

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047996**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.10

(21) Номер заявки
202392493

(22) Дата подачи заявки
2017.11.10

(51) Int. Cl. **A61K 39/09** (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

**(54) СНИЖЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ ПУТЕМ СНИЖЕНИЯ ТРАНСПОРТА
ФОЛАТА У БАКТЕРИЙ**

(31) 16198361.4

(32) 2016.11.11

(33) EP

(43) 2023.11.07

(62) 201991126; 2017.11.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Ингебригсон Элейна, Нойбауэр
Аксель (US), Смит Хильда Элизабет,
Де Грефф Астрид (NL)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) SMITH HILDE E. ET AL.: "Selection of virulence-associated determinants of Streptococcus suis serotype 2 by in vivo complementation", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 69, no. 3, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 1961-1966, XP002199921, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.69.3.1961-1966.2001 page 1963, left-hand column, paragraph 2 page 1964, right-hand column, paragraph 2 - page 1965, right-hand column, paragraph 1; figures 3,4

GARY B. HENDERSON ET AL.: "The folate and thiamine transport proteins of lactobacillus casei", JOURNAL OF SUPRAMOLECULAR STRUCTURE., vol. 6, no. 2, 1 March 1977 (1977-03-01), pages 239-247, XP055444786, US ISSN: 0091-7419, DOI: 10.1002/jss.400060209 page 240, paragraph 2 page 245, paragraph 2

WO-A2-0005378
CN-A-106085936

(57) Изобретение относится к бактериальным инфекциям, вакцинам против этих инфекций и бактериальным вакцинам. Более конкретно, изобретение относится к вакцинам, направленным против стрептококковых инфекций у свиней. В изобретении предложен мутант Δ FolT бактерии, обладающий сниженной способностью транспортировать фолат, причем указанная способность была снижена путем функционального удаления функции транспортера фолата (FolT). В изобретении также предложен способ снижения вирулентности бактерии, включающий снижение способности указанной бактерии транспортировать фолат.

B1

047996

047996 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к бактериальным штаммам, препаратам, направленным против бактериальных инфекций, и бактериальным вакцинам. Более конкретно, настоящее изобретение относится к вакцинам, направленным против стрептококковых инфекций у свиней.

Уровень техники

Растения, грибы, некоторые простейшие и большинство бактерий вырабатывают фолат (витамин B9) *de novo*, начиная с ГТФ и хоризмата, но у высших животных отсутствуют ключевые ферменты такого синтетического пути и поэтому требуется поступающий с пищей фолат. Фолаты имеют решающее значение для здоровья, а антифолатные препараты широко используются в химиотерапии рака и в качестве противомикробных препаратов. По этим причинам пути синтеза и реутилизации фолата были широко охарактеризованы на модельных организмах, а путь синтеза фолата как у бактерий, так и у растений был сконструирован для повышения содержания фолата в пищевых продуктах. Тетрагидрофолат является важным кофактором для многих биосинтетических ферментов. Он действует как носитель одноуглеродных звеньев в синтезе таких критических метаболитов как метионин, пурины, глицин, пантотенат и тимидилат. Например, фермент кетопантоатгидроксиметилтрансфераза, кодируемая геном *panB*, нуждается в кофакторе тетрагидрофолата для синтеза предшественников пантотената. Поскольку тетрагидрофолат синтезируется *de novo* в бактериях, ингибирование его синтеза убивает клетки. Действительно, два очень эффективных антибиотика, сульфонамид и триметоприм, убивают бактериальные клетки блокируя выработку тетрагидрофолата. Эти два антибиотика, которые часто используются в сочетании друг с другом, обычно назначаются для лечения инфекций мочевыводящих путей, кишечных инфекций, таких как шигеллез, и инфекций дыхательных путей. Успех этих препаратов свидетельствует о чувствительности многих патогенных бактерий к ингибиторам синтеза тетрагидрофолата. Бактерии имеют многостадийный путь синтеза кофактора тетрагидрофолата. В одной ветви этого пути метаболиты хоризмат и глутамин являются субстратами для аминодезоксихоризматсинтазы, кодируемой генами *B. subtilis*, *rabA* и *rabB*, которая продуцирует 4-амино-4-дезоксихоризмат. Аминодезоксихоризматлиаза, кодируемая *rabC* *B. subtilis*, затем превращает 4-амино-4-дезоксихоризмат в важный предшественник парааминобензойную кислоту (ПАВА). В другой ветви ряд ферментов, в том числе энзимы, кодируемые *mtrA*, *folA* и *folK* *B. subtilis*, продуцируют предшественник 2-амино-4-гидрокси-6-гидроксиметил-7,8-дигидроксиптеридиндифосфат. Этот предшественник и ПАВА являются субстратами для дигидроптерат-синтетазы, кодируемой геном *sul* *B. subtilis* (гомологичным генам *dhps* и *folP* *E. coli*), которая продуцирует дигидроптерат. Сульфонамиды, такие как сульфаметоксазол, являются конкурентными ингибиторами дигидроптератсинтазы. Дигидроптерат модифицируется бифункциональным ферментом, кодируемым *folC* *B. subtilis*, с образованием дигидрофолата. Наконец, DHFR (дигидрофолатредуктаза), кодируемая *dhfrA* *B. subtilis*, модифицирует этот дигидрофолат с образованием конечного продукта тетрагидрофолата. Триметоприм является конкурентным ингибитором бактериальных DHFR. Эта селективность является критической, поскольку антибиотик не препятствует эукариотическим DHFR. Скорее всего, фолат необходим для всех секвенированных бактерий, кроме *M. hyorheumoniae*. Однако не все бактерии синтезируют фолат *de novo*, а вместо этого полагаются на внешний источник. Чтобы предсказать отсутствие пути синтеза *de novo*, белки HPPK (*FolK*) и DHPS (*FolP*) используются в качестве сигнатурных белков. Многие бактерии не имеют гомологов обоих этих генов и поэтому почти наверняка полагаются на уменьшение и глутамилирование интактных фолатов, взятых из окружающей среды. В основном это связанные с хозяином бактерии, такие как микоплазма или трепонема, или организмы, которые живут в богатых фолатом средах, такие как лактобациллы.

Виды *Streptococcus*, среди которых существует большое количество вызывающих инфекции у домашних животных и человека, часто группируются по группам Лэнсфилда. Отнесение к определенной группе по Лэнсфилду происходит на основе серологических детерминант или антигенов, которые, среди прочего, присутствуют в капсуле бактерии, и допускает только приблизительное определение, часто бактерии из другой группы проявляют перекрестную реактивность друг с другом, в то время как другие стрептококки не могут быть отнесены к определенной группе вообще. Внутри групп дальнейшая дифференциация часто возможна на основе серотипирования; эти серотипы также способствуют большой антигенной вариабельности стрептококков, что создает множество трудностей в диагностике и вакцинации против стрептококковых инфекций. Стрептококки группы А по Лэнсфилду (*GAS*, *Streptococcus pyogenes*) часто встречаются у детей, вызывая инфекции носоглотки и их осложнения. Стрептококки группы В (*GBS*) представляют собой основную причину бактериального сепсиса и менингита среди новорожденных и становятся значительными патогенами новорожденных в развивающихся странах. Стрептококки группы В по Лэнсфилду (*GBS*) также вызывают мастит у крупного рогатого скота. Инфекции, вызванные представителями группы С по Лэнсфилду, такими как *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. dysgalactiae* и другими, в основном наблюдаются у лошадей, крупного рогатого скота и свиней. Инфекции, вызванные представителями группы D по Лэнсфилду (*S. bovis*), встречаются у всех млекопитающих и некоторых птиц, что иногда приводит к эндокардиту или сепсису. Представители групп E, G, L, P, U и V по Лэнсфилду (*S. porcinus*, *S. canis*, *S. dysgalactiae*) встречаются у различных хозяев, вызывая неонатальные инфекции, инфекции носоглотки или мастит. В группах R, S и T по Лэнсфилду (и среди не отнесен-

ные к группам) обнаружена *S. suis*, которая является важной причиной менингита, сепсиса, артрита и внезапной смерти молодых свиней. Кстати, последняя также может вызвать менингит у человека. Не отнесенные к группам виды *Streptococcus*, такие как *S. mutans*, вызывают кариес у людей, такие как *S. uberis*, вызывают мастит у крупного рогатого скота и, такие как *S. pneumoniae*, вызывают инвазивные заболевания, такие как пневмония, бактериемия и менингит.

Streptococcus suis является зоонозным патогеном, который повсеместно присутствует в популяциях свиней в промышленном свиноводстве. Тридцать три капсульных серотипа были описаны до настоящего времени [1] из которых серотипы 1, 2, 7, 9 и 14 часто изолируются от больных свиней в Европе [2]. Вирулентность штаммов различается между серотипами и внутри них: внутри серотипа 2 были выделены вирулентные, авирулентные, а также слабовирулентные изоляты, которые можно различить на основании экспрессии маркеров вирулентности, белка, высвобождаемого мурамидазой (MRP) и внеклеточного фактора (EF) [3] и суйлизина [4,5]. Носоглоточное носительство *S. suis* у взрослых свиней протекает бессимптомно, тогда как у молодых поросят увеличивается восприимчивость к инвазивному заболеванию, вызванному *S. suis*, что приводит к менингиту, артриту и серозиту, а также к высоким показателям смертности. В западных странах люди, подвергающиеся профессиональному контакту со свиньями или сырой свининой, могут также заразиться *S. suis*, хотя заболеваемость очень низкая. Инвазивная инфекция, вызванная *S. suis*, у людей дает такие же клинические признаки, как у свиней; пациенты часто страдают от глухоты после выздоровления [6]. В Юго-Восточной Азии *S. suis*, в частности серотипа 2, считается новым патогеном для людей и признан основной причиной бактериального менингита [7-10]. Сообщается, что в Юго-Восточной Азии клинические признаки заражения человека *S. suis* более серьезны по сравнению с другими частями мира, у пациентов развивается токсический шокоподобный синдром, сепсис и менингит. Мало что известно о патогенезе заболевания, вызванного *S. suis*. Различные бактериальные компоненты, такие как белки, связанные с внеклеточными и клеточными мембранами, играют роль в патогенезе. Более того, было показано, что капсула является важным фактором вирулентности, позволяющим микроорганизмам противостоять фагоцитозу. Современные стратегии профилактики инфекций, вызванных *S. suis*, у свиней включают антибиотикотерапию больных свиней в сочетании со стратегиями вакцинации аутовакцинами [11]. Хотя аутовакцинация бактериальными вакцинами против бактерий серотипа 2 показала, что она способна снизить количество клинических вспышек на фермах, то же самое нельзя сказать о серотипе 9, от которого аутовакцинация не обеспечивает эффективной защиты [12, 13]. Помимо того факта, что бактериальные вакцины менее эффективны против инфекций, вызванных бактериями серотипа 9, они могут защищать только от бактерий того серотипа, которые присутствуют в вакцине. Однако, как упоминалось ранее, некоторые серотипы могут вызывать заболевание, поэтому аутовакцины являются временным решением клинической вспышки. Для долгосрочного решения проблемы инфекций, вызванных *S. suis*, необходимы вакцины, которые широко защищают от всех (патогенных) серотипов. Было проведено много исследований, чтобы найти подходящих кандидатов для вакцины, однако, пока нет никакой перекрестной вакцины.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложен способ получения бактерии, предпочтительно для использования в вакцине, предпочтительно для использования в вакцине для создания защиты от бактериальной инфекции, включающий выбор родительского бактериального штамма, обычно способного к транспорту фолата и синтезу фолата, и выбор бактерии из этого родительского штамма, которая имеет модификацию, такую как мутация, делеция или вставка, в области ДНК указанной бактерии, кодирующей белок, связывающий субстрат фолата (у *Streptococcus suis* известный как ген *folT*), и отбор указанной бактерии со способностью расти с такой же скоростью, как и указанный родительский штамм *in vitro*, но расти с более низкой скоростью по сравнению с указанным родительским штаммом *in vivo*. В настоящем изобретении также предложен способ получения бактерии, предпочтительно для использования в вакцине, предпочтительно вакцину для использования для создания защиты от бактериальной инфекции, включающий выбор родительского бактериального штамма, обычно способного к транспорту фолатов и синтезу фолатов, и выбор бактерии из этого родительского штамма, которая имеет модификацию, такую как мутация, делеция или вставка, в области ДНК указанной бактерии, кодирующей белок, связывающий субстрат фолата (у *Streptococcus suis* известный как ген *folT*), и отбор указанной бактерии со способностью расти с такой же скоростью, как и указанный родительский штамм *in vitro*, но расти с более низкой скоростью по сравнению с указанным родительским штаммом *in vivo*. В настоящем изобретении также предложена бактерия, бактериальная культура, которую можно получить или полученная способом селекции или трансформации согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, чтобы указанная бактерия, предложенная в настоящем документе, классифицировалась как фирмикут, предпочтительно как *Streptococcus*, более предпочтительно как *Streptococcus suis*. В изобретении также предложена композиция, содержащая бактерию или культуру бактерии, способную расти с такой же скоростью, как указанный родительский штамм *in vitro*, но с более низкой скоростью по сравнению с указанным родительским штаммом *in vivo*. В изобретении также предложено использование такой композиции для производства вакцины.

Предпочтительно, такая вакцинная композиция содержит бактерию или культуру бактерии, спо-

собную расти с такой же скоростью, как указанный родительский штамм *in vitro*, но с более низкой скоростью по сравнению с указанным родительским штаммом *in vivo*.

В изобретении также предложен способ снижения (аттенуирования) вирулентности бактерии, причем указанная бактерия предпочтительно способна синтезировать фолат *de novo*, включающий снижение способности указанной бактерии к транспорту фолата. Авторы настоящего изобретения предлагают бактерию, названную в настоящем документе мутантом Δ FolT, в частности, в настоящем документе предложен штамм *Streptococcus suis*, в котором указанная способность была значительно снижена путем функционального удаления функции транспортера фолата (FolT). Эта бактерия, как предложено в настоящем документе, все еще обладает способностью продуцировать фолат для собственного использования путем применения путей синтеза фолата *de novo*. Интактность этих путей синтеза не влияет на способность к росту *in vitro* (в культуре), однако неожиданно было показано, что рост и вирулентность у хозяина (*in vivo*) значительно снижены. Такой бактериальный штамм, который хорошо растет *in vitro*, но *in vivo* растет меньше, чем его родительский штамм, и имеет значительно сниженную вирулентность *in vivo*, очень полезен в качестве вакцинного штамма. Такой штамм или мутант, предложенный в настоящем изобретении, с одной стороны, по существу, не подвержен влиянию синтеза фолата и, таким образом, может быть выращен до высоких титров и, следовательно, относительно прост и недорог в производстве, в то время как с другой стороны, из-за его сниженного роста и сниженной вирулентностью у его хозяина по сравнению с его родительским штаммом, он является относительно безвредным после применения *in vivo*, что делает его чрезвычайно полезным в качестве вакцины направленной против бактериальной инфекции.

