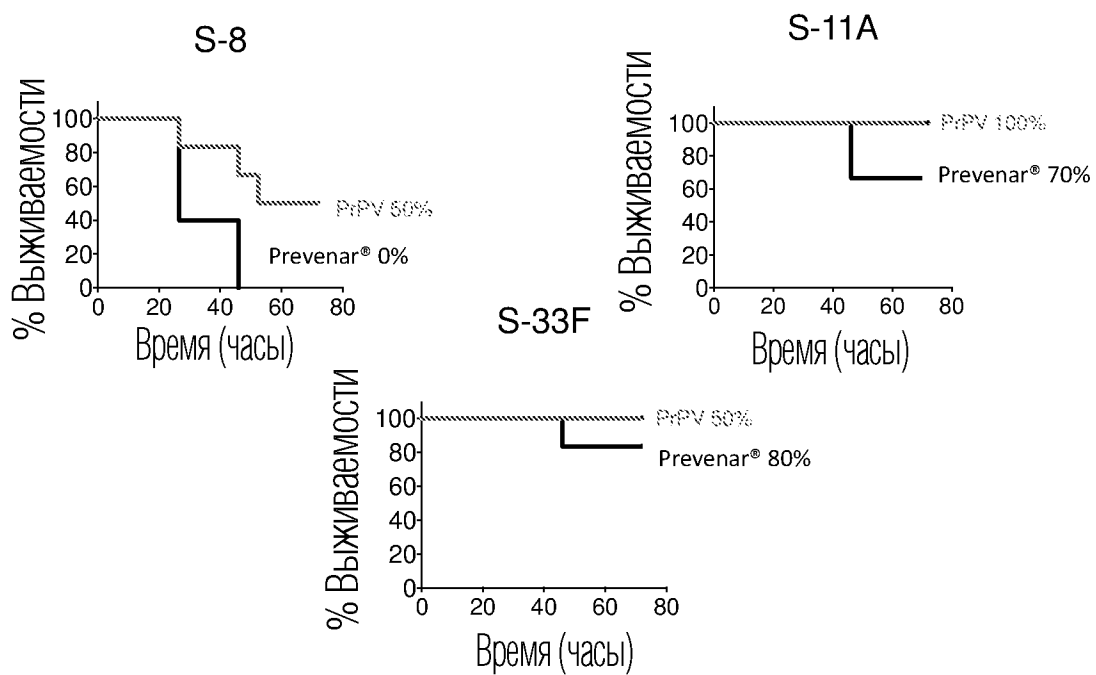


ФИГ. 8

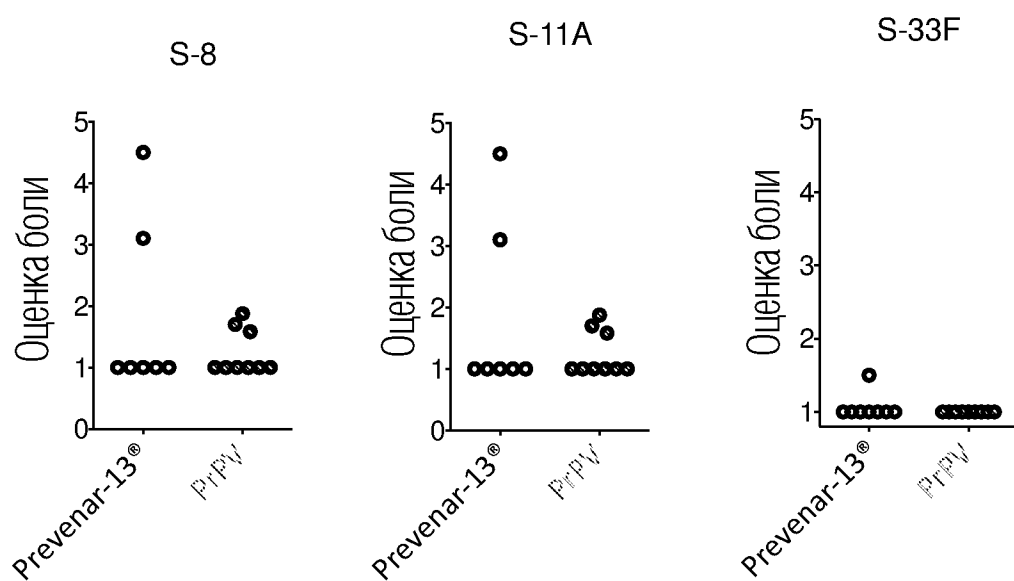


ФИГ. 9

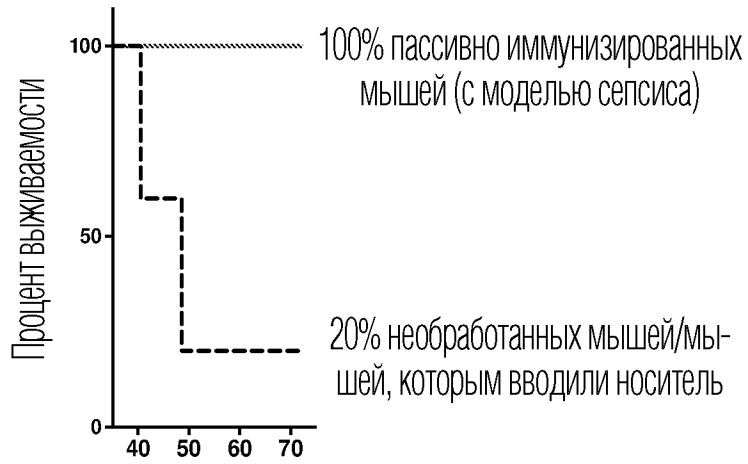
А. Выживаемость



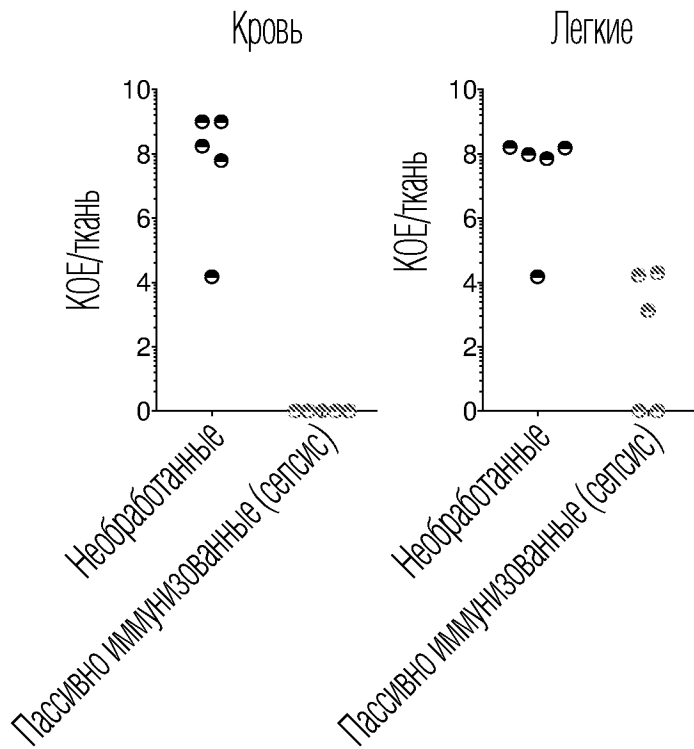
В. Оценка боли



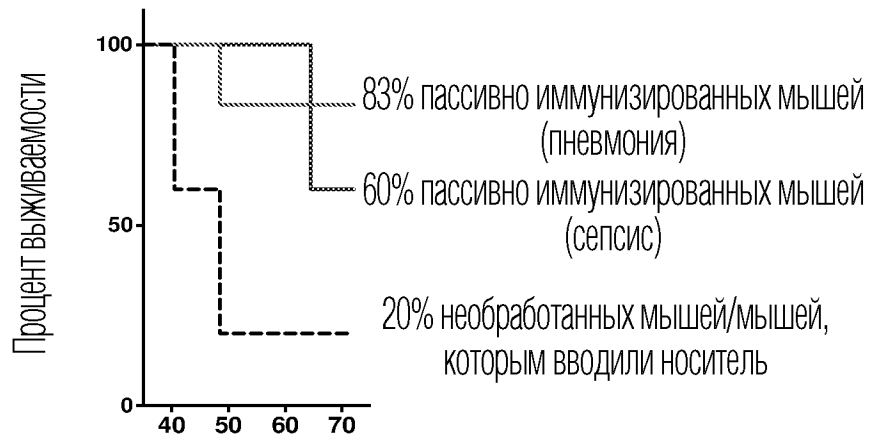
ФИГ. 12А



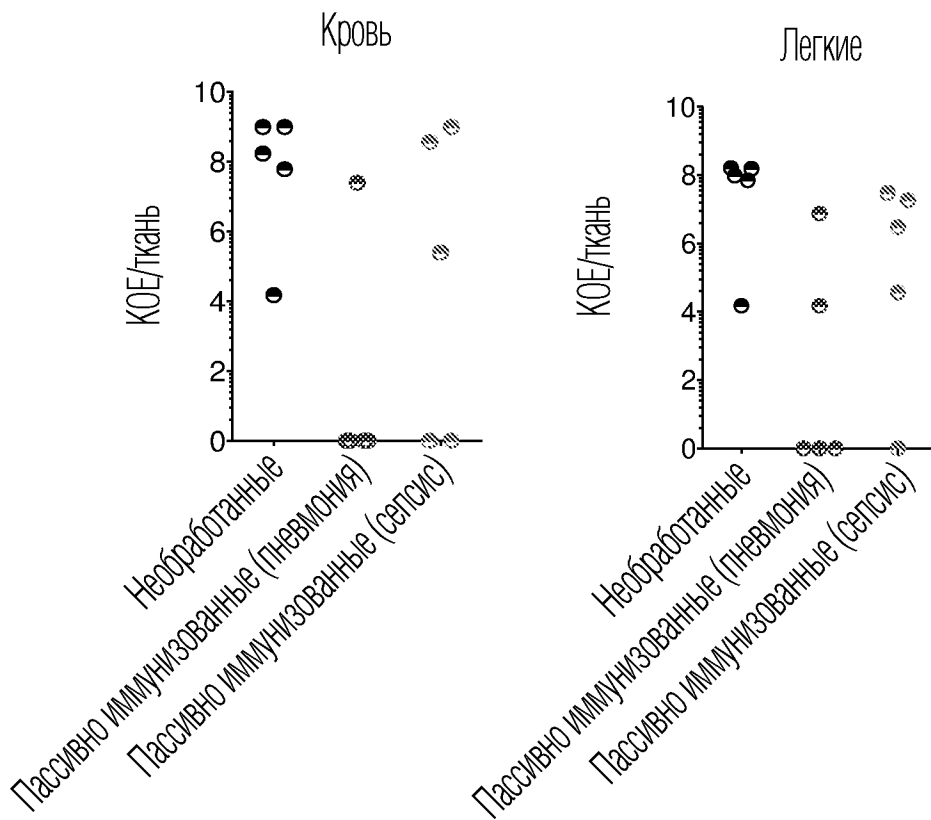
ФИГ. 12В



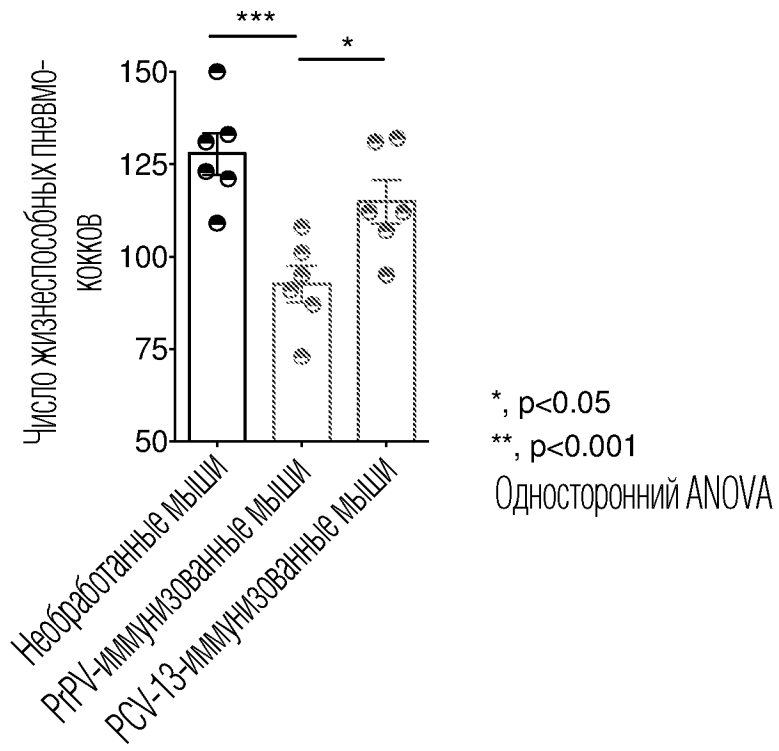
ФИГ. 13А