Предложен прототип мутантного штамма Δ FolT с модификацией в области ДНК, кодирующей белок, связывающий субстрат фолата (у *Streptococcus suis* известный как ген folT), и имеющий такой же рост в культуре (*in vitro*), как его родительский штамм, но имеющий сниженный рост *in vivo* в отличие от своего родительского штамма, депонированный как "мутант *Streptococcus suis* Δ FolT CBS 140425" в Centraalbureau voor Schimmelcultures для целей патентной процедуры в соответствии с Регламентом Будапештского договора от 19 августа 2015 г. Предложен другой прототип мутантного штамма Δ FolT с модификацией в области ДНК, кодирующей белок, связывающий субстрат фолата (у *Streptococcus suis* известный как ген folT), и имеющий такой же рост в культуре (*in vitro*), как его родительский штамм, но имеющий сниженный рост *in vivo* в отличие от своего родительского штамма, депонированный как "мутант *Streptococcus suis* Δ FolT2 CBS 143192" в Westerdijk Fungal Biodiversity Institute для целей патентной процедуры в соответствии с Регламентом Будапештского договора от 25 августа 2017 г.

Способность к синтезу фолата *de novo* у бактерии можно легко проверить способами, известными в данной области, такими как тестирование роста бактерии в культуральной среде без фолата по сравнению с культуральной средой с фолатом, или другими методами, рассмотренными в BMC Genomics 2007, 8:245 (doi: 10.1186/1471-2164-8-245, включенным в настоящий документ в качестве ссылки). У большинства бактерий есть по крайней мере два независимых пути получения тетрагидрофолата: один по классическому пути синтеза фолата и один быстрый способ с использованием транспортера фолата для импорта фолата. В настоящем документе термин *in vitro* означает, что имеется достаточное количество питательных веществ и энергии, доступных к использованию в классическом пути синтеза. Не желая быть связанным теорией, но предлагая возможное объяснение эффектов, обнаруженных изобретателями, *in vivo*, когда может быть нехватка питательных веществ и, следовательно, энергии, может быть намного сложнее инвестировать в производство ТГФ, следуя классическому пути. Альтернатива для импорта фолата, очевидно, выбрана далее. Основываясь на продолжающихся экспериментах, мы постулируем, что экспрессия folT является нагрузкой для бактерии, вероятно, из-за высокой гидрофобности. Повышенная экспрессия folT снижает скорость роста *in vitro*. Вероятно, это причина того, почему экспрессия folT так строго регулируется наличием его рибопереклочателя. Он должен экспрессироваться только тогда, когда в этом есть абсолютная необходимость. В заключение следует отметить, что существует баланс между доступностью питательных веществ и потребностью в ТГФ по сравнению с нагрузкой экспрессии белка. В настоящее время авторы настоящего изобретения обнаружили, что этот баланс сдвигается *in vitro* в одну сторону, увеличивая синтез фолата *de novo*, а *in vivo* - в другую сторону, увеличивая транспорт фолата. Неожиданно, что снижение (уменьшение) транспорта фолата в условиях *in vivo*, предпочтительно подавление транспорта фолата в условиях *in vivo* путем функционального удаления функции транспортера фолата, снижает вирулентность бактерии в хозяине, но не в культуре. В предпочтительном варианте осуществления изобретения предложен мутант Δ FolT бактерии, обладающий сниженной способностью транспорта фолата, в котором указанная способность была снижена путем функционального удаления функции транспортера фолата (FolT). В частности, авторы настоящего изобретения предлагают способ снижения (уменьшения) экспрессии и/или функции белка, связывающего субстрат фолата (FolT) у указанной бактерии, в частности, путем обеспечения мутации, делеции или вставки в ген folT указанной бактерии или в промотор указанного гена. Такая мутация, делеция или вставка могут быть обнаружены с помощью ПЦР и/или анализа последовательности, известных в данной области. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу нокаутирования гена folT, значительного ос-

лабления бактерии, такой как *S. suis*, и обеспечения ее пригодности для использования *in vivo* в качестве вакцинного штамма, который еще можно легко культивировать *in vitro*. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу, в котором указанная вирулентность снижена путем обеспечения мутации, делеции или вставки в ДНК указанной бактерии, кодирующей трансмембранную область белка FoIT, связывающего субстрат фолата, предпочтительно оставляя иммуногенность FoIT по существу интактной, наиболее предпочтительно оставляя гидрофильные белковые домены FoIT по существу интактными. В другом варианте осуществления, изобретение относится к способу, в котором указанная вирулентность снижается путем обеспечения мутации, делеции или вставки в области ДНК, кодирующей FoIT, у указанной бактерии, кодирующей область, критическую для связывания субстрата, причем указанная область в *S. suis* характеризуется пептидным доменом, имеющим аминокислотный участок FYRKP. Предпочтительно мутировать по меньшей мере аргинин (R) в участке FYRKP для устранения связывания фолата. В предпочтительном способе изобретения бактерия классифицируется как фирмикут, предпочтительно как *Streptococcus*, более предпочтительно как *Streptococcus suis*. Предпочтительно, чтобы мутант Δ FoIT согласно изобретению обладал способностью синтезировать фолат; интактность этих путей синтеза не влияет на способность к росту *in vitro* (в культуре), однако значительное снижение его вирулентности у хозяина (*in vivo*), что делает его очень подходящим для использования в вакцине. Предпочтительно, чтобы указанный мутант Δ FoIT согласно изобретению имел сниженную (уменьшенную или затрудненную) экспрессию FoIT, например, характеризовался сниженной экспрессией FoIT *per se* или экспрессией варианта белка FoIT со сниженной молекулярной массой, такой как, например, может быть протестирована путем тестирования FoIT-специфических нуклеотидных конструкторов указанного мутанта в исследованиях транскрипции/трансляции *in vitro*, как описано в экспериментальном разделе данного документа. В одном конкретном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к мутанту Δ FoIT согласно изобретению, депонированному как "мутант *Streptococcus suis* Δ FoIT CBS 140425" в Centraalbureau voor Schimmelcultures 19 августа 2015 года. В другом конкретном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к мутанту Δ FoIT согласно изобретению, депонированному как "мутант *Streptococcus suis* Δ FoIT2 CBS 143192" в Westerdijk Fungal Biodiversity Institute 25 августа 2017 года.

В другом конкретном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к мутантному штамму Δ FoIT согласно изобретению. Любой из этих депонированных штаммов может также использоваться для предоставления мутантных нуклеотидных конструкторов Δ FoIT в качестве контрольных конструкторов в исследованиях экспрессии с дополнительными бактериальными мутантами Δ FoIT для изучения экспрессии вариантного гена FoIT или экспрессии белка вариантным геном FoIT. Любой из этих депонированных штаммов также может быть использован для получения мутантной бактериальной культуры Δ FoIT или композиции, содержащей мутантную бактериальную культуру Δ FoIT согласно изобретению. В настоящем изобретении также предложена бактерия со сниженной вирулентностью, которую можно получить или полученная способом, предложенным в настоящем документе, и культура такой бактерии. Также предложена композиция, которая содержит мутантную бактерию Δ FoIT или мутантную культуру Δ FoIT согласно изобретению, и применение такой композиции для производства вакцины. В настоящем изобретении также предложена вакцина, содержащая мутантную бактерию Δ FoIT или мутантную культуру Δ FoIT, согласно настоящему документу. В предпочтительном варианте осуществления предоставлен вакцинный штамм *Streptococcus* или вакцина, включающая мутант Δ FoIT, способный экспрессировать не относящийся к *Streptococcus* белок. Такой мутантный вакцинный штамм-вектор *Streptococcus* Δ FoIT позволяет при использовании в вакцине защищать от патогенных микроорганизмов, отличных от *Streptococcus*. Благодаря своему авирулентному характеру вакцинный штамм *Streptococcus* или мутант Δ FoIT, предложенный в настоящем документе, хорошо подходит для генерации специфических и продолжительных иммунных ответов не только против антигенов стрептококков, но также против других антигенов, экспрессируемых штаммом. Конкретно, антигены, полученные из другого патогена, теперь экспрессируются без вредного воздействия антигена или патогена, который в противном случае был бы вреден для хозяина. Примером такого вектора является вакцинный штамм *Streptococcus* или мутант Δ FoIT, в котором антиген происходит от патогена, такого как *Actinobacillus pleuropneumonia*, *Bordetella*, *Pasteurella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Serpulina* и других. Также предложена вакцина, включающая вакцинный штамм *Streptococcus* или мутант Δ FoIT и фармацевтически приемлемый носитель или адъювант. Носители или адъюванты хорошо известны в данной области; примерами являются забуференный фосфатом физиологический раствор, физиологические солевые растворы, (двойные) эмульсии масло-в-воде, гидроксид алюминия, Спекол, блок- или сополимеры и другие. Вакцина, согласно изобретению, может включать вакцинный штамм либо в инактивированной, либо в живой форме. Например, инактивированная вакцина, включающая штамм, имеющий (сверх) экспрессирующийся стрептококковый или гетерологичный антиген или фактор вирулентности, очень хорошо подходит для вызова иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления предоставлена вакцина, в которой штамм является живым, благодаря своему авирулентному характеру вакцинный штамм *Streptococcus* основан на

мутанте Δ FolT, предложенном в настоящем документе, хорошо подходит для генерации специфических и продолжительных иммунных ответов. Также предоставлен способ борьбы или искоренения стрептококкового заболевания в популяции, включающий вакцинацию субъектов в популяции мутантной вакциной Δ FolT согласно изобретению. В настоящем документе было указано, что *S. suis* имеет оперон, который играет важную роль в патогенезе и/или вирулентности *S. suis*. Оперон кодирует два гена, участвующих в получении фолата и превращении фолата в тетрагидрофолат. Фолат - это общий термин для группы водорастворимых витаминов группы B, где фолат относится к различным производным тетрагидрофолата. Эти производные могут вступать в основной метаболический цикл фолата либо непосредственно, либо после первоначального восстановления и метилирования до тетрагидрофолата. Фолат необходим всем живым организмам, как прокариотам, так и эукариотам, что делает метаболизм фолатов важнейшим процессом. Оперон folT-folC, по-видимому, образует путь получения фолата в условиях ограничения по фолату, как, например, *in vivo*, когда хозяин изолирует фолат для собственного использования. В этих условиях экспрессия оперона folT-folC индуцируется рибопереключателем. Когда уровень фолата падает, тетрагидрофолат высвобождается из рибопереключателя, позволяя ему разворачиваться. Это позволяет инициировать трансляцию путем высвобождения сайта связывания рибосомы. Экспрессия folT-folC позволяет *S. suis* импортировать фолат непосредственно с помощью комплекса транспортера фолата, и последующим превращением фолата в тетрагидрофолат с помощью folC. Поскольку фолат имеет решающее значение для синтеза нуклеотидов, получение фолата оказывает прямое влияние на скорость роста *S. suis*. Снижение темпов роста *in vivo* приводит к снижению вирулентности. Демонстрируя, что изогенные нокаутные мутанты folT, такие как мутант, депонированный как CBS 140425 или как CBS 143192, значительно ослаблены и полезны в качестве вакцины, это обнаружение было дополнительно подтверждено. Оперон действительно участвует в патогенезе *in vivo*. В настоящем изобретении в настоящее время предложены такие мутанты и культуры, а также композиции и вакцины, содержащие такой нокаутный мутантный штамм FolT, обладающий сниженной вирулентностью. В настоящем изобретении также предложена иммуногенная композиция, содержащая бактерию, обладающую такой сниженной вирулентностью, и применение такой композиции для производства вакцины. Кроме того, в настоящем документе предложена вакцина, содержащая бактериальный мутант Δ FolT, такой как мутант, депонированный как CBS 140425 или как CBS 143192, или его культуру, или их композицию. В настоящем изобретении также предложен набор для вакцинации животного, предпочтительно свиньи, против заболевания, связанного с инфекцией, вызванной *Streptococcus suis*, включающий: дозатор для введения вакцины животному, предпочтительно свинье; и мутантный штамм Δ FolT, такой как мутант, депонированный как CBS 140425 или как CBS 143192, согласно изобретению, или его культуру, или их композицию и, в некоторых случаях, листок-вкладыш с инструкцией. В заключение настоящее изобретение предлагает общий способ снижения вирулентности бактерии, включающий снижение способности указанной бактерии транспортировать фолат, причем способ, в частности, применимый, когда указанная бактерия способна синтезировать фолат *de novo*. Способ согласно настоящему изобретению, предлагаемый в настоящем документе, включает отбор бактерии, имеющей функциональный белок, связывающий субстрат фолата, и затем снижение экспрессии и/или функции белка, связывающего субстрат фолата (FolT) в указанной бактерии, в частности, где указанная вирулентность снижается путем обеспечения мутации, делеции или вставки в гене folT указанной бактерии, например, путем обеспечения мутации, делеции или вставки в ДНК указанной бактерии, кодирующей промотор гена folT. В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительно снижать указанную вирулентность путем обеспечения мутации, делеции или вставки в ДНК указанной бактерии, кодирующей трансмембранную область белка FolT, связывающего субстрат фолата. В другом конкретном варианте осуществления указанная вирулентность снижается путем обеспечения мутации, делеции или вставки в области ДНК указанной бактерии, кодирующей FolT, которая кодирует область, критическую для связывания субстрата. Кроме того, в настоящем документе предложен способ получения иммуногенной композиции или вакцины, который применим к бактерии, причем указанная бактерия представляет собой фирмикут, предпочтительно *Streptococcus*, более предпочтительно *Streptococcus suis*, более предпочтительно мутант Δ FolT, депонированный как "мутант *Streptococcus suis* Δ FolT CBS 140425" в Centraal bureau voor Schimmelcultures 19 августа 2015 г., наиболее предпочтительно мутант Δ FolT, депонированный как "мутант *Streptococcus suis* Δ FolT2 CBS 143192" в Westerdijk Fungal Biodiversity Institute 25 августа 2017 года. В настоящем изобретении также предложена бактерия со сниженной вирулентностью, которую можно получить или полученная способом снижения вирулентности путем снижения экспрессии FolT согласно изобретению, и предлагает культуру такой бактерии и композицию, содержащую такую бактерию, обладающую сниженной вирулентностью, или культуру такой бактерии, обладающей сниженной вирулентностью, и иммуногенную композицию, содержащую бактерию, обладающую сниженной вирулентностью, или культуру бактерии, обладающей сниженной вирулентностью, и предлагает использование культуры такой бактерии, обладающей сниженной экспрессией FolT, или композиции бактериальной культуры, имеющей сниженную экспрессию FolT для производства вакцины. В настоящем изобретении также предложена вакцина, содержащая бактерию, обладающую сниженной экспрессией FolT, или культуру бактерии, обладающую

сниженной экспрессией FolT, или содержащую композицию культуры бактерии, обладающую сниженной экспрессией FolT. В настоящем изобретении также предложен набор для вакцинации животного от заболевания, вызванного инфекцией, связанной с конкретной бактерией, экспрессирующей FolT, включающий: а) дозатор для введения вакцины животному и б) изогенный нокаутный штамм (мутант) указанной конкретной бактерии, обладающей сниженной экспрессией FolT, или культуру изогенного нокаутного штамма указанной конкретной бактерии, обладающего сниженной экспрессией FolT, или композицию, содержащую культуру изогенного нокаутного штамма указанной конкретной бактерии, обладающего сниженной экспрессией FolT, и с) в некоторых случаях листок-вкладыш с инструкцией. Такая конкретная бактерия, согласно изобретению, обладающая сниженной экспрессией FolT и обладающая сниженной способностью транспортировать фолат, причем указанная способность была снижена путем функционального удаления функции транспортера фолата (FolT), в общем, имеет хорошие характеристики роста в культуральной среде, в частности когда используется мутант Δ FolT согласно изобретению, обладающий способностью синтезировать фолат; интактность этих путей синтеза не влияет на способность к росту *in vitro* (в культуре), однако значительное снижение его вирулентности у хозяина (*in vivo*) делает его очень подходящим для использования в вакцине.

Описание графических материалов

Фиг. 1. V[10] изображает клон, который был идентифицирован с использованием стратегии комплементации, содержащей две неполные ORF (серовато-синие стрелки) и предполагаемый оперон (фиолетовый), содержащий *orf2*[10] и *folC*[10], которому предшествует предполагаемый промотор оперона (для разъяснения на схеме изображена только последовательность области -35 (TGGACA) предполагаемого промотора). Были созданы конструкторы, которые содержали либо *orf2*[10], либо *folC*[10] (фиолетовый), которым предшествовала предполагаемая область -35 предполагаемой промоторной области оперона (фиолетовый). Был получен конструктор, содержащий *orf2* из штамма S735 (зеленый) с областью -35 предполагаемого промотора S735 (TGGTCA) (зеленый). Тот же конструктор был подвергнут мутагенезу, чтобы содержать область -35 предполагаемой последовательности промотора штамма 10 (TGGACA) (фиолетовый) с образованием *orf2*[S735] [t488a].

Фиг. 2. *In vitro* транскрипция/трансляция FolC и ORF2/FolT. *In vitro* транскрипция/трансляция контрольного конструктора pCOM1 (полоса 1), и конструкторов pCOM1-V[10] (полоса 2) и pCOM1-folC[10] (полоса 3). Маркер молекулярной массы указан в кДа справа. Экспрессия FolC была обнаружена при ожидаемой массе 46,8 кДа (закрашенная стрелка), тогда как экспрессия OR2/FolT была обнаружена при более низкой молекулярной массе, чем ожидалось, 14 кДа (20,5 кДа) (незакрашенная стрелка).

Фиг. 3. Предполагаемый рибопереклюатель для тетрагидрофолата с использованием Rfam. Трехмерное структурирование РНК предполагает наличие рибопереклюателя, в котором два предполагаемых рибосомных сайта связывания (синие стрелки) недоступны для рибосом из-за фолдинга.

Фиг. 4. Clustal W выравнивание нескольких последовательностей FolT. * указывает идентичные аминокислоты, указывает на консервативность между группами значительно схожих свойств, указывает на консервативность между группами незначительно схожих свойств. CB = *Clostridium boltea*, CP = *Clostridium phytofermentans*, AM = *Alkaliphilus metalliredigens*, TT = *Thermoanaerobacter tengcongensis*, EFM = *Enterococcus faecium*, EFS = *Enterococcus faecalis*, LB = *Lactobacillus brevis*, SM = *Streptococcus mutans*, SG = *Streptococcus gallolyticus*, SUB = *Streptococcus uberis*, SSU = *Streptococcus suis* P1/7.

Красным цветом обозначены малые и гидрофобные аминокислоты (в том числе ароматические - Тур), синим обозначены кислые аминокислоты, пурпурным обозначены основные аминокислоты, а зеленым обозначены гидроксил, сульфгидрил, амин и Gly.

Фиг. 5. Метаболизм фолата у *Streptococcus suis*. Схематическое изображение предполагаемого метаболизма фолата у *S. suis*.

Фиг. 6. Уровни экспрессии *orf2* и *folC* у изолятов и мутантов *S. suis* дикого типа. Уровень экспрессии *orf2* и *folC* у изолятов *S. suis* дикого типа штамма 10 (черные столбцы) и S735 (белые столбцы), выросших экспоненциально в бульоне Тодда-Гевитта (панель А), и у штамма S735 с введенной пустой контрольной плазмидой pCOM1 (черные столбцы), с *orf2*[10] (белые столбцы) или с *orf2*[S735] (заштрихованные столбцы), выросшего экспоненциально на бульоне Тодда-Гевитта (панель В). Уровень экспрессии *orf2* у S735 с введенными *orf2*[10], *orf2*[S735] и *orf2*[S735] [t488a] после выращивания в бульоне Тодда-Гевитта до ранней экспоненциальной фазы (EEP) (белые столбцы), экспоненциальной фазы (EP) (малые заштрихованные столбцы), поздней экспоненциальной фазы (LEP) (большие заштрихованные столбцы) и стационарной фазы (SP) (черные столбцы) (панель С). Уровни экспрессии были определены с использованием количественной ПЦР и выражены как относительная экспрессия к конститутивному гену *tesA*. Эксперименты проводились в трех повторностях, столбцы ошибок указывают стандартную ошибку среднего. Значимость определяли по парным t-тестами. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Фиг. 7. Прогнозируемая 3-мерная структура для белка FolT *S. suis*.

Фиг. 8. Температура тела поросят после заражения *S. suis*, эксперимент 1. Изображены усредненные температуры тела поросят ($n = 5$), зараженных штаммом дикого типа 10 (розовым цветом) или штаммом 10 Δ folT (CBS 140425). Столбцы ошибок указывают стандартную ошибку среднего.

Фиг. 9. Бактериemia поросят после заражения *S. suis*, эксперимент 1. Изображены усредненные показатели бактериемии поросят ($n = 5$), зараженных штаммом дикого типа 10 (розовым цветом) или штаммом 10ΔfolT (CBS 140425) (голубым цветом). Столбцы ошибок указывают стандартную ошибку среднего.

Фиг. 10. Кривые выживания свиней, зараженных *S. suis*, эксперимент 1. Свиньи были заражены либо штаммом дикого типа 10, либо штаммом 10ΔfolT (CBS 140425). Свиньи были умерщвлены, когда они достигли predetermined гуманных конечных точек эксперимента по этическим причинам. Статистический анализ был выполнен с использованием Log-рангового критерия (Кокса-Мантеля).

Фиг. 11. Бактериологическое исследование поросят, зараженных *S. suis*, эксперимент 1. Свиньи были заражены либо штаммом дикого типа 10, либо штаммом 10ΔfolT (CBS 140425), бактерии были подсчитаны путем серийного разведения и посева. Количество бактерий рассчитывали как КОЕ/мл. Разными цветами обозначены разные отдельные поросята.

Фиг. 12. Кривые выживания поросят, зараженных *S. suis*, эксперимент 2. Поросята ($n=10$) были заражены либо штаммом дикого типа 10, либо штаммом 10ΔfolT (CBS 140425). Свиньи были умерщвлены, когда они достигли predetermined гуманных конечных точек эксперимента по этическим причинам.

Фиг. 13. Температура тела поросят после заражения *S. suis*, эксперимент 2. Изображены усредненные температуры тела поросят ($n = 10$), зараженных штаммом дикого типа 10 (голубым цветом) или штаммом 10ΔfolT (CBS 140425) (зеленым цветом).

Фиг. 14. Локомоция поросят после заражения *S. suis*, эксперимент 2. Показан процент положительных наблюдений у поросят, зараженных штаммом дикого типа 10 (голубым цветом) или штаммом 10ΔfolT (CBS 140425). Тяжесть локомоции: 1 - легкая хромота, 2 - умеренная хромота или отказ стоять, 3 - тяжелая хромота (выступает в качестве гуманной конечной точкой эксперимента).

Фиг. 15. Осознанность поросят после заражения *S. suis*, эксперимент 2. Показан процент положительных наблюдений у поросят, зараженных штаммом дикого типа 10 (голубым цветом) или штаммом 10ΔfolT (CBS 140425). Выраженность осознанности: 1: депрессия, 2: апатия, 3: кома.

Фиг. 16. Вакцинация свиней штаммом ΔfolT 2 (CBS 143192) и защита после заражения с *S. suis* тип 2. Свиньи были вакцинированы в день 1 и 21 штаммом ΔfolT2 (CBS 143192). На 35-й день животных заражали внутрибрюшинно (ip) вирулентным изолятом *S. suis* типа 2 в количестве примерно 2×10^9 КОЕ. В течение семи дней после заражения животных осматривали на признаки заболевания, вызванного *S. suis*. Животных, найденных мертвыми или которые должны были быть подвергнуты эвтаназии перед выбыванием из испытания по причинам, связанным с благополучием животных, подвергали вскрытию. На фигуре показан процент животных, которые умерли или были умерщвлены после заражения (смертность).

Фиг. 17. Вакцинация свиней штаммом ΔfolT (CSB 140425) и защита после заражения с *S. suis* тип 2. Свиньи были вакцинированы в день 1 и 21 ΔfolT штаммом (CBS 140425). На 36-й день животных заражали внутрибрюшинно (ip) вирулентным изолятом *S. suis* типа 2 в количестве примерно 2×10^9 КОЕ. В течение семи дней после заражения животных осматривали на признаки заболевания, вызванного *S. suis*. Животных, найденных мертвыми или которые должны были быть подвергнуты эвтаназии перед выбыванием из испытания по причинам, связанным с благополучием животных, подвергали вскрытию. На фигуре показан процент животных, которые умерли или были умерщвлены после заражения (смертность).

Подробное описание изобретения

Область применения.

Ранее мы использовали стратегию комплементации для выявления новых факторов вирулентности, которые могут служить кандидатами для вакцины. Используя эту стратегию, был создан гипервирулентный изолят *S. suis* (S735-pCOM1-V[10]), который вызывает тяжелый токсический шокоподобный синдром у поросят после инфицирования, приводящий к смерти в течение 24 ч после заражения [14]. S735-pCOM1-V[10] был выбран из библиотеки клонов, полученных из слабовирулентного изолята (S735) серотипа 2, после трансформации плазмидной ДНК, выделенной из примерно 30000 объединенных клонов, несущих случайно клонированные фрагменты геномной ДНК из вирулентного изолята серотипа 2 (штамм 10). Изоляты с повышенной вирулентностью отбирали путем инфицирования поросят штаммом S735, содержащим плазмидную библиотеку геномных фрагментов из штамма 10. Один преобладающий клон, выделенный из зараженных поросят, содержал геномный фрагмент размером 3 т.п.н. из штамма 10, обозначенного V[10], и в последующих экспериментах на животных было продемонстрировано, что он является гипервирулентным. V[10] содержал неполную открытую рамку считывания (ORF), с последующими двумя генами (orf2 и folC) в структуре оперона, а также вторая неполная ORF. Предполагая, что только полноразмерные ORF могут способствовать гипервирулентности этого изолята, мы дополнительно охарактеризовали orf2-folC-оперон. Первая ORF в опероне не может быть аннотирована и обозначена как orf2, вторая ORF в опероне показала гомологию с геном, кодирующим полифосфатполиглютаматсинтазу (FolC). Этот оперон присутствовал во всех серотипах *S. suis*, включая родительский штамм S735. Штамм S735 с низкой вирулентностью содержал несколько однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в orf2-folC и некодирующих областях по сравнению со штаммом 10. Оба гена оперона, которые

повышают вирулентность, могут быть предполагаемыми факторами вирулентности и, если это так, могут быть предполагаемыми кандидатами для вакцины. Мы исследовали 1) вызвана ли гипервирулентность *orf2*-*folC*-оперона *orf2* или *folC*, или обоими, и 2) влияет ли однонуклеотидный полиморфизм в промоторной области *orf2*-*folC*-оперона на вирулентность.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды.

S. suis изоляты выращивали в бульоне Годда-Гевитта (Оксфорд, Лондон, Великобритания) и высевали на чашки с колумбийским кровавым агаром (Оксфорд), содержащим 6% (об./об.) крови лошади. *Escherichia coli* выращивали в бульоне Лурия и высевали на чашки с бульоном Лурия, содержащим 1,5 % (мас./об.) агара. При необходимости добавляли эритромицин в количестве 1 мкг мл⁻¹ для *S. suis* и в количестве 200 мкг мл⁻¹ для *E. coli*. Штамм *S. suis* S735 с введенной плазмидой, содержащей геномный фрагмент размером 3 т.п.н., полученный из штамма 10 (S735-*pCOM1-V*[10]), и другой штамм *S. suis*, используемые в этом исследовании, были ранее описаны [14] (фиг. 1).

Пример 1. Комплементация штамма *S. suis* S735.

В штамм S735 была введена плазида *pCOM1*, содержащая одну из двух ORF в опероне V[10] (т.е. *orf2*[10] или *folC*[10]), которым предшествовала предполагаемая промоторная область оперона из штамма 10 или плазида *pCOM1*, содержащая *orf2*, и родственный промотор из штамма S735 (*orf2*[S735]), расположенный в обратном направлении (фиг. 1). Для конструирования этих плазмид были разработаны праймеры с сайтами рестрикции для амплификации *orf2*[10] или *orf2*[S735] (*comE1* - *comE2*), *folC*[10] (*comE4* - *comE6*) или область промотора оперона (*comE1* - *comE3*) (табл. 1). Полученные продукты ПЦР *orf2*[10] и *orf2*[S735] были разрезаны с использованием ферментов рестрикции *SacI* и *VamHI*, клонированы в *pKUN19* [15], и разрезаны теми же ферментами рестрикции с последующим клонированием в *pCOM1*, с получением *pCOM1-orf2*[10] и *pCOM1-orf2*[S735], соответственно. ПЦР-ампикон *folC*[10] был разрезан с использованием ферментов рестрикции *SmaI* и *VamHI* и клонирован в *pKUN19*, разрезанную с помощью тех же ферментов рестрикции. Продукт ПЦР, содержащий промоторную область V[10], был клонирован перед *folC*[10] используя ферменты рестрикции *SacI* и *SmaI*. Впоследствии полный фрагмент промотора V[10] - *folC*[10] был вырезан из *pKUN19* с помощью *SacI* и *VamHI* и клонирован в *pCOM1* разрезанную теми же ферментами рестрикции, с получением *pCOM1-folC*[10]. Чтобы подтвердить, что продукт слияния промотора-*folC*[10] транскрибируются, транскрипцию/трансляцию *in vitro* проводили с использованием ³⁵S-метионина. Был обнаружен четкий бэнд молекулярной массы *FolC* (46,8 кДа), что демонстрирует, что продукт слияния может быть экспрессирован и транслирован (фиг. 2). Все плазмиды вводили в штамм *S. suis* S735 путем электропорации. К тому же, *pCOM1-V*[10] вводили в авирулентный штамм T15 серотипа 2 путем электропорации с получением T15-*pCOM1-V*[10].