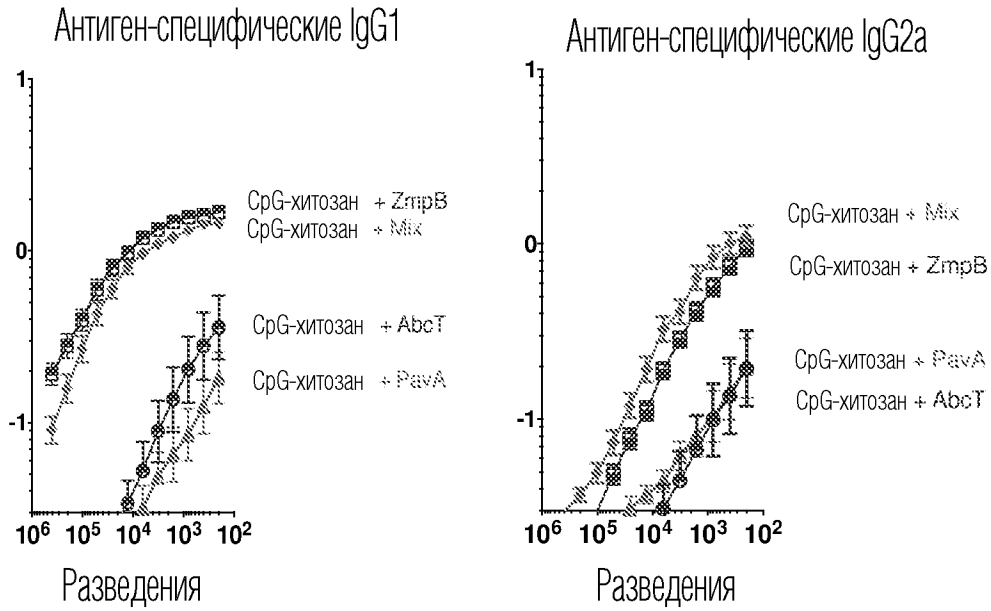
ФИГ. 13В



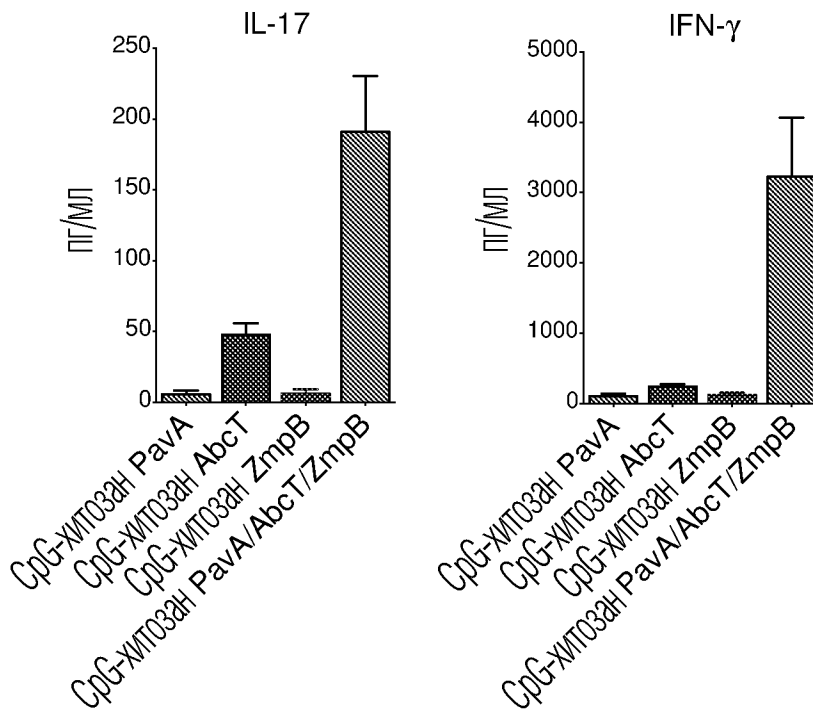
ФИГ. 14



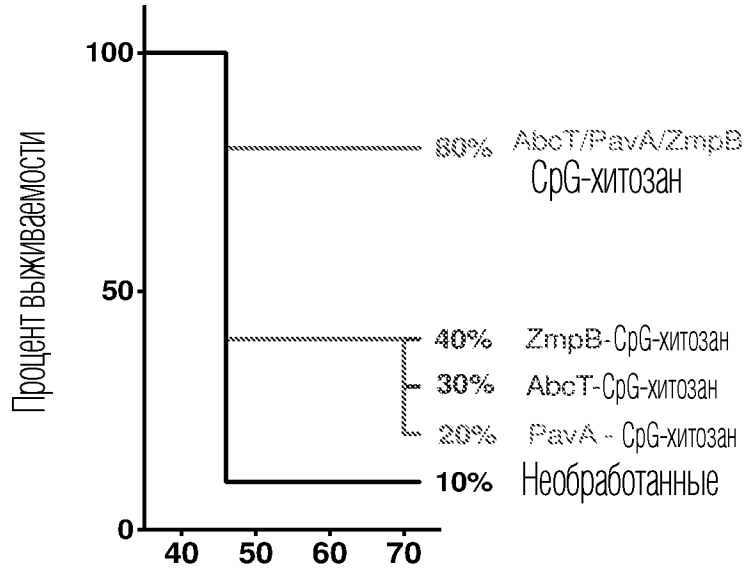
ФИГ. 15А



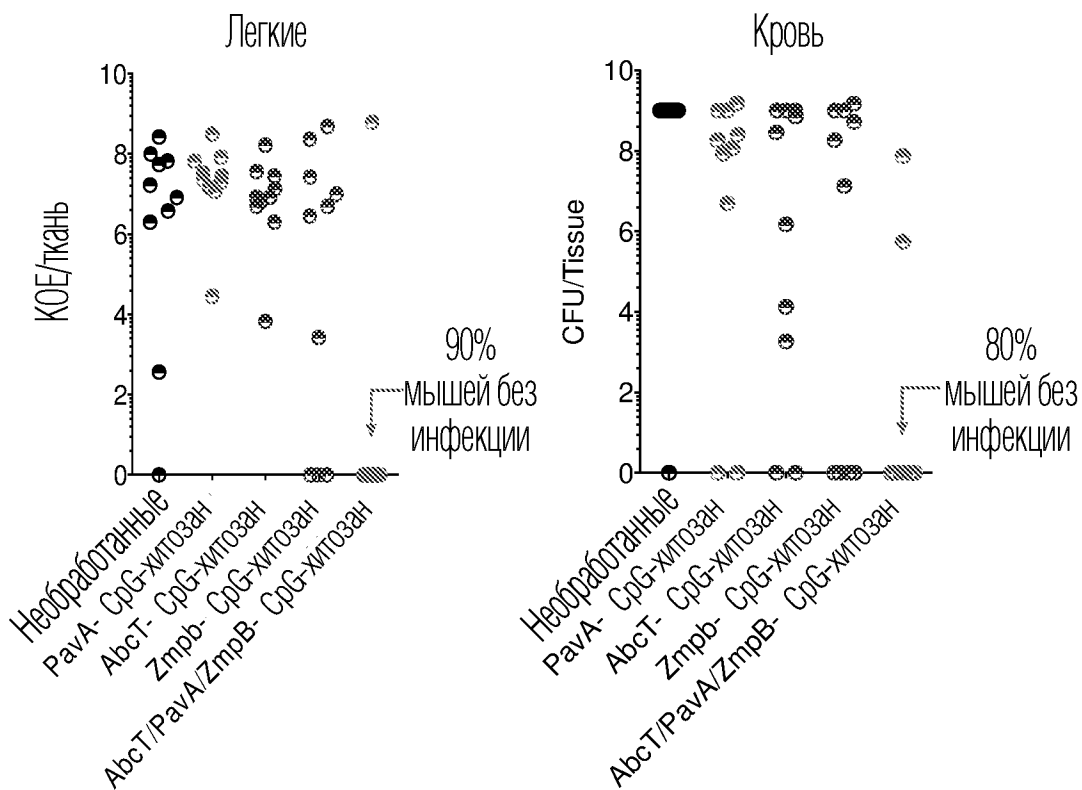
ФИГ. 15В



ФИГ. 16А

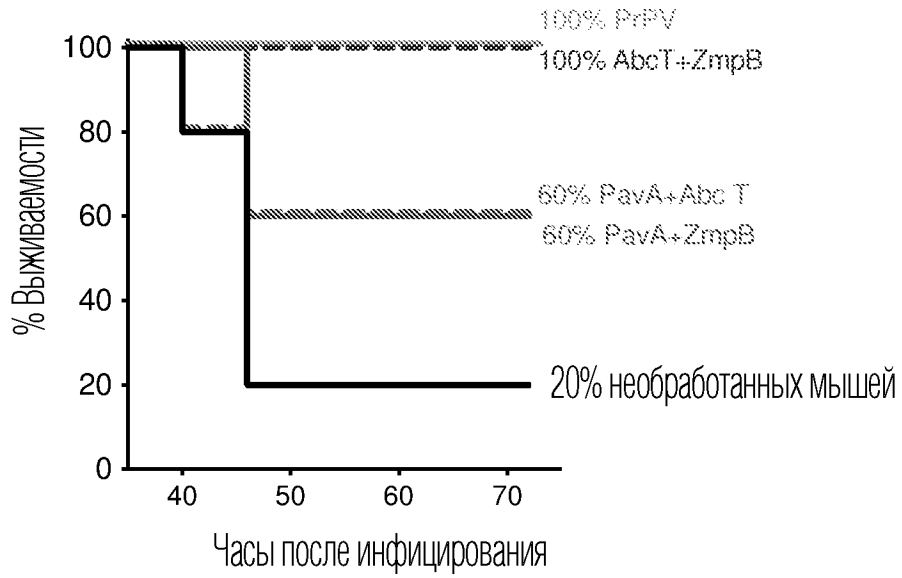


ФИГ. 16В

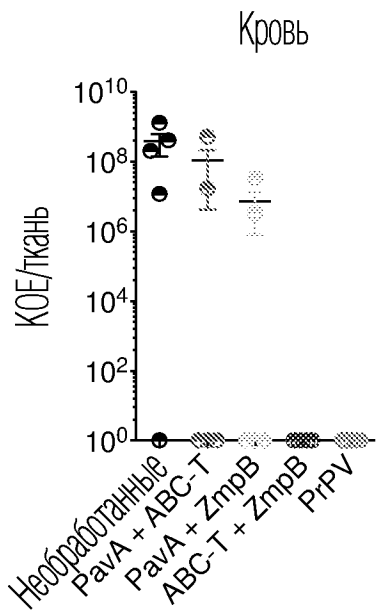


ФИГ. 17

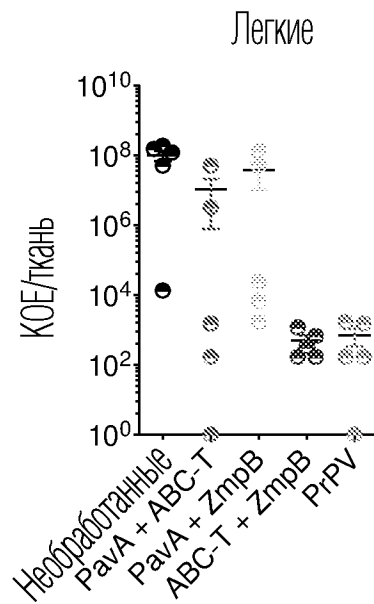
А