Пример 2. Экспериментальное заражение трансфицированными изолятами.

Экспериментальное заражение поросят-гнотобионтов, рожденных с помощью кесарева сечения, проводили, как описано ранее [14]. До заражения подтверждался статус гнотобионтов поросят путем посева мазков с миндалин на чашки с колумбийским кровавым агаром, содержащим 6% лошадиной крови. Кратко, 4 или 5 однедельных свиной-гнотобионтов были заражены внутривенно 10⁶ колониеобразующими единицами (КОЕ) *S. suis*, а затем им немедленно перорально вводили 40 мг кг⁻¹ массы тела эритромицина (эритромицин-стеарат, Эбботт Б.В., Амстелвен, Нидерланды) два раза в день, чтобы поддерживать избирательное давление на изоляты *S. suis*, несущие плазмиды *pCOM*. Зараженных свиней подвергали мониторингу два раза в день на предмет клинических признаков и брали мазки с миндалин для бактериологического анализа. Свины подвергались эвтаназии, когда у них наблюдались клинические признаки артрита, менингита или сепсиса после заражения *S. suis*. Образцы тканей ЦНС, серозной оболочки и суставов собирали во время вскрытия, гомогенизировали и определяли количество бактериальных клеток путем посева серийных разведений на чашки с колумбийским кровавым агаром, содержащим 6% лошадиной крови и 1 мкг мл⁻¹ эритромицина. Чтобы иметь возможность сравнивать результаты различных экспериментов на животных, включенных в данный документ, для всех экспериментов на животных применяли равномерную оценку неспецифических и специфических симптомов. Неспецифические симптомы включали в себя отсутствие аппетита и депрессию, которые были оценены как 0 (нет), как 0,5 (умеренное отсутствие аппетита/ депрессия) или как 1 (сильное отсутствие аппетита/ депрессия). Специфические симптомы включали хромоту, симптомы центральной нервной системы (ЦНС) (двигательные расстройства, такие как езда на велосипеде или хождение по кругу; опистотонус; нистагм), а также приподнятые волосы, выгнутую спину (кифоз) и дрожь, поскольку все это симптомы сепсиса или серозита. На основании этих осмотров были рассчитаны клинические показатели путем деления числа осмотров, в которых наблюдались специфические или неспецифические симптомы, на общее количество осмотров по этому параметру. Этот параметр представляет собой процент осмотров, в которых наблюдались специфические или неспецифические симптомы. Аналогичный подход был принят для показателя "Индекса лихорадки". Лихорадка определялась как температура тела > 40°C. Показатель "Среднее количество дней до смерти" использовалось в качестве параметра выживания. Хотя животные были умерщвлены после достижения гуманных конечных точек эксперимента (НЕР), время между заражением и достижением НЕР все еще свидетельствует о степени тяжести инфекции. Он рассчитывается путем усред-

нения показателя выживания в днях от заражения до смерти.

Эксперименты на животных со штаммом CBS 140425 проводились в помещениях Центрального ветеринарного института Вагенингена УР, Лелистад, Нидерланды (ныне биоветеринарных исследований Вагенингена (WBVR)) и были одобрены этическим комитетом Центрального ветеринарного института Вагенингена УР, Лелистад, Нидерланды, в соответствии с голландским законом об экспериментах на животных (№ 809.47126.04/00/01 и № 870.47126.04/01/01). Эксперименты на животных со штаммами CBS 140425 и 143192 были также выполнены в соответствии с законом США об экспериментах на животных.

Статистический анализ был выполнен по клиническим показателям групп (индекс лихорадки, специфические симптомы и неспецифические симптомы) с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллиса, поскольку не было однородности дисперсии между группами. В последующих анализах все группы сравнивали попарно с контрольной группой (S735-pCOM1) по всем трем параметрам, используя U-тесты Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Расчеты были выполнены с использованием SPSS 19 (ИВМ, Нью-Йорк, США).

Пример 3. Экспериментальное заражение штаммом 10ΔfolT (CBS 140425), эксперимент 1.

Десять четырехнедельных поросят содержали в помещении для животных CVI в двух группах по пять животных. Поросята имели свободный доступ к корму и пресной воде. В течение всего эксперимента животные получали тепло и игровой материал. Перед началом эксперимента мазки с миндалин у поросят подвергали скринингу с помощью ПЦР на колонизацию *S. suis* серотипа 2. Только ПЦР-отрицательные поросята были включены в эксперимент. Через десять дней животные были заражены внутривенно штаммом дикого типа 10 в количестве $1,1 \cdot 10^6$ КОЕ или мутантным штаммом 10ΔfolT в количестве $9,2 \cdot 10^5$ КОЕ в яремную вену. До заражения показатели базальной температуры у поросят ежедневно контролировали в течение трех дней. Кровь с ЭДТА собирали до заражения, чтобы получить образцы плазмы перед заражением, а также базальные уровни лейкоцитов (WBC). Зараженные свиньи подвергались мониторингу по клиническим признакам три раза в день в 20:00, 3:00 и 9:00. К неспецифическим симптомам относились отсутствие аппетита и депрессия, в то время как специфические симптомы включали хромоту, симптомы центральной нервной системы (ЦНС) (двигательные расстройства, такие как езда на велосипеде или хождение по кругу; опистотонус; нистагм), а также приподнятые волосы, выгнутую спину (кифоз) и дрожь, поскольку все это симптомы сепсиса или серозита. Собирали мазки с миндалин и фекальные мазки ежедневно для бактериологического анализа. Кровь собирали ежедневно для бактериологического анализа, подсчета лейкоцитов и сбора плазмы. Свиньи подвергались эвтаназии, когда у них наблюдались клинические признаки артрита, менингита или сепсиса после заражения *S. suis*. При вскрытии внутренние органы (почки, печень, селезенка, брюшина и перикард) подвергали бактериологическому скринингу на *S. suis* путем посева на чашки с колумбийским кровяным агаром, содержащим 6% лошадиной крови. Органы, которые были макроскопически затронуты *S. suis*, например, гнойные суставы, перикардит или перитонит, высевали в серийном разведении для определения бактериальной нагрузки. Образцы тканей этих органов фиксировали в формалине для гистологического исследования. Эксперимент на животных был одобрен этическим комитетом Центрального ветеринарного института Вагенингена УР, Лелистад, Нидерланды, в соответствии с голландским законом об экспериментах на животных (#2014011).

Пример 4. Экспериментальное заражение штаммом 10ΔfolT (CBS 140425), эксперимент 2.

Во втором эксперименте использовались поросята коммерческой породы в возрасте примерно 3 недели. Поросята не были вакцинированы против *S. suis*, были получены из PRRSV-отрицательного стада, никогда не получали лекарственного корма и при регистрации имели отрицательный мазок с миндалин на *S. suis* серотипа 2 с помощью ПЦР. Обрабатываемые группы (по 10 поросят в каждой) содержались отдельно. Животные были заражены внутривенно $3,48E+07$ КОЕ штамма дикого типа 10 или $1,45E+07$ мутантного штамма 10ΔfolT. Животных осматривали один раз в день на наличие клинических признаков заболевания, ассоциированного с *S. suis* (например, повышение температуры тела, хромота и изменения в поведении) в течение 7 дней. Любые животные, имеющие клинические признаки, которые достигли гуманных конечных точек эксперимента (например, симптомы ЦНС, изнурительная хромота), были умерщвлены, чтобы минимизировать страдания. Усыпленных животных вскрывали для выявления поражений, типично связанных с заболеванием, вызванным *S. suis*. Животные, дожившие до конца периода наблюдения, были также умерщвлены и вскрыты.

Пример 5а. Вакцинация свиней штаммом ΔfolT2 (CBS 143192) и защита после заражения *S. suis* типа 2. Исследование проводилось на свиньях коммерческой породы; в день первой вакцинации свиньи были в возрасте 21 ± 7 дней. Животные, которых не вакцинировали против *S. suis*, с отрицательными мазками с миндалин на *S. suis* типа 2 по ПЦР, PRRSV-отрицательные по серологии, были потомством свиноматок, у которых мазок с миндалин был отрицательным на *S. suis* типа 2 по ПЦР. Группы исследования, пути и дозы вакцинации, дни вакцинации, а также день и путь заражения указаны в табл. 6. Используемые среды описаны в табл. 7.

На 34-й день у всех животных были собраны мазки крови и мазки с миндалин, а затем животные

строгого контроля были перемещены в отдельное помещение с отдельной подачей воздуха, в то время как все другие группы были объединены. На 35-й день животных заражали внутрибрюшинно (ip) вирулентным изолятом *S. suis* типа 2 в количестве примерно 2×10^9 КОЕ.

В течение семи дней после заражения животных осматривали на признаки заболевания, вызванного *S. suis*. Животных, найденных мертвыми или которые должны были быть подвергнуты эвтаназии перед выбыванием из испытания по причинам, связанным с благополучием животных, подвергали вскрытию. Во время вскрытия животных оценивали по макроскопическим признакам, обычно связанным с заболеванием, вызванным *S. suis* и ЦНС (то есть мозг), и собирали образцы суставов. Выбывшие из испытания все оставшиеся животные были умерщвлены, вскрыты и образцы были собраны.

Приготовление вакцин и плацебо указаны в табл. 7.

Приготовление контрольного материала указано в табл. 8.

Вакцинация мутантом *S. suis* Δ FoIT снизила количество животных, которые умерли или должны были быть подвергнуты эвтаназии по соображениям благополучия животных в течение периода наблюдения после заражения (см. табл. 9 и фиг. 16). Кроме того, вакцинация Δ FoIT уменьшила проявления тяжелой хромоты (то есть количества животных, которые не могут стоять или не хотят стоять), а также проявление апатии, при которой животные проявляли очень ограниченный интерес к окружающей среде (см. табл. 10 и 11).

Во время вскрытия признаки воспаления в головном мозге, на которые указывает присутствие фибрина и/или жидкости, реже наблюдались у животных, вакцинированных Δ FoIT, по сравнению с отрицательными контролями (см. табл. 12).

Изолят заражения *S. suis* реже обнаруживали в образцах головного мозга и суставов, собранных при вскрытии у животных, вакцинированных штаммом Δ FoIT, по сравнению с отрицательными контролями (см. табл. 13 и 14).

Пример 5b. Вакцинация свиней штаммом 10 Δ foIT (CBS 140425) и защита после заражения *S. suis* тип 2.

Исследование проводилось на свиньях коммерческой породы, в возрасте 21 +/- 5 дней на день первой вакцинации. Животные, которых не вакцинировали против *S. suis*, с отрицательными мазками с миндалин на *S. suis* типа 2 по ПЦР, PRRSV-отрицательные по серологии, были потомством свиноматок, у которых мазок с миндалин был отрицательным на *S. suis* типа 2 по ПЦР. Группы исследования, количество животных/группа на момент начала исследования, доза вакцинации, дни вакцинации, путь вакцинации, день заражения и путь заражения указаны в табл. 15.

На 35-й день у всех животных были собраны мазки крови и мазки с миндалин, а животных строгого контроля умерщвляли. На 36-й день животных заражали внутрибрюшинно (ip) вирулентным изолятом *S. suis* типа 2 в количестве примерно 2×10^9 КОЕ.

В течение семи дней после заражения животных осматривали на признаки заболевания, вызванного *S. suis*. Животных, найденных мертвыми или которые должны были быть подвергнуты эвтаназии перед выбыванием из испытания по причинам, связанным с благополучием животных, подвергали вскрытию. Во время вскрытия животных оценивали по макроскопическим признакам, обычно связанным с заболеванием, вызванным *S. suis*, и собирали образцы ЦНС. Выбывшие из испытания все оставшиеся животные были умерщвлены, вскрыты и образцы были собраны.

Приготовление вакцины и плацебо указаны в табл. 16. Приготовление зараженного материала указано в табл. 17.

Мутант *S. suis* FoIT уменьшал количество животных, проявляющих хромоту после заражения, количество животных, проявляющих ненормальное поведение (т.е. депрессию, кому) после заражения, а также количество животных, которые умерли или должны были быть подвергнуты эвтаназии по причинам благополучия животных в период наблюдения после заражения (см. табл. 18, 19 и 20 и фиг. 17).

У выбывших из испытания (т.е. на 7-й день после заражения или после удаления из исследования в связи со смертью или эвтаназией) животных были обнаружены отклонения от нормы в мозге (например, фибрин, жидкость), а также в грудной полости (например, фибрин, жидкость, застой в легких, пневмония). Кроме того, были собраны образцы мозга для восстановления *S. suis*. Результаты указаны в табл. 21, 22 и 23.

Пример 6. Синтез кДНК и количественная ПЦР.
ПЦР-РВ.

Двести нг РНК использовали для синтеза кДНК в реакции, содержащей 25 нг·мкл⁻¹ случайных праймеров (Promega, Мэдисон, Висконсин, США), 10 мМ дНТФ (Promega), 10 мМ ДТТ (Invitrogen), 40 единиц ингибитора РНКазы RNAsin (Promega) и обратной транскриптазы SuperScriptII (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя.

Количественная ПЦР.

кДНК разводили в 20 раз для анализа количественной ПЦР. Праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения PrimerExpress (Прикладные биосистемы, Фостер Сити, Калифорния, США) (табл. 1). Каждая реакция содержала 12,5 пмоль прямого праймера, 12,5 пмоль обратного

праймера и мастер микс для ПЦР POWER SYBR Green (Прикладные биосистемы) в соответствии с инструкциями производителя. Количественная ПЦР была выполнена с использованием ABI7500 (Прикладные биосистемы). Программное обеспечение GeNorm (GeNorm) использовалось для определения наиболее стабильно экспрессируемых референсных генов. Для *S. suis* *recA* был наименее вариабельным по экспрессии 6 потенциальных референсных генов (фосфогелицератдегидрогеназы (*pgd*), ацетил-коА ацетилтрансферазы (*aca*), *mutS*, глутаматдегидрогеназы (*gdh*), которые были протестированы. GeNorm объединяет данные экспрессии в показатель, представляющее стабильность экспрессии, где 1 представляет наиболее стабильный ген. Показатели стабильности для *S. suis* варьировались от 1,667 для *gdh* до 1,217 для *recA*. Уровень экспрессии этих референсных генов измеряли, чтобы контролировать изменения выхода РНК и условия РВ-реакции. В каждый цикл количественной ПЦР вводили калибровочную кривую, состоящую из вектора, содержащего клонированный продукт ПЦР гена-мишени этой реакции. Калибровочная кривая состояла из семи 10-кратных разведений контрольного вектора. Таким образом, как уровень экспрессии целевого гена, так и уровни экспрессии внешних референсных генов можно рассчитать по калибровочной кривой. Для каждой реакции вода была включена вместо кДНК или матрицы в качестве отрицательного контроля. Анализ проводился с использованием программного обеспечения ABI7500 (Прикладные биосистемы).

Анализ последовательности.

Реакции последовательностей и анализ были выполнены с помощью Baseclear (Лейден, Нидерланды).

Пример 7. Сайт-направленный мутагенез.

Сайт-направленный мутагенез был достигнут с использованием набора сайт-направленного мутагена Quick-change II (Agilent Technologies, Ла Джолла, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Праймеры для ПЦР были разработаны с помощью прилагаемого программного обеспечения (Agilent Technologies) (табл. 1). Используя праймеры *t448a* и *t488a_антисмысловой*, была амплифицирована плазида *pCOM-orf2[S735]*, в которую ввели желаемую мутацию, которая заменила область -35 предполагаемой промоторной области *orf2-fofC*-оперона *S735* от 5'-TGGTCA-3' до 5'-TGGACA-3' (фиг. 1). Реакционную смесь разрезали с использованием *DpnI* для инактивации исходного матричного вектора и затем трансформировали в компетентные клетки *XL-1-blue* (Invitrogen). Чтобы исключить возможность внесения ошибок ПЦР в основную цепь вектора, вставка плазмиды (*orf2[S735]*) была выделена из матричного вектора после разрезания рестриктазами *BamHI* и *SacI* и клонирована в *pCOM1*, разрезанную теми же рестриктазами. Полученную плазмиду вводили в изолят *S. suis* *S735* путем электропорации и отбирали трансформантов на колумбийском кровяном агаре, содержащем 1 мг/мл эритромицина, с получением *S735-pCOM1-orf2 [S735] [t488a]*. Секвенирование использовали для исключения присутствия ошибок ПЦР в конечном конструкте.

Пример 8. Конструирование белка, связывающего субстрат фолата (*folT*), нокаутного мутанта *S. suis*.

Изогенный *folT* нокаутный мутант был сконструирован из штамма 10 путем разрушения *folT* кассетой устойчивости к спектиномицину. *pCOM1-V[10]* [14] разрезали *BamHI* и лигировали в разрезанную *BamHI* плазмиду *pKUN*, получая *pKUN-V[10]*. Чтобы удалить 3'-часть *V[10]*, *pKUN-V[10]* разрезали *SphI*, после чего фрагмент вектора очищали и лигировали, получая *pKUN-V[10]**. *pKUN-V [10]** частично разрезали *XmnI*, фрагмент линейного вектора очищали и лигировали с помощью кассеты устойчивости к спектиномицину с тупым концом, получая *pKUN-V [10]* - Spec''*. Для конструирования мутанта *V[10]*-Spec''* амплифицировали с помощью ПЦР с использованием *V735-fw* и *M13-rev*. Продукт ПЦР очищали с использованием набора для очистки ПЦР (Qiagen). Очищенный продукт ПЦР был использован для трансформации штамма *S. suis* 10 используя *ComS* в качестве индуктора компетентности, как описали Закаррия и др. [16] для индукции гомологичной рекомбинации. Трансформантов отбирали на чашках с колумбийским кровяным агаром, содержащим 6% (об./об.) крови лошади и 100 мг/мл спектиномицина. Двойные кроссинговеры были проверены с помощью ПЦР и подтверждены с помощью Саузерн-блоттинга. Чтобы исключить возможность введения точечных мутаций, хромосомную ДНК изогенного нокаутного мутанта выделяли и трансформировали в штамм 10. Снова отбирали мутантов на чашках с колумбийским кровяным агаром, содержащим 6% (об./об.) крови лошади и 100 мг/мл спектиномицина, и проводили скрининг с помощью ПЦР, с получением штамма *10ΔfolT*. Этот прототип рекомбинантного мутантного штамма *ΔfolT* был депонирован как "мутант *Streptococcus suis* *ΔfolT* CBS 140425" в Centraalbureau voor Schimmelcultures для целей патентной процедуры в соответствии с Регламентом Будапештского договора от 19 августа 2015 г.

Пример 9. Делеционные мутанты *ΔfolT*, не содержащие ген устойчивости к спектиномицину.

Также был сконструирован делеционный мутант *ΔfolT*, не содержащий гена устойчивости к спектиномицину. Для этого использовали термочувствительный челночный вектор *pSET5s* (Такамацу Д., Осаки М. и Секидзаки Т. 2001 г. Плазмиды 46: 140-148). Плазида *pSET5s* содержит чувствительную к температуре область репликации и может репродуцироваться при 37°C в *E. coli*, но репликация плазмиды блокируется свыше 37°C в *S. suis* (Такамацу и др.). *pSET5s* содержит ген устойчивости к хлорамфе-

николу (Cm), который может быть использован для отбора трансформантов среди *E. coli*, а также среди *S. suis*. Прототип рекомбинантного Δ folT мутантного штамма, не содержащего ген устойчивости к спектиномицину, был депонирован как "мутант *Streptococcus suis* Δ folT2 CBS 143192" в Westerdijk Fungal Biodiversity Institute для целей патентной процедуры в соответствии с Регламентом Будапештского договора от 25 августа 2017 г.

Чтобы сконструировать мутантный изолят Δ folT был создан продукт ПЦР, содержащий 5'- и 3'-фланкирующие последовательности folT гена. Этот фрагмент клонировали в pSET5s и Cm-устойчивых трансформантов отбирали при 37°C среди *E. coli*. Затем из *E. coli* была выделена плаزمид и введена в штамм *S. suis* 10. Трансформантов отбирали на чашках с колумбийским кровяным агаром при 30°C, содержащих Cm. Трансформированную колонию использовали для инокуляции 1 мл бульона Тодда-Гевитта (ТНВ), содержащего Cm, и выращивали культуру в течение ночи при 30°C. Ночную культуру разводили в 100 раз в той же среде и инкубировали, как указано выше, до достижения оптической плотности 0,2-0,3 при 600 нм, при которой культуру переносили на 38°C. При этой температуре плазмид не способна реплицироваться. На этом этапе выбирают штаммы, в которых плазмид интегрирована в хромосому посредством одного явления рекомбинации. Серийные разведения этой культуры высевали на чашки с колумбийским кровяным агаром с лошадиной кровью, содержащим Cm. Чашки инкубировали в течение ночи при 38°C. Колонию, содержащую рекомбинантную плазмиду, интегрированную в хромосому, отбирали и инокулировали в 1 мл бульона Тодда-Гевитта (ТНВ) с Cm для инкубации в течение ночи при 38°C. Для пяти последующих пассажей культуру разводили в 100 раз бульоном ТНВ без Cm и выращивали при 28°C. При этой температуре плазмид способна реплицироваться и вырезается из хромосомы во втором явлении рекомбинации при дупликации последовательности гена-мишени. Удаление плазмиды может привести к генотипу дикого типа или к получению делеционного мутант folT. Серийные разведения культуры высевали на чашки с колумбийским кровяным агаром с лошадиной кровью (без Cm) и инкубировали в течение ночи при 38°C. Одиночные колонии затем наносили репликами на чашки колумбийским кровяным агаром с лошадиной кровью с Cm и без него. Cm-чувствительные колонии подвергали скринингу с помощью ПЦР для выявления Δ folT мутантных изолятов, не содержащих ген устойчивости к спектиномицину.

Исследования гибридизации.

Хромосомная ДНК была выделена из неподвижно выращиваемых культур *S. suis*. Двести наногрмм очищенной ДНК были нанесены на Genescreen-Plus (Перкин Элмер, США). Введение метки P в зонды, гибридизацию и отмывку проводили, как описано ранее [17]. ПЦР-продукты folT и folC были использованы в качестве зонда, тогда как зонд 16S рРНК использовали в качестве положительного контроля.

Сверхэкспрессии folT достаточно, чтобы индуцировать гипервирулентность штамма S735.

Введение 3 т.п.н. геномных фрагментов вирулентного штамма 10 серотипа 2, V[10], повысило вирулентность слабовирулентного штамма S735 серотипа 2 [14], с созданием гипервирулентного изолята (S735-pCOM1-V[10]). Все свиньи, зараженные S735-pCOM1-V[10], умерли в течение 1 дня после заражения (п.з.), и высокий процент свиней показал тяжелые клинические признаки заболевания (табл. 2), тогда как почти все свиньи, зараженные контрольным штаммом S735-pCOM1, выжили во время эксперимента. Клинические показатели значительно отличались ($p \leq 0,01$) между свиньями, зараженными S735-pCOM1-V[10] и S735-pCOM1 (табл. 2). В качестве контроля мы также протестировали вирулентность S735, трансформированного плазмидой, содержащей гомологичный фрагмент размером 3 т.п.н. из штамма S735 (S735-pCOM1-V[S735]). Высокий процент свиней, зараженных S735-pCOM1-V[S735], выжил во время эксперимента. Свиньи, зараженные S735-pCOM1-V[S735], показали значительно более конкретные клинические признаки ($p \leq 0,01$) чем свиньи, зараженные S735-pCOM1 (табл. 2), хотя различия в клинических показателях лихорадки и неспецифических симптомах достоверно не различались между группами ($p = 0,06$). Таким образом, увеличенное количество копий V[S735] в S735, из-за введения плазмиды pCOM1-V[S735], увеличило специфические клинические признаки заболевания, вызванного *S. suis*. Тем не менее, специфические и неспецифические клинические признаки, обусловленные S735-pCOM1-V[10] ($p \leq 0,01$), были значительно увеличены по сравнению со свиньями, зараженными S735-pCOM1-V[S735], демонстрируя, что введение V[10] в штамм S735 повысило вирулентность больше, чем введение V[S735]. Этот результат показал, что гипервирулентность штамма S735 pCOM1-V[10] может быть связана с различными полиморфизмами нуклеотидов в V[10] по сравнению с V[S735].

Чтобы определить, являются ли оба *orf2* и *folC*-гены необходимыми для наблюдаемого повышения вирулентности, оба гена оперона, полученные из штамма 10, которым предшествует их родственная промоторная последовательность, были введены отдельно в штамм S735 для получения штаммов S735-pCOM1-*orf2*[10] и S735-pCOM1-*folC*[10]. Вирулентность этих изолятов определяли при экспериментальном заражении поросят, используя S735-pCOM1-V[10] и S735-pCOM1 в качестве контроля. Табл. 2 показывает, что свиньи, зараженные S735-pCOM1-V[10] или S735-pCOM1-*orf2*[10], умирали в течение одного дня после заражения с тяжелыми клиническими признаками. У зараженных свиней развился токсический шокоподобный синдром, который не наблюдался при использовании штамма 10 дикого типа при экспе-

риментальных заражениях, что означает, что фрагмент V[10] и *orf2*[10] повысили вирулентность S735 с получением более вирулентных изолятов, чем штамм 10 [3]. Как специфические, так и неспецифические симптомы были значительно увеличены ($p < 0,01$) у свиней, зараженных S735-pCOM1-V[10] или S735-pCOM1-*orf2* [10], по сравнению с S735-pCOM1 (табл. 2).

Бактериологическое исследование показало, что ЦНС, серозная оболочка и суставы были колонизированы высоким КОЕ *S. suis*. Для сравнения, свиньи, зараженные S735-pCOM1-*folC*[10] или S735-pCOM1, выжили во время эксперимента (11 дней после заражения), демонстрируя легкие симптомы инфекции, такие как лихорадка. Существенных различий в клиническом исходе между свиньями, зараженными S735-pCOM1-*folC*[10] и S735-pCOM1, не наблюдалось. Это четко демонстрирует, что введение *folC*[10] не повышает вирулентность штамма S735, тогда как введение V[10] и *orf2*[10] повысило вирулентность штамма S735. Поэтому мы пришли к выводу, что наблюдаемое повышение вирулентности у S735-pCOM1-V[10] по сравнению с S735-pCOM1 обусловлено введением *orf2*[10].

В заключение, как количество копий V[10], так и генетическое окружение *orf2*-*folC* оперона, по-видимому, являются определяющими вирулентность данного изолята.

Сбор данных *in silico* показывает, что ORF2 является белком, связывающим субстрат, облегчающим транспорт фолата.

Теперь, когда повышенная вирулентность объясняется введением множественных копий *orf2*[10], искали предполагаемую функцию *orf2*. *In silico* анализ 5' межгенной области, предшествующей *orf2*-*folC* оперону, выявил наличие прогнозируемой вторичной структуры, которая показала значительную гомологию с рибопереключателем тетрагидрофолата (фиг. 3). Тетрагидрофолатные рибопереключатели представляют собой класс гомологичных РНК в некоторых бактериях, которые связывают тетрагидрофолат (THF) [18]. Они находятся почти исключительно в вероятных 5'-нетранслируемых областях кодирующих белок генов, и известно, что большинство этих генов кодируют либо транспортеры фолата, либо ферменты, участвующие в метаболизме фолата. По этим причинам было сделано заключение, что указанные РНК функционируют как рибопереключатели. THF рибопереключатели встречаются у множества фирмикутов, в частности у отрядов Clostridiales и Lactobacillales, и реже у других клеточных линий бактерий. Такой THF рибопереключателем был одной из многих консервативных структур РНК, обнаруженных в проекте, основанном на сравнительной геномике [19]. Связь с метаболизмом фолата была подтверждена Эудес и др., продемонстрировавшим, что в *S. suis* ген, расположенный в обратном направлении от *folC*, кодировал транспортер фолиевой кислоты, *FolT* [20]. Эта объяснение было также применено к новой последовательности генома *S. suis*, SC070731, в которой объясняется, что гомологичный ген *ssu0135* кодирует *FolT* (GenBank AGG63648.1). Была определена 3-мерная структура энергосвязывающего фактора транспорта фолата у *Lactobacillus brevis* [21], что привело к предложению мультибелковой модели транспортера фолата. В этой модели ORF2 / *FolT* функционирует в качестве трансмембранного субстрат-специфического связывающего белка. Вместе с более общим трансмембранным белком и двумя нуклеотидсвязывающими белками, образующими энергосвязывающий модуль, этот комплекс облегчает трансмембранный транспорт фолата. Только субстратсвязывающий белок (*FolT*) специфичен для фолата, другие компоненты также используются для транспорта других субстратов, таких как тиамин или рибофлавин. Когда последовательность белка *FolT* из *S. suis* сравнили с предполагаемыми последовательностями *FolT* других организмов, стало ясно, что консервативные аминокислоты также были консервативными в *S. suis* [21] (фиг. 4). Интересно, что фиг. 4 также показывает, что аргинин, который был чрезвычайно консервативным в транспортере фолата человека, также как транспортеры тетрациклина в *Escherichia coli*, также был консервативным в *S. suis* (Arg99), что указывает на то, что этот остаток важен для транспортеров в пределах от человека до бактерий [22]. Взятые вместе, эти данные убедительно свидетельствуют о том, что консервативный белок с неизвестной функцией, ORF2, идентифицированный с использованием стратегии комплементации, кодирует белок, связывающий субстрат, облегчающий транспорт фолата.