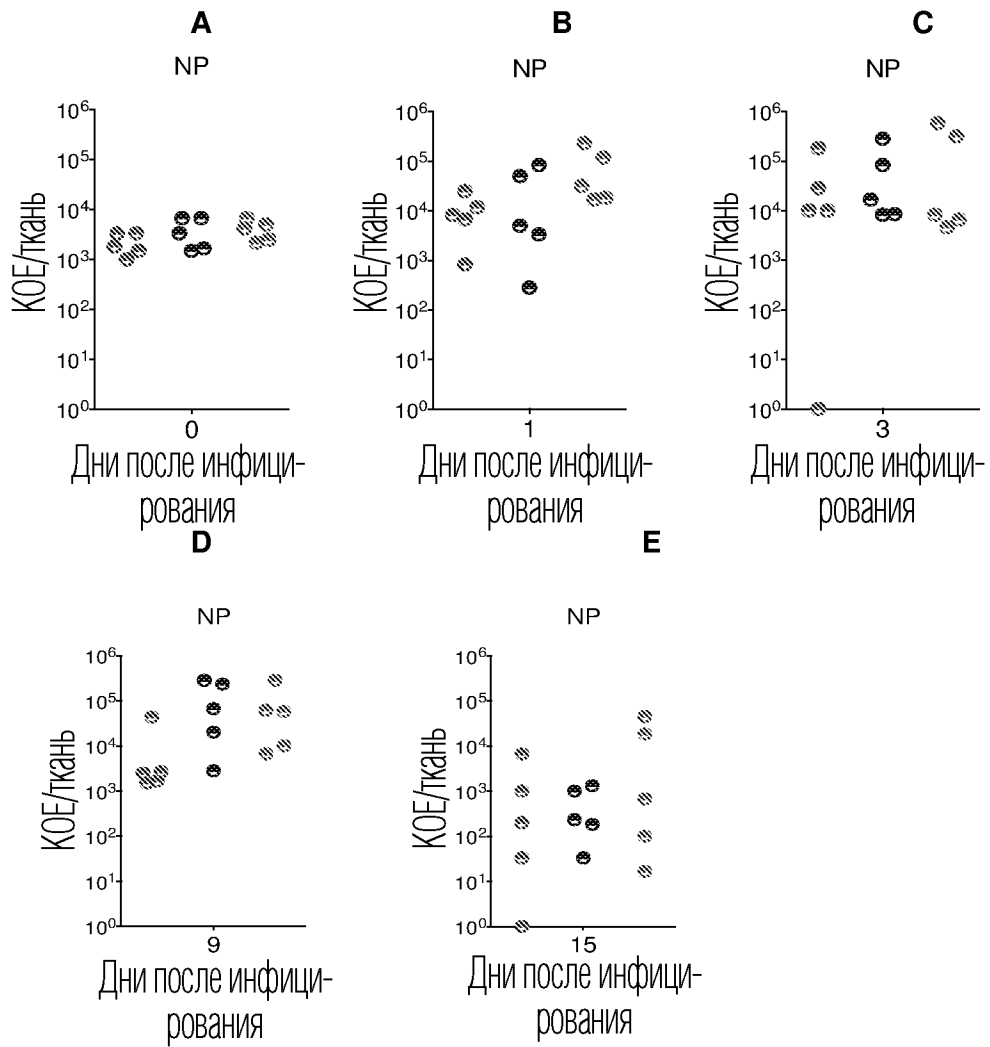
В



С

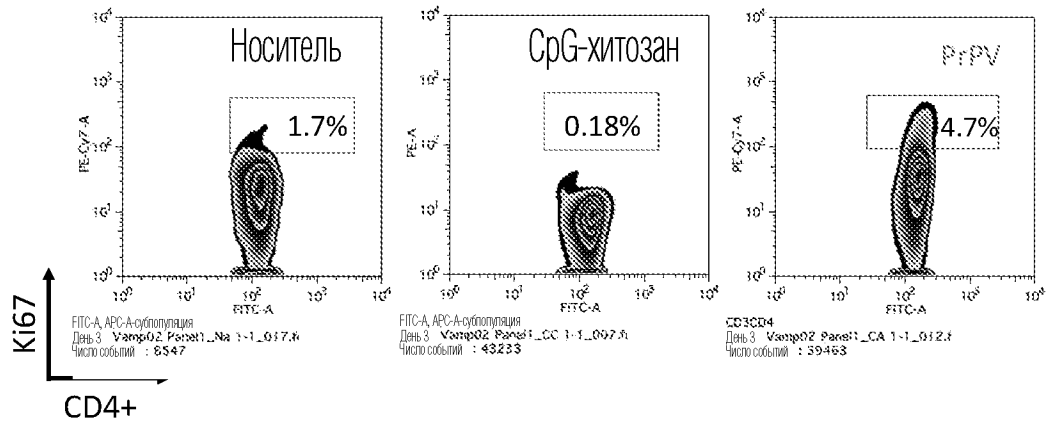


ФИГ. 18

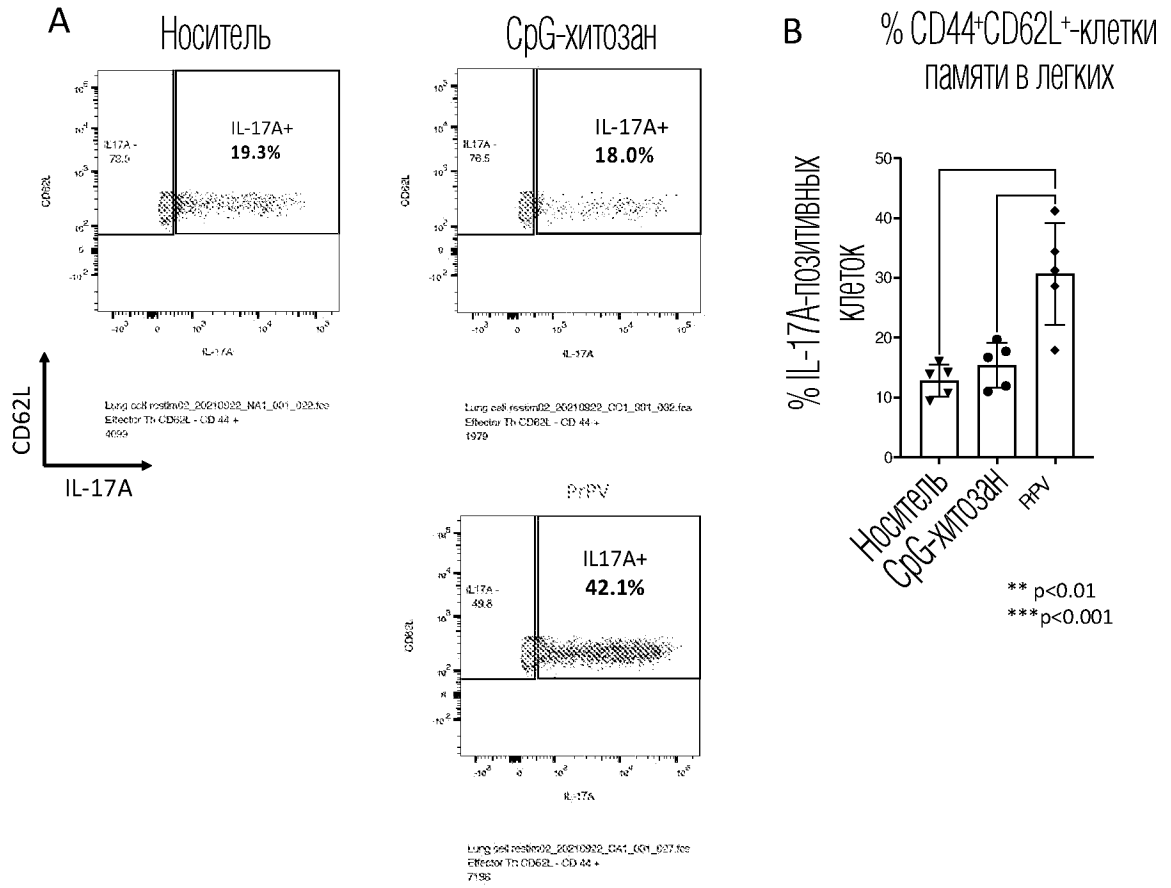


ФИГ. 19

Проллиферирующие CD4+CD3-клетки в лимфоидных тканях

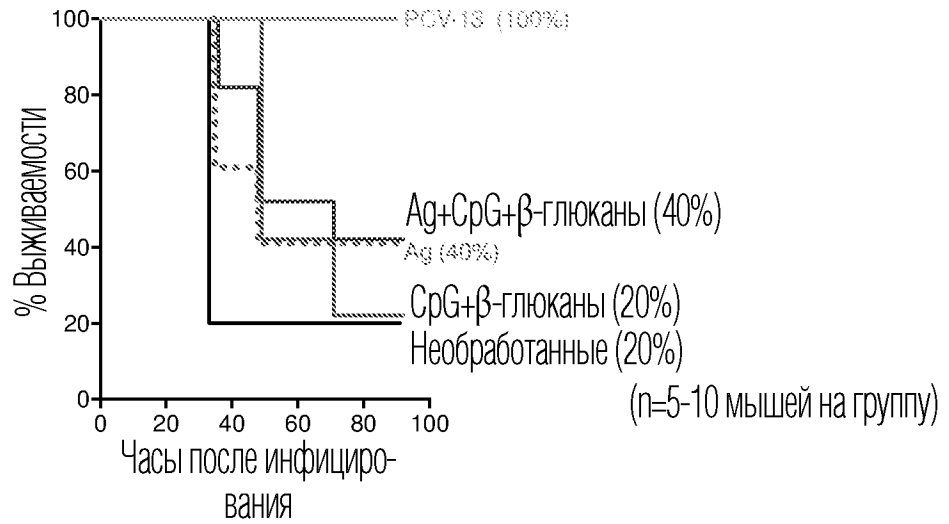


ФИГ. 20

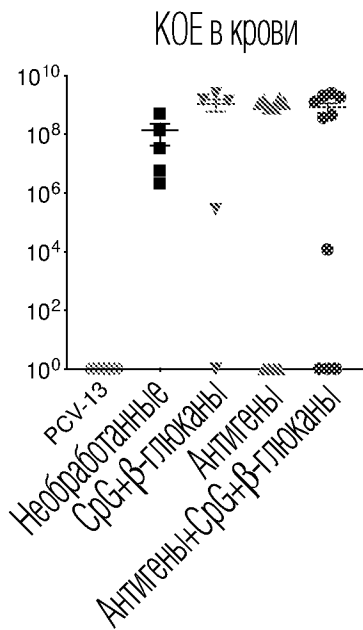


ФИГ. 21

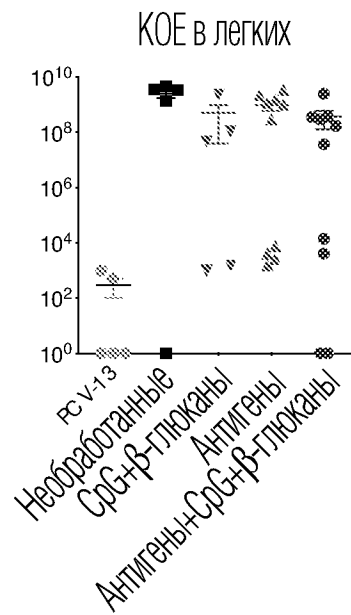
A Заражение пневмококками S1



B



C