Транспорт фолата в *Streptococcus suis*.

Анализ последовательности P1/7 (которая высокогомологична геному штамма 10) указывает на то, что *S. suis* кодирует все ферменты, необходимые для синтеза тетрагидрофолата (THF) по классическому пути биосинтеза фолата (фиг. 5). На основании данных, доступных в базе данных KEGG (www.kegg.jp) метаболизм фолата у *S. suis* идет по классическим путям метаболизма фолата с использованием *folE*, *folQ*, *folB*, *folK*, *folC*, *folA* и субстратов ГТФ, *p*-аминобензоата (ПАБА) и глутамила (GLU) как изображено на схеме. Тем не менее, с дополнительными генами, присутствующими в V[10] опероне, *S. suis* кажется также способным индуцировать экспрессию *folT* для прямого импорта фолата и использовать одновременную индуцированную экспрессию дополнительной копии/о/С, фолат может быть немедленно превращен в конечный продукт тетрагидрофолат (THF). Таким образом, сочетание *folT* и *folC* образует дополнительный "короткий путь", который позволяет производить THF. Наличие THF рибопереключателем, расположенного в обратном направлении от *folT*-*folC* оперона, предполагает жесткую регуляцию этого оперона с двумя генами, что может означать, что *folT*-*folC* оперон экспрессируется только при определенных условиях, например при нехватке фолата. На основании результатов эксперимента на животных, описанного выше, предполагается, что *folT*-*folC* оперон по крайней мере экспрессируется в ус-

ловиях *in vivo*.

Присутствие и экспрессия *folT* в *Streptococcus suis*.

Присутствие гена *folT* было продемонстрировано во всех тестируемых серотипах *S. suis*, за исключением серотипов 32 и 34. Однако серотипы 32 и 34 были переприписаны к роду *Streptococcus orisratti*, вместо *S. suis* [1]. Итак, в заключение считается, что все серотипы *S. suis* имеют гены, кодирующие *FolT* и *FolC*.

Анализ последовательности предполагаемого промотора *orf2* выявил разницу в положении одного нуклеотида в области -35 предполагаемого промотора в штамме 10 (TGGACA) по сравнению со штаммом S735 (TGGTCA) [14]. Влияние этого SNP на уровни экспрессии *orf2* и *folC* у штаммов 10 и S735 определяли с помощью анализа количественной ПЦР. Значительно более высокие уровни экспрессии *orf2* так же, как *folC* наблюдались в штамме 10 по сравнению со штаммом S735 (фиг. 6А). Это ясно указывает на то, что SNP в области -35 предполагаемого промотора влияет на транскрипцию *orf2* и *folC*. Таким образом, это демонстрирует, что идентифицированный SNP действительно находился в промоторной области в опероне, транскрибируемой *orf2* и *folC*. Кроме того, введение *pCOM1-orf2*[10] в S735 повысило экспрессию *orf2* в 31 раз по сравнению с введением *pCOM1*, тогда как введение *pCOM1-orf2*[S735] повысило экспрессию *orf2* только в 5 раз (фиг. 6В). Как ожидалось, уровни экспрессии *folC* были похожи для обоих рекомбинантных штаммов (фиг. 6В). Для подтверждения того, что идентифицированный SNP в области -35 промотора отвечает за различия в транскрипции *orf2* в штаммах S735 и 10, TGGTCA из *orf2*[S735] был мутирован в TGGACA, что соответствует промотору *orf2*[10] (с получением штамма S735-*pCOM1-orf2*[S735][t488a]). Было показано, что уровни транскриптов *orf2* в S735-*pCOM1-orf2*[S735][t488a] похожи на штамм S735-*pCOM1-orf2*[10] и в четыре раза выше, чем у штамма S735-*pCOM1-orf2*[S735] в разные фазы роста (фиг. 6С). Оба промотора наиболее активны в начале фазы роста *S. suis* при выращивании в бульоне Тодда-Гевитта (фиг. 6С). Вместе эти результаты ясно демонстрируют, что у штамма 10 промотор, расположенный в обратном направлении от *orf2-folC*-оперона, сильнее, чем промотор, расположенный в обратном направлении от этого оперона в штамме S735, из-за SNP в области -35.

Чтобы определить, связан ли SNP с повышенной экспрессией *orf2-folC* оперон, он был связан с конкретными секвенированными промоторными областями клональных типов или серотипов *S. suis* из большой коллекции изолятов (табл. 3). Все использованные изоляты были недавно охарактеризованы и классифицированы с помощью CGH и MLST [23]. На основании полученных данных о последовательности изоляты можно разделить на две основные группы (табл. 3). Область сильного промотора -35 была обнаружена исключительно в изолятах серотипа 1 и 2, которые принадлежали к кластеру А по CGH и клонального комплекса 1 по MLST, и которые экспрессировали EF-белок. SNP, связанный с более низкой активностью промотора, был обнаружен в изолятах серотипа 7 и 9, принадлежащих к группе В CGH (за исключением двух), в которой все отрицательны по экспрессии EF, а также в слабо вирулентных изолятах серотипа 2, принадлежащих к группе А CGH / клональному комплексу 1 (CC1), который был положительным для экспрессии крупной формы белка EF (EF *). Было два исключения, изолят серотипа 7 (С 126), который принадлежит к CC1, но не экспрессирует EF-белок, содержащий SNP, связанный с более сильным промотором, и изолят серотипа 7 (7711), который имел другую промоторную последовательность -35 (TTGTCA), для которой сила промотора не определена. В заключение, только CC1 изоляты, экспрессирующие белок EF (и 1 изолят серотипа 7), содержат SNP, связанный с сильной активностью промотора. Поскольку у изолятов с этой комбинацией фенотипа и генотипа есть значительная корреляция с вирулентностью [23, 24], мы можем заключить, что сильный промотор, расположенный в обратном направлении от *orf2-folC*-оперона, связан с вирулентными изолятами *S. suis*. Это наблюдение вместе с повышенной вирулентностью наблюдается после введения дополнительных копий *folT*[10] дает основания предполагать, что повышенная экспрессия *folT* либо из-за увеличения числа копий, либо из-за более сильного промотора приводит к повышению вирулентности *S. suis*.

Рост *Streptococcus suis* с дополнительными копиями *folT* или без *folT* при культивировании.

Не наблюдалось существенных различий в росте *Streptococcus suis* с дополнительными копиями *folT* или без функционального *folT* по сравнению с родительским штаммом при культивировании *in vitro*.

Белковая экспрессия *FolT*.

На основании последовательности белка *FolT* было предположено, что *FolT* является очень гидрофобным белком с по меньшей мере 5 трансмембранными доменами. Моделированием гомологии (сервер ExPASy) с использованием 6 известных структур *FolT*, среди которых напечатанная 3D-структура *FolT* из *Lactobacillus brevis*, была предположена 3D-структура для *FolT S. suis* (фиг. 7).

FolT важен для выживания *in vivo*: вирулентность *folT*-нокаутного штамма 10 Δ *folT*.

Так как сверхэкспрессия *folT* в слабо вирулентном штамме *S. suis* ведет к значительному увеличению вирулентности, мы предположили, что *FolT* играет важную роль *in vivo*. Чтобы проверить, верна ли эта гипотеза, был создан изогенный нокаут в вирулентном штамме *S. suis* 10, путем вставки кассеты устойчивости к спектиномицину в ген *folT*. Так как *folT* и *folC* находятся в структуре оперона, этот нокаут, вероятно, также будет инактивировать дополнительную копию *folC*. Чтобы определить, важен ли транспорт фолата для вирулентности *in vivo*, в эксперименте 1 десять свиней были внутривенно зараженные

либо штаммом дикого типа 10, либо нокаутным штаммом 10 Δ folT. Все свиньи ответили на инфицирование повышением температуры тела (фиг. 8). Однако свиньи, зараженные штаммом дикого типа 10, демонстрировали более высокие температуры в течение более длительного периода времени по сравнению со свиньями, зараженными нокаутным штаммом 10 Δ folT. Это также отражается в разнице в индексе лихорадки (процент наблюдений, где у свиней была лихорадка) между обеими группами ($p = 0,06$). Это говорит о том, что штамм 10 Δ folT менее поигенный, по сравнению со штаммом дикого типа. Это может быть следствием того факта, что значительно меньше бактерий было выделено из крови поросят, зараженных штаммом 10 Δ folT. Только две свиньи, зараженные штаммом 10 Δ folT, показали короткий бактериемический период по сравнению с 5 свиньями, зараженными штаммом 10; свиньи, зараженные штаммом 10, также имели значительно большее количество бактерий в крови в течение более длительного периода времени (фиг. 9). Это говорит о том, что штамм 10 Δ folT либо более эффективно выводится из крови, либо не может выжить в крови. Подсчет лейкоцитов показал, что свиньи, зараженные штаммом дикого типа 10, демонстрировали более сильное увеличение БКК в течение более длительного периода времени. У всех свиней, зараженных штаммом 10, наблюдалось увеличение БКК, тогда как только у одной свиньи, зараженной штаммом 10 Δ folT, наблюдалось увеличение БКК. Рассчитанный индекс БКК значительно различается между группами (табл. 5). Показатели выживаемости между двумя группами значительно различались: свиньи, зараженные штаммом 10, имели среднюю выживаемость 2,6 дня после заражения, тогда как свиньи, зараженные штаммом 10 Δ folT пережили 6,2 дня после заражения. (Фиг. 10). Хотя свиней подвергали эвтаназии, когда были достигнуты заранее предопределенные гуманные конечные точки эксперимента, выживаемость отражает тяжесть инфекции. Как показано на фиг. 10, кривые выживаемости значительно различаются между группами. Макропатология показала, что у 4/5 свиней, зараженных штаммом 10, наблюдались клинические признаки, специфические для вызванной *S. suis* инфекции, такие как артрит, плеврит, перикардит или перитонит, тогда как 3/5 свиней, зараженных штаммом 10 Δ folT, показали специфические клинические признаки. Бактериологическое исследование всех инфицированных органов показало, что большее количество органов было колонизировано более высокими бактериальными нагрузками в случае штамма дикого типа 10 по сравнению со штаммом 10 Δ folT (фиг. 11). Второй эксперимент на животных (эксперимент 2) в целом подтвердил данные, полученные в эксперименте 1. Как и в первом эксперименте, кривые выживаемости штамма дикого типа 10 и изолята штамма 10 Δ folT значительно отличались. В эксперименте 2 все животные, которым вводили штамм 10 Δ folT, дожили до конца эксперимента, в то время как 60 % животных, которым вводили штамм 10, должны были быть умерщвлены в ходе эксперимента (фиг. 12). Кроме того, частота и тяжесть клинических признаков (например, температуры, локомоция и сознания; см. фиг. 13, 14, 15) значительно различались у животных, которым вводили штамм дикого типа 10 и штамм 10 Δ folT. Частота макропатологических нарушений в суставах и брюшине, выявленных при вскрытии, также значительно различалась между диким типом и мутантным изолятом 10 Δ folT.

На основании результатов экспериментов по заражению поросят был сделан вывод, что изогенный нокаутный мутантный штамм 10 Δ folT был значительно ослаблен по сравнению со штаммом дикого типа. Это показывает, что транспортер фолата необходим для выживания бактерий в условиях *in vivo*. Объединяя результаты обоих исследований, эти эксперименты ясно показывают, что изолят Δ folT почти не вызывал смертность, минимальные клинические признаки и сниженную частоту воспалений суставов и перитонита по сравнению с исходным штаммом. Поэтому можно сделать вывод, что штамм Δ folT сильно ослаблен и безопасен.

Обобщающие результаты. Вакцина, содержащая бактерию с модификацией, такой как мутация, делеция или вставка в области ДНК, кодирующей белок, связывающий субстрат фолата (изолят Δ folT указанной бактерии) защищает хозяина от заражения вирулентным изолятом указанной бактерии, не имеющим указанной модификации.

В настоящем изобретении предложен способ получения бактерии, предпочтительно для использования в вакцине, предпочтительно для использования в вакцине для создания защиты от бактериальной инфекции, включающий выбор родительского бактериального штамма, обычно способного к транспорту фолатов и синтезу фолатов, и выбор бактерии из этого родительского штамма, которая имеет модификацию, такую как мутация, делеция или вставка, в области ДНК указанной бактерии, кодирующей белок, связывающий субстрат фолата (у *Streptococcus suis* известный как ген folT), и отбор указанной бактерии по способности расти с такой же скоростью, как и указанный родительский штамм *in vitro*, но расти с более низкой скоростью по сравнению с указанным родительским штаммом *in vivo*. В настоящем изобретении также предложен способ получения бактерии, предпочтительно для использования в вакцине, предпочтительно вакцину для использования для создания защиты от бактериальной инфекции, включающий выбор родительского бактериального штамма, обычно способного к транспорту фолатов и синтезу фолатов, и выбор бактерии из этого родительского штамма, которая имеет модификацию, такую как мутация, делеция или вставка, в области ДНК указанной бактерии, кодирующей белок, связывающий субстрат фолата (у *Streptococcus suis* известный как ген folT), и отбор указанной бактерии по способности расти с такой же скоростью, как и указанный родительский штамм *in vitro*, но расти с более низкой

скоростью по сравнению с указанным родительским штаммом *in vivo*. Такая бактерия, как предложено в настоящем документе, все еще обладает способностью продуцировать фолат для собственного использования путем применения путей синтеза фолата *de novo*. Интактность этих путей синтеза не влияет на способность к росту *in vitro* (в культуре), однако неожиданно в настоящем документе было показано, что рост и вирулентность у хозяина (*in vivo*) значительно снижены.

Такой бактериальный штамм, который хорошо растет *in vitro*, но *in vivo* растет меньше, чем его родительский штамм, и имеет значительно сниженную вирулентность *in vivo*, очень полезен в качестве вакцинного штамма. Такой штамм или мутант, предложенный в настоящем изобретении, с одной стороны, по существу, не подвержен влиянию синтеза фолата и, таким образом, может быть выращен до высоких титров и, следовательно, относительно прост и недорог в производстве, в то время как с другой стороны, из-за его сниженного роста и сниженной вирулентностью у его хозяина по сравнению с его родительским штаммом, он является относительно безвредным после применения *in vivo*, что делает его чрезвычайно полезным в качестве вакцины направленной против бактериальной инфекции.

В первой серии экспериментов, описанных в настоящем документе, для исследования эффективности использовали поросят приблизительно трехнедельного возраста (коммерческой породы), которые не были вакцинированы против *S. suis* и никогда не получали лекарственного корма. У животных был отрицательный мазок с миндалин на *S. suis* серотипа 2 по ПЦП при регистрации, и они происходили из стада с отрицательным результатом на PRRSV. Две обрабатываемые группы были размещены отдельно на месте исследования.

По прибытии на место исследования у всех животных были взяты мазки крови и мазки с миндалин. В день исследования 0, после соответствующего периода акклиматизации, одну группу животных вакцинировали штаммом 10ΔFolT. Другая группа животных была оставлена не вакцинированной. Вакцинированные животные были ревакцинированы на 21 день в правую сторону шеи той же дозой мутантного изолята, соответственно. После каждой вакцинации у животных наблюдали местные и системные реакции. На 35-й день исследования у всех животных собирали мазки крови и мазки с миндалин, прежде чем животных в обеих группах подвергали заражению исследуемым штаммом ATCC700794. У животных наблюдали признаки связанного с *S. suis* заболевания (например, повышение температуры тела, хромота, ненормальное поведение, признаки ЦНС) в течение 7 дней после заражения. Животных, найденных мертвыми или которые должны были быть подвергнуты эвтаназии перед выбыванием из испытания по причинам, связанным с благополучием животных, подвергали вскрытию. Во время вскрытия животных оценивали по макроскопическим признакам, типично связанным с заболеванием, вызванным *S. suis* (например, воспаление ЦНС, суставов, грудной полости). Кроме того, для восстановления исследуемого изолята собирали образцы ЦНС. На 42 день все оставшиеся животные были умерщвлены, вскрыты и образцы были взяты, как описано выше. Вакцинированные животные показали значительно меньше признаков заболевания, вызванного *S. suis*, после заражения.

Вторая серия экспериментов была проведена на свиньях коммерческой породы; в день первой вакцинации свиньи были в возрасте 21 ± 7 дней. Животные, которых не вакцинировали против *S. suis*, с отрицательными мазками с миндалин на *S. suis* типа 2, PRRSV-отрицательные по серологии, были потомством свиноматок, у которых мазок с миндалин был отрицательным на *S. suis* типа 2. По прибытии на место исследования у всех животных были взяты мазки крови и мазки с миндалин. В день исследования 0, после соответствующего периода акклиматизации, одну группу животных вакцинировали в левую часть шеи штаммом ΔFolT2. Другая группа животных была оставлена не вакцинированной. Вакцинированные животные были ревакцинированы на 21 день в правую сторону шеи той же дозой мутантного изолята, соответственно. После каждой вакцинации у животных наблюдали местные и системные реакции. На 34-й день у всех животных были собраны мазки крови и мазки с миндалин, а затем животные строгого контроля были перемещены в отдельное помещение с отдельной подачей воздуха, в то время как все другие группы были объединены. На 35-й день животных заражали внутрибрюшинно (ip) примерно вирулентным изолятом *S. suis* типа 2.

В течение семи дней после заражения животных осматривали на признаки заболевания, вызванного *S. suis*. Животных, найденных мертвыми или которые должны были быть подвергнуты эвтаназии перед выбыванием из испытания по причинам, связанным с благополучием животных, подвергали вскрытию. Во время вскрытия животных оценивали по макроскопическим признакам, обычно связанным с заболеванием, вызванным *S. suis* и ЦНС (то есть мозг), и собирали образцы суставов. Выбывшие из испытания все оставшиеся животные были умерщвлены, вскрыты и образцы были собраны. Вакцинация мутантом ΔfolT2 снизила количество животных, которые умерли или должны были быть подвергнуты эвтаназии по соображениям благополучия животных в течение периода наблюдения после заражения. Во время вскрытия признаки воспаления в головном мозге, на которые указывает присутствие фибрина и/или жидкости, реже наблюдались у животных, вакцинированных ΔfolT2, по сравнению с отрицательными контролями. Исследуемый изолят *S. suis* реже обнаруживали в образцах головного мозга и суставов, собранных при вскрытии у животных, вакцинированных штаммом ΔfolT2, по сравнению с отрицательными контролями.

Ссылки

1. Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, et al. (2005) Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* 107: 63-69.
2. Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U (2000) Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol* 74: 237-248.
3. Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, Smith HE (1991) Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* 59: 3156-3162.
4. Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM (1997) *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* 21: 381-407.
5. Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, Storm PK (1994) Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 62: 1742-1748.
6. Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C (2009) *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* 48: 617-625.
7. Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, et al. (2006) *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* 12: 1203-1208.
8. Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, et al. (2006) Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med* 3: e151.
9. Takamatsu D, Wongsawan K, Osaki M, Nishino H, Ishiji T, et al. (2008) *Streptococcus suis* in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis* 14: 181-183.
10. Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, et al. (2008) *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin Infect Dis* 46: 659-667.
11. Swildens B, Nielen M, Wisselink HJ, Verheijden JH, Stegeman JA (2007) Elimination of strains of *Streptococcus suis* serotype 2 from the tonsils of carrier sows by combined medication and vaccination. *The Veterinary record* 160: 619-621.
12. Dekker CN, Bouma A, Daemen AJ, van Leengoed LA, Jonker FH, et al. (2012) Homologous whole bacterin vaccination is not able to reduce *Streptococcus suis* serotype 9 strain 7997 transmission among pigs or colonization. *Vaccine* 30: 1379-1387.
13. Baums CG, Bruggemann C, Kock C, Beineke A, Waldmann KH, et al. (2010) Immunogenicity of an autogenous *Streptococcus suis* bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1589-1597.
14. Smith HE, Buijs H, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smits MA (2001) Selection of virulence-associated determinants of *Streptococcus suis* serotype 2 by *in vivo* complementation. *Infect Immun* 69: 1961-1966.
15. Konings RN, Verhoeven EJ, Peeters BP (1987) pKUN, vectors for the separate production of both DNA strands of recombinant plasmids. *Methods in enzymology* 153: 12-34.
16. Zaccaria E, van Baarlen P, de Greeff A, Morrison DA, Smith H, et al. (2014) Control of competence for DNA transformation in *Streptococcus suis* by genetically transferable pherotypes. *PLoS ONE* 9: e99394.

17. de Greeff A, Buys H, Verhaar R, Dijkstra J, van Alphen L, et al. (2002) Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 70: 1319-1325.
18. Ames TD, Rodionov DA, Weinberg Z, Breaker RR (2010) A eubacterial riboswitch class that senses the coenzyme tetrahydrofolate. *Chem Biol* 17: 681-685.
19. Weinberg Z, Wang JX, Bogue J, Yang J, Corbino K, et al. (2010) Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome biology* 11: R31.
20. Eudes A, Erkens GB, Slotboom DJ, Rodionov DA, Naponelli V, et al. (2008) Identification of genes encoding the folAte- and thiamine-binding membrane proteins in Firmicutes. *J Bacteriol* 190: 7591-7594.
21. Xu K, Zhang M, Zhao Q, Yu F, Guo H, et al. (2013) Crystal structure of a folAte energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis*. *Nature* 497: 268-271.
22. Lasry I, Berman B, Straussberg R, Sofer Y, Bessler H, et al. (2008) A novel loss-of-function mutation in the proton-coupled folAte transporter from a patient with hereditary folAte malabsorption reveals that Arg 113 is crucial for function. *Blood* 112: 2055-2061.
23. de Greeff A, Wisselink HJ, de Bree FM, Schultsz C, Baums CG, et al. (2011) Genetic diversity of *Streptococcus suis* isolates as determined by comparative genome hybridization. *BMC Microbiol* 11: 161.
24. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, et al. (2002) Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J Clin Microbiol* 40: 3671-3680.
25. Smith HE, Rijnsburger M, Stockhofe-Zurwieden N, Wisselink HJ, Vecht U, et al. (1997) Virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 1 can be recognized by a unique ribotype profile. *J Clin Microbiol* 35: 1049-1053.

Таблица 1

Последовательности праймеров		
Название праймера	Последовательность 5'-3'	Мишень
comE1	<u>cgagctcgggaagaattggttattgcgcgtg</u> (SEQ ID NO: 1)	<i>orf2</i> [10] – прямой – SacI
comE2	<u>cgggatcccggggatgacctcttctctt</u> (SEQ ID NO: 2)	<i>orf2</i> [10] – обратный – BamHI
comE3	<u>tccccggggagtcgtgtattcgcacagcgg</u> (SEQ ID NO: 3)	P- <i>orf2-folC</i> [10] – обратный – SmaI
comE4	<u>tccccggggacaagcaacaggtcatcccc</u> (SEQ ID NO: 4)	<i>folC</i> [10] – прямой – SmaI
comE6	<u>cgggatcccgggttaatgcccgcaagcc</u> (SEQ ID NO: 5)	<i>folC</i> [10] – обратный – BamHI
<i>Orf2</i> -fw	ctacggctggttctctatcgaa (SEQ ID NO: 6)	<i>S. suis orf2</i>
<i>Orf2</i> -rev	gcaatcgggtgcatgataaagg (SEQ ID NO: 7)	<i>S. suis orf2</i>
<i>folC</i> -fw	gttgtccgctccatcggtt (SEQ ID NO: 8)	Полифосфатполиглутаматсинтаза <i>S. suis</i>
<i>FolC</i> -rev	ctggctggctcatagatga (SEQ ID NO: 9)	Полифосфатполиглутаматсинтаза <i>S. suis</i>
<i>RecA</i> -fw	ggtttgcaggctcgtatgatg (SEQ ID NO: 10)	Рекомбиназа A <i>S. suis</i>
<i>RecA</i> -rev	accaaacatgacaccgactttt (SEQ ID NO: 11)	Рекомбиназа A <i>S. suis</i>
t488a	gaaaggtatagtttttagcaagtggacaataatagtg gtgtatacaat (SEQ ID NO: 12)	Промотор <i>orf2</i>
t488a_антисмысловой	attgtatcacacactatattttgccacttgctaaaaa ctatacctttc (SEQ ID NO: 13)	Промотор <i>orf2</i>
V735-fw	tatgcgcaatgacgtagtagaagg (SEQ ID NO: 14)	pKUN-V[10]*-Spec ^R
M13-rev	aacagctatgaccatg (SEQ ID NO: 15)	pKUN-V[10]*-Spec ^R

Таблица 2

Вирулентность трансфицированных штаммов *S. suis* у поросят-гнотобиотиков; все штаммы содержали плазмиду (pCOM1) с вставкой или без нее. V[10] / V[S735]: исходный фрагмент размером 3 т.п.н. из штамма 10 или штамма S735, который был выбран из библиотеки; *orf2*[10]: *orf2* из V[10]; *folC*[10]: *orf3* из V[10], кодирующий дигидрофолат синтаза

Штамм	Клинический индекс группы					Кол-во свиней, из которых выделили <i>S. suis</i>					
	Кол-во	Доза (КОЕ)	Смертность ^a (%)	Кол-во дней до смерти	Заболев-сть ^b (%)	Специф. симптомы	Неспециф. симптомы	Индекс лихорадки ^c	ЦНС	Серозная оболочка ^d	Суставы
S735-pCOM1-V[10]	4	10 ⁶	100	1	10	100**	100**	38*	4	4	4
S735-pCOM1- <i>orf2</i> [10]	4	10 ⁶	100	1	10	100**	66*	29	4	4	4
S735-pCOM1- <i>folC</i> [10]	4	10 ⁶	0	11	0	4	21	1	0	0	0
S735-pCOM1	4	10 ⁶	0	11	0	0	21	5	0	0	0
S735-pCOM1-V[10] ^f	5	10 ⁶	100	1	100	100**	100**	60*	5	5	5
S735-pCOM1-V[S735] ^f	5	10 ⁶	20	15	100	43**	38	25	1	1	1
S735-pCOM1 ^f	5	10 ⁶	20	16	60	14	11	12	1	0	0
T15-pCOM1-V[10]	5	10 ⁶	0	14	16	4	16	13	1	1	1

^a Процент свиней, которые умерли из-за инфекции или должны были быть убиты по соображениям благополучия животных.

^b Процент свиней со специфическими симптомами.

^c Процент наблюдений для экспериментальной группы, в которой наблюдались специфические симптомы (атаксия, хромота хотя бы одного сустава и/или неподвижность).

^d Процент наблюдений для экспериментальной группы, в которой наблюдались неспецифические симптомы (отсутствие аппетита и/или депрессия).

^e Процент наблюдений для экспериментальной группы с температурой тела >40°C.

^f Предыдущие эксперименты (Smith et al., 2001) были повторно проанализированы, чтобы обеспечить статистическое сравнение между экспериментами, этот повторный анализ потребовал новых точных определений специфических и аспецифических симптомов, как указано в материалах и методах.

* $p \leq 0,05$ по сравнению с S735-pCOM1.

* $p \leq 0,01$ по сравнению с S735-pCOM1.

^g Серозная оболочка означает брюшина, перикард или плевра.

Таблица 3

Анализ последовательности области -35 промотора *orf2/foIc* среди различных изолятов и серотипов¹ *S. suis*

Серо-тип	Фенотип			Клональный комплекс	Промоторная последовательность -35 (5'-3')		
	MRP ²	EF ³	CGH кластер ⁴		TGGACA	TGGTCA	TTGTCA
1	-	-	B	13		1/1	
1	S	+	A	1	4/4		
2	-	-	B	16/29/14		6/6	
				7			
2	+	-	B	28		1/1	
2	+	*	A	1		7/7	
2	-	*	A	1		1/1	
2	+	+	A	1	9/9		
7	-	-	B	29/1	1/8 ⁵	6/8	1/8
9	-	-	B	16		2/2	
9	*	-	B	16		6/6	
9	+	-	B	16		1/1	

¹ Изоляты *S. suis* были описаны в de Greeff et al. [23].

² * Указывает на более высокомолекулярную форму MRP; "s" указывает на более низкомолекулярную форму MRP.