ФИГ. 22

AUGGAUUGGCAUUGCGAAAGAAUGGGGCUUUGCGAGCCGCAGCGCGUAUAGC
 CGCGAUUUUCUGGGCGAUGGAAAGCUUUAGCACCUAUUAUUGGCAACCAGUUUA
 CCCGCACCGAAAAACUGCAGACCCAGACCGGCAACGAUAGCAUGAAAUUUAA
 CUAUAACGGCAUUAAGCCAGUUUAGCAGCGUGCGCAACCCGCAGCAGCAGCAGC
 ACCUGGAUAAACUGGGCUUUAAAAGCAGCGGCACCAACCUGAACCCUGCGCU
 AUGCGAACCAACAGCAUUCUGGGCGGAUAGCCUGUUUGGCAUUCAGUAUAACAU
 UAGCGAUAGCCCGAUUGAUAAAUAUGGCUUUAAAGAUUUUAUCAGAAAGAU
 AACCCUGACCCUGUAUGAAAACCAGUAUAGCCUGCCGAUUGCGGUGGGCGAGC
 CAGAGCGUGUAUAACGAUGUGAAAUUUAACGAACAUACCCUGGAUAACCAGG
 CGAGCUUUUCUGAACCCAGCUGGGCGAACGUGAACUUUGAUUAUUUUAGCCCGAU
 UCCGUAUGAAAAAACCGAAAAAAUUGAAAACACCAACGAUCUGAUUAGCGUGA
 CCAGCAGCAGCAACGAAGAUAGCGGCGAUUCAGUAUCAGAUUGAAGUGCCGGA
 AAACAGCCAGGUGUAUCUGAGCUUUUAUAACCUGCAUUUUAGCAACGAUAAA
 CAGAAAAAAGUGGAUUAUUCUGGUGAACGGCGAAAAAAAACCUUUACCACCG
 AUAACGUGUUUAGCUUUUUUAACCUGGGCUAUACCAAAGAAAAAAAACCUUU
 AACAUUAACGUGAGCUUUCCGGGCAACAGCCAGGUGAGCUUUGAAAGCCCGA
 CCUUUUUAUCGCCUGGAUACCAAACCUUUACCGAAGCGAUUCAGAAAAUUAA
 AGAACAGCCGGUGACCGUGAGCACCAGCAAAAACAAGUGUUUUGCGACCUAU
 GAUGUGCAGCAGGAUACCAGCAUUUUUUUUAACCAUUCGGUAUGAUAAAGGCU
 GGAGCGCGUAUCAGGAUGGCAAAAAAAUUGAAAUAACAGGCGCGAGACCGG
 CUUUUAUGAAAGUGGAUUAUCCGAAAGGCGGCGAGCGGC

ФИГ. 23

AUGAGCUUUGAUUGGCUUUUUUCUGCAUCAUUAUUGUGGAAGAACUGCGCAGC
 GAACUGGUGAACGGCCGCAUUCAGAAAAUUAACCAGCCGUUUUGAACAGGAAC
 UGGUGCUGCAGAUUCGCAGCAACCGCCAGAGCCAUCGCCUGCUGCUGAGCG
 CGCAUCCGGUGUUUGGCCGCAUUCAGCUGACCCAGACCACCUUUGAAAACCC
 GGGCGAGCCGAGCACCUUUUAUUAUGGUGCUGCGCAAUAUCUGCAGGGGCGC
 GCUGAUUGAAAGCAUUGAACAGGUGGAAAACGAUCGCAUUGUGGAAAUUACC
 GUGAGCAACAAAAACGAAAUUGGCGAUCAUUAUUCAGGCGACCCUGAUUAUUG
 AAUUAUUGGGCAAACAUAAGCAACAUUCUGCUGGUGGAUAAAAGCAGCCAUA
 AAUUCUGGAAGUGAUUAAACAUGUGGGCUUUAGCCAGAACAGCUAUCGCACC
 CUGCUGCCGGGCGAGCACCUAUUAUUGCGCCGCGGAGCACCAAAGCCUGAAC
 CCGUUUACCAUUAAGAUGAAAAACUGUUUGAAAUUCUGCAGACCCAGGAAC
 UGACCGCGAAAAACCUGCAGAGCCUGUUUCAGGGCCUGGGCCGCGAUACCG
 CGAACGAACUGGAACGCAUUCUGGUGAGCGAAAAACUGAGCGCGUUUCGCAA
 CUUUUUUAACCAGGAAACCAAACCGUGCCUGACCGAAACCAGCUUUAGCCCG
 GUGCCGUUUGCGAACCCAGGUGGGCGAACCGUUUGCGAACCCUGAGCGAUCUG
 CUGGAUACCUAUUAUAAAGAUAAAGCGGAACGCGAUUCGCGUGAAACAGCAGG
 CGAGCGAACUGAUUCGCCGCGUGGAAAACGAACUGCAGAAAAACCGCCAUA
 ACUGAAAAAACAGGAAAAAGAACUGCUGGGCGACCGAUAACGCGGAAGAAUUU
 CGCCAGAAAGGCGAACUGCUGACCACCUUUCUGCAUCAGGUGCCGAACGAUC
 AGGAUCAGGUGAUUCUGGAUAACUAUUAUACCAACCAGCCGAUUAUGAUUGC
 GCUGGAUAAAAGCGCUGACCCCGAACCAAGACGCGCAGCGCUAUUUUAAACGC
 UAUCAGAAACUGAAAGAAGCGGUGAAAUAUCUGACCGAUCUGAUUGAAGAAA

CCAAAGCGACCAUUCUGUAUCUGGAAAGCGUGGAAACCGUGCUGAACCCAGGC
GGGCCUGGAAGAAAUUGCGGAAAUUCGCGAAGAACUGAUUCAGACCGGCUU
UAUUCGCCGCGCCAGCGCGAAAAAAUUCAGAAACGCAAAAAACUGGAACAG
UAUCUGGCGAGCGAUGGCAAAACCAUUAUUUAUGUGGGCCGCAACAACCUGC
AGAACGAAGAACUGACCUUUAAAAUGGCGCGCAAAGAAGAACUGUGGUUUA
UGCGAAAGAUAUUCCGGGCGAGCCAUGUGGUGAUUAGCGGCAACCUUGGAUCC
GAGCGAUGCGGUGAAAACCGAUGCGGCGGAACUGGCGGCGUAUUUUAGCCA
GGGCCGCCUGAGCAACCUUGGUGCAGGUGGAUAUGAUUGAAGUGAAAAACU
GAACAAACCGACCGGCGGCAAACCGGGCUUUGUGACCUAUACCGGCCAGAAA
ACCCUGCGCGUGACCCCGGAUAGCAAAAAAUUGCGAGCAUGAAAAAAGCG
GCAGCGGC

Фиг. 24

AUGGAUAAACUGAAAUAUUAUCAGGGCUAUACCCUGAGCACCACCAUGGUGU
AUGAUCGCGGCGAAGGCGAAGAAACCGAAAAACUGGAAGAUAAACAGAUUCA
GCUGGAUCUGAAAAAGUGGAAAUUAAAAACAUUAAAGAAACCAGCCUGAUGA
ACGUGGAUGCGGAAGGCAACGAAACCGAUAAAAGCCUGCUGAGCGAAAAACC
GACCGAUGUGAGCCAGCUGUAUCUGCGCGUGACCACCCAUGAUAAACAAAGUG
ACCCGCCUGGCGGUGAGCAGCGUGGAAGAAGUGGUGGUGGAUGGCAAAACC
CUGUAUAAAGUGGUGGCGAAAGCGCCGGAUCUGGUGCAGCGCCGCGCGGGAU
GAUACCCUGAGCGAAGAAUUAUGUGCAUUAUUUUGAAAAACAGCUGCCGAAAG
UGAACAAACGUGUAUUUAACUUUAACGAACUGGUGAAAGAUUAGCAGGCGAA
CCCGAUGGGCGAAUUUAACUGGGCGCGGAUCUGAACGCGGUGAACGUGAA
ACCGGCGGGCAAAGCGUAUGUGAUGGCGAAAUUUCGCGGCACCCUGAGCAG
CGUGGAAAACCAUCAGUAUACCAUUCAUAACCUGGAACGCCCGCUGUUUAAC
GAAGCGGAAGGCGCGACCCUGAAAAACUUUAACCUGGGCAACGUGAACAUUA
ACAUGCCGUGGGCGGAUAAAGUGGCGCCGGAUUGGCAACAUGUUUAAAAAAG
CACCCUGGAAAACAUUAAAGUGGUGGGCAGCGUGACCGGCAACAACGAUGUG
ACCGGCGCGGUGAACAAACUGGAUGAAGCGAACAUGCGCAACGUGGCGUUU
AUUGGCAAAAUUAACAGCCUGGGCGAUAAAGGCUGGUGGAGCGGCGGCCUG
GUGAGCGAAAGCUGGCGCAGCAACACCGAUAGCGUGUAUUUUGAUGGCGAU
AUUGUGGGCAACAACAGCAAUUUGGCGGCCUGGUGGCGAAAGUGAACCAU
GGCAGCAACCAGUGGGAUGUGAAACAGAAAGGCCCGCCUGACCAACAGCGUG
GUGAAAGGCACCAUGACCCUGAAAAACCAUUGGCCAGAGCGGGCGGCCUGGUG
CAUGAAAACUAUGAUUGGGGCGUGGUGGAAAACAACAUUAGCAUGAUGAAAG
UGAACAAACGGCGAAAUUAUGUAUGGCAGCGGCAGCAUUGAUGGCGAUCCGU
AUUUUGGCUUUGAUUAUUUUAAAAACAACUAUUAUGUGAAAGAUGUGGCGAC
CGGCGAAAGCACCUAUAAACGCAGCAAACAGAUUCAGAGCAUUAAGCCAGGCG
GAAGCGGAUGCGAAAAUUGCGAACAUUGGGCAUUAACCGCGAACACCUUUUGCGA
UUCAGGAUCCGGUGGUGAACAAACUGAACCGCAUUAUUGAUCGCGAUAGCGA
AUUAUAAAGCGAUUCAGGAUUAUCAGGAAACCCGCAACCUUGGCGUAUCGCAAC
CUGGAAAAACUGCAGCCGUUUUAUAACAAAGAAUGGAUUGUGAACAGGGCA
ACAAACUGACCGAUGAAAGCAACCUUGGUGAAAAAAACCGUGCUGAGCGUGAC
CGGCAUGAAAAGCGGCCAGUUUGUGACCGAUCUGAGCAGCGUGGAUAAAAU
UAUGAUUCAUUAUGCGGAUGGCACCAAGAAGAAUUUGGCGUGAGCGCGAUU
AGCGAUAGCCGCGUGAAACAGGUGAAAGAAUUAACGUGGAUGAUCUGGGC

GUGGUGUAUACCCCGAACAUUGGUGGAUAAAAACCGCGAUAGCCUGAUUACCA
AAGUGAAAGAAAAACUGAGCAGCGUGGCGCUGGAUAGCGCGGAAGUGAAAAG
CAUUACCAACAACCCGCGAGCCUGUAUCUGGAAGAAAGCUUUGCGGAAGUG
CGCGAAACCCUGGAUAAACUGGUGAAAAGCCUGCUGGAAAACGAAGAUCAUC
AGCUGAACAGCGAUGAAGUGGCGGAAAAAGCGCUGCUGAAAAAGUGGAAGA
UAACAAAGCGAAAAUUUUCUGGCGCUGACCUAUCUGAACCGCUAUUAUGGC
AUUGAUUAUGAUGGCCUGAACUUUAAACAUCUGAUGAUGUUUAAACCGGAUU
UUUAUGGCAAACCCCGAGCAUUCUGGAUUUUCUGAUUCGCAUUGGCAGCG
CGGAAAAAACCCUGAAAGGCGAUCGCAGCCUGGAAGCGUAUCGCGAAGUGAU
UGGCGGCACCAUUGGCAAAGGCGAACUGAACGGCCUGCUGGGCUAUAAACAU
GCGCCUGUUUACCAAUAUACCGAUCUGAACGAUUGGUUUUAUUC AUGCGGCG
AAAAACGUGUAUGUGAGCGAACCGGAAACACCACCGAAGAUUUUAAAGUA
AACGCCAUCGCAUUUAUGAUGGCCUGAACAAACGAUGUGCAUGGCCCGCAUGAU
UCUGCCGCUGCUGAACCCUGAAAAAGCGCAUUAUUUUUGUGAUUAGCACCUAU
AACACCAUUGCGUUUAGCAGCUUUGAAAAUAUUGGCAAACACCCGAAGAAGA
ACGCAACGCGUAUAAAGCGGAAAUUGAUCGCGUGGCGAAAGCGCAGCAGCG
CUAUCUGGAUUUUUGGAGCCGCCUGGCGCUGCCGAAAGUGCGCAACCAGCU
GCUGAAAAGCCAGAACAGCGUGCCGACCCCGGUGUGGGUAUACCAGGUGUA
UGUGGGCCUGGGCGGCGCGAACCCGCAUGGGCUAUGGCGAUGGCCGGCCGCG
UGGUGACCCCGGUGCGCGAACUGUUUGGCCCGACCGAUCGCUGGCAUCAGA
UUAACUGGAACAUGGGCGCGAUGGGCGAAAAUUUAUGAACGCCCGUGGAAAGA
UGAUCAGGUGUAUUUUUUGGUGACCAACAUGAUGGAACCGUUUGGCAUUAG
CGCGUUUACCCAUGAAACCACCCAUGUGAACGAUCGCAUGGGCGUAUUUUGGC
GGCGAUUGGCAUCGCGAAGGCACCGAUCUGGAAGCGUUUGCGCAGGGCAUG
CUGCAGACCCCGGAUAAAAGCACCAACCGGCGAAUAUGGCGCGCUGGGCA
UUAACAUGGCGUAUGAACGCAAAAACGAUGGGCGAACAGCUGUAUAACUAUGA
UCCGGAAAAACUGGAUAGCCGCGAAAAAAUUGAUAGCUAUAUGAAAAACUAUA
ACGAAAGCAUGAUGAUGCUGGAUUAUCUGGAAGCGAGCGCGGUGAUUCGCC
AGAACCUGAGCGAUAACAGCAAUUGGUUUUAAAAAAUUGGAUAAAGAAUGGCG
CACCAACGCGGAUCGCAACCGCCUGAUUUGGCGAACCGCAUCAGUGGGUAUAA
CUGCGCGAUCUGACCGAAGAAGAAAAAAACUGCCGAUUGAUAGCAUUGAUA
AACUGGUGGAAAACAACUUUGUGACCCUGCAUGGCAUGCCGAAAAACGGCCG
CUAUCGCACCGAAGGCUUUGAUAGCAGCUAUCAGCCGGUGAACAUGAUGGC
GGGCGUGUUUGGCGGCAACACCAGCAAAGCACCGUGGGCAGCAUUAGCUU
UAAACAUAACGCGUUUCGCAUGUGGGGCUAUUAUGGCUAUGAAAACGGCUUU
AUUCCGUAUGUGAGCAACAACUGAAAGGCGCGGCGAACAAAGAAAACAAAG
GCCUGCUGGGCGAUGAUUUUAUUAUAAAAAAGUGAGCAAAAACAGUUUCA
GAACCUGGAAGAAUGGAAAAACAUUGGUAUCAUGAAGUGUAUGAUAAAGCG
CAGAAAGGCUUUGUGGAAAUUGAAGUGGAUGGCGUGAAAAUUAAGCACCUAUG
CGCAGCUGCAGAGCCUGUUUGAAGAAGCGGUGAGCAAAGAUCUGGCGGGCA
UGGAUGAUAAAAACAUAUAAAACCAUUAUCAGUAUACCGAAAACCCUGAAAUGG
AAAAUUUAUAAACAGCUGCUGAAAAACCCGAUGGCUUUAGCAGCGAUCUGU
UUACCGCGCCGAGGCGGGCAGCGGC