³ * Указывает на более высокомолекулярную форму EF.

⁴ Все изоляты были генотипированы с использованием сравнительной гибридизации генома (CGH) [23].

⁵ Этот изолят относится к клональному комплексу 1.

⁶ Количество проанализированных изолятов / количество изолятов с соответствующей промоторной последовательностью -35.

Таблица 4

Клинические показатели свиней, зараженных *S. suis*, эксперимент 1

Штамм	Кол-во свиней	Доза	Смертность (%)	Кол-во дней до смерти	Индекс лихорадки ^e	Индекс WBC	Макропатология			
							Артрит	Плеврит	Перикардит	Перитонит
10	5	1,1x10 ⁶	100	2,6	47	50	11/20	2/5	2/5	1/5
10Δ <i>foIT</i>	5	9,6x10 ⁵	20	6,2**	23 [#]	19*	2/20	1/5	1/5	0/5

* $p \leq 0,05$ по сравнению с 10 ** $p \leq 0,01$ по сравнению с 10[#] $p \leq 0,1$ по сравнению с 10.

Таблица 5

Макроскопические поражения, указывающие на артрит и перитонит: % положительных наблюдений у животных, зараженных штаммом дикого типа 10 и мутантным изолятом 10Δ*foIT*; эксперимент 2

	10	10Δ <i>foIT</i>
Суставы	100	20
Брюшина	80	20

Таблица 6

План клинического исследования (для исследования с использованием CBS 143192)

Группа	Обработка	$\Delta folT2$ КОЕ на дозу	Вакцинация (D0, D21)	Заражение (D35)	Выбывание из испытания
1	Штамм 10 $\Delta folT2$ выращен на среде APS	$5,5 \times 10^7$ КОЕ	0,2 мл <i>id</i>	2 мл <i>ip</i>	D42
2	Штамм 10 $\Delta folT2$ выращен на среде THB	$1,4 \times 10^8$ КОЕ	0,2 мл <i>id</i>		
3	Штамм 10 $\Delta folT2$ выращен на среде THB	$1,4 \times 10^8$ КОЕ	2,0 мл <i>im</i>		
4	Вакцина плацебо [отрицательный контроль]	N/A	2,0 мл <i>im</i>		
5	Без обработки [Строгий контроль]	N/A	N/A	N/A	

Таблица 7

Подготовка вакцины и плацебо (для исследования с использованием CBS 143192)

Группа	Обработка	Описание
1	Штамм 10 $\Delta folT2$ выращен на среде APS	В день вакцинации ACES-забуференную среду Veston Dickinson APS-TSB (APS; без сыворотки) инокулировали $\Delta folT2$, хранящимся под глицерином, и выращивали при перемешивании до $0,6 \pm 0,1$ OD A600 нм. Культуру центрифугировали при 9000 оборотов в течение 5 минут при 4 °C. Супернатант декантировали и затем клетки дважды отмывали в равном объеме стерильного 1X PBS, pH 7,2. Отмытые клетки суспендировали в PBS до OD A600 нм, равного приблизительно 9 log на мл. Приблизительно 10 мл 9 log отмытой культуры было разлито в стерильные флаконы. Аликвоты раствора для вакцинации были проверены на количество КОЕ до вакцинации и сразу после вакцинации. Вакцинные препараты держали на жидком льду до введения не более 60 минут.
2, 3	Штамм 10 $\Delta folT2$ выращен на среде THB	В день вакцинации бульон Тодда-Гевитта (THB; без сыворотки) инокулировали $\Delta FolT2$, хранящимся под глицерином, и выращивали при перемешивании до $0,6 \pm 0,1$ OD A600 нм. Культуру центрифугировали при 9000 оборотов в течение 5 минут при 4 °C. Супернатант декантировали и затем клетки дважды отмывали в равном объеме стерильного 1X PBS, pH 7,2. Отмытые клетки суспендировали в PBS до OD A600 нм, равного приблизительно 9 log на мл. Приблизительно 10 мл 9 log отмытой культуры перелили в стерильный флакон для обработки группы 2. Аликвоту 9 log промытой культуры дополнительно разбавили до целевой концентрации клеток в PBS и перелили в стерильный флакон для обработки группы 3. Аликвоты каждого раствора для обработки были проверены на количество КОЕ до вакцинации и сразу после вакцинации. Вакцинные препараты держали на жидком льду до введения не более 60 минут.
4	Вакцина плацебо	Приблизительно 40 мл стерильного забуференного фосфатом солевого раствора (PBS), pH 7,2, перелили в стерильный флакон и хранили при 4 °C до использования.

Таблица 8

Подготовка к заражению (для исследования с использованием CBS 143192)

Штамм	<i>S. suis</i> тип 2 ВІАН #08-06 (производный от ATCC 700794)
Подготовка	Отдельную колонию инокулировали в 10 мл предварительно нагретого ТНВ + 5 % ФБС и выращивали статически до $0,5 \pm 0,1$ OD A600 нм. Объем культуры увеличивали до 900 мл в ТНВ + 5 % ФБС и выращивали при перемешивании до $0,7 \pm 0,1$ OD A600 нм. Стерильный глицерин добавляли в культуру (10 % об./об.). Аликвоты были сохранены для определения КОЕ до замораживания и после размораживания, а также для определения чистоты. Пробу вносили во флакон и хранили при -70 °С до использования. Перед использованием культуру размораживали на водяной бане при 37 °С, затем разбавляли стерильным ТНВ + 5 % ФБС до достижения целевой концентрации 1×10^9 КОЕ/мл. Аликвоты раствора для заражения проверяли на количество КОЕ до заражения и сразу после заражения.

Таблица 9

Процент животных, которые умерли или были умерщвлены после заражения (смертность) (для исследования с использованием CBS 143192)

Группа	Кол-во зараженных свиней	Вакцина	Смертность ^a
1	14	Штамм 10ΔfolT2 – 7log - APS – id	35,7 %
2	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - id	45,5 %
3	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - im	27,3 %
4	15	Вакцина плацебо [отрицательный контроль]	93,3 %

Таблица 10

Процент животных с тяжелой хромотой после заражения (для исследования с использованием CBS 143192)

Группа	Кол-во зараженных свиней	Вакцина	Процент свиней с тяжелой хромотой в течение периода наблюдения
1	14	Штамм 10ΔfolT2 – 7log - APS – id	4,2 %
2	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - id	0 %
3	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - im	3,3 %
4	15	Вакцина плацебо [отрицательный контроль]	41,7 %

Таблица 11

Процент животных, проявляющих апатию после заражения (для исследования с использованием CBS 143192)

Группа	Кол-во зараженных свиней	Вакцина	Процент свиней, проявляющих апатию в течение периода наблюдения
1	14	Штамм 10ΔfolT2 – 7log - APS – id	21,1 %
2	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - id	4,3 %
3	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - im	11,7 %
4	15	Вакцина плацебо [отрицательный контроль]	50,0 %

Таблица 12

Процент животных с признаками воспаления в мозге во время вскрытия
(для исследования с использованием CBS 143192)

Группа	Кол-во зараженных свиней	Вакцина	Процент свиней с воспалением в мозге
1	14	Штамм 10ΔfolT2 – 7log - APS – id	21 %
2	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - id	45 %
3	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - im	27 %
4	15	Вакцина плацебо [отрицательный контроль]	87 %

Таблица 13

Процент животных, у которых *S. suis* был обнаружен в образцах головного мозга, взятых при вскрытии
(для исследования с использованием CBS 143192)

Группа	Кол-во зараженных свиней	Вакцина	Процент свиней, у которых <i>S. suis</i> был обнаружен в мозге
1	14	Штамм 10ΔfolT2 – 7log - APS – id	35,7 %
2	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - id	27,3 %
3	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - im	27,3 %
4	15	Вакцина плацебо [отрицательный контроль]	93,3 %

Таблица 14

Процент животных, у которых *S. suis* был обнаружен в образцах головного мозга, взятых при вскрытии
(для исследования с использованием CBS 143192)

Группа	Кол-во зараженных свиней	Вакцина	Процент свиней, у которых <i>S. suis</i> был обнаружен в мозге
1	14	Штамм 10ΔfolT2 – 7log - APS – id	35,7 %
2	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - id	36,4 %
3	11	Штамм 10ΔfolT2 – 8log - ТНВ - im	18,2 %
4	15	Вакцина плацебо [отрицательный контроль]	73,3 %

Таблица 15

План исследования заражения после вакцинации (для исследования с использованием CBS 140425)

Группа	Кол-во свиней	Обработка	Кол-во/ 2 мл доза	Дни обработки	Способ Вакцинации	День заражения	Способ заражения
1	15	Штамм 10ΔfolT	1,0 x 10 ¹⁰ КОЕ (первая вакцина) 9,8 x 10 ⁹ КОЕ (вторая вакцина)	0, 21	<i>i.m.</i>	36	<i>i.p.</i>
2	15	Штамм 10ΔfolT	9,5 x 10 ⁹ КОЕ	0	<i>i.m.</i>	36	<i>i.p.</i>
3	15	Плацебо [отрицат. контроль]	N/A	0, 21	<i>i.m.</i>	36	<i>i.p.</i>
4	5	Строгий контроль	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Таблица 16

Подготовка вакцины (для исследования с использованием CBS 140425)

Группа	Обработка	Описание
1 - 2	Штамм 10ΔfolT	Штамм 10ΔfolT, хранящийся под глицерином, переносили в бульон Тодда-Гевитта (ТНВ) + 5 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и выращивали статически до 0,5 ± 0,1 OD A600 нм. Объем культуры увеличивали до 1800 мл в ТНВ + 5 % ФБС и выращивали при перемешивании до 0,7 ± 0,1 OD A600 нм. Культуру концентрировали в 6 раз центрифугированием и удалением супернатанта до достижения 10-log-дозы. Стерильный глицерин добавляли в концентрированную культуру (10 % об./об.). Аликвоты были сохранены для определения КОЕ, однородности и чистоты до замораживания и после размораживания. Вакцину вносили во флакон и хранили при -70 °С до использования. Вакцину размораживали на водяной бане при 37 °С и разбавляли до намеченной целевой концентрации, используя среду для хранения, затем держали на жидком льду до введения.
6	Плацебо	Стерильная среда ТНВ + 5 % ФБС, хранили при 4 °С до использования.

Таблица 17

Подготовка к заражению (для исследования с использованием CBS 140425)

Исследуемый штамм	<i>S. suis</i> тип 2 ВИАН #08-06 (производный от ATCC 700794)
Подготовка к заражению	Отдельную колонию инокулировали в 20 мл предварительно нагретого ТНВ + 5 % ФБС и выращивали статически до 0,5 ± 0,1 OD A600 нм. Объем культуры увеличивали до 900 мл в ТНВ + 5 % ФБС и выращивали при перемешивании до 0,7 ± 0,1 OD A600 нм. Стерильный глицерин добавляли в культуру (10 % об./об.). Аликвоты были сохранены для определения КОЕ до замораживания и после размораживания, а также для определения чистоты. Пробу вносили во флакон и хранили при -70 °С до использования.

Таблица 18

Процент животных, проявляющих хромоту после заражения (CBS 140425)

Группа	Кол-во свиней	Вакцина	Процент свиней, проявляющих хромоту
1	13	Штамм 10ΔfolT – 10logs - 2 доза	7,7 %
2	15	Штамм 10ΔfolT – 10logs - 1 доза	40,0 %
3	15	Плацебо [отрицательный контроль]	93,3 %

Таблица 19

Процент животных, демонстрирующих ненормальное поведение после заражения (CBS 140425)

Группа	Кол-во свиней	Вакцина	Процент свиней, демонстрирующих ненормальное поведение
1	13	Штамм 10ΔfolT – 10logs - 2 доза	0 %
2	15	Штамм 10ΔfolT – 10logs - 1 доза	46,7 %
3	15	Плацебо [отрицательный контроль]	100 %

Таблица 20

Процент животных, которые умерли или были умерщвлены после заражения (смертность) (CBS 140425)

Группа	Кол-во свиней	Вакцина	Смертность (%)
1	13	Штамм 10ΔfolT – 10logs - 2 доза	0 %
2	15	Штамм 10ΔfolT – 10logs - 1 доза	26,7 %
3	15	Плацебо [отрицательный контроль]	100 %

Таблица 21

Процент животных с патологическими изменениями в мозге при вскрытии (CBS 140425)

Группа	Кол-во свиней	Вакцина	Процент свиней с патологическими изменениями в ЦНС (%)
1	13	Штамм 10 Δ folT – 10logs - 2 доза	0 %
2	15	Штамм 10 Δ folT – 10logs - 1 доза	26,7 %
3	15	Плацебо [отрицательный контроль]	93,3 %

Таблица 22

Процент животных с патологическими изменениями в грудной полости при вскрытии (CBS 140425)

Группа	Кол-во свиней	Вакцина	Процент свиней с поражениями в грудной полости (%)
1	13	Штамм 10 Δ folT – 10logs - 2 доза	23,1 %
2	15	Штамм 10 Δ folT – 10logs - 1 доза	33,3 %
3	15	Плацебо [отрицательный контроль]	93,3 %

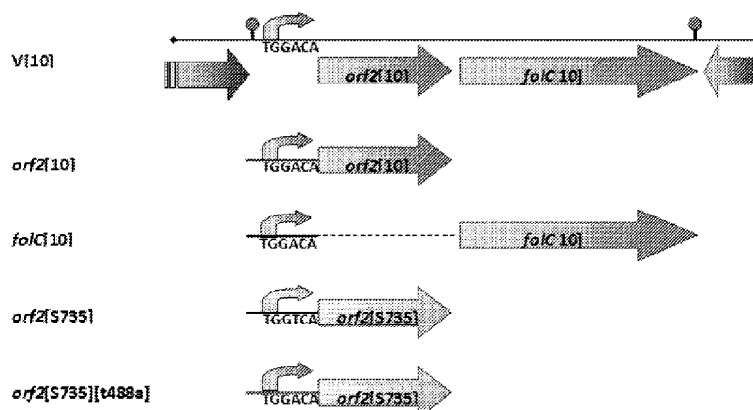
Таблица 23

Процент животных, у которых *S. suis* был обнаружен в образце мозга (CBS 140425)

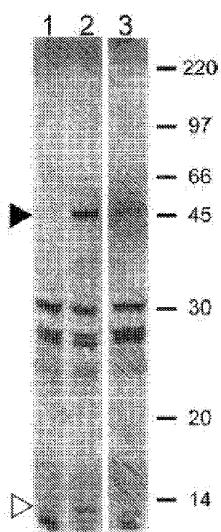
Группа	Кол-во свиней	Вакцина	<i>S. suis</i> обнаружен в образце ЦНС (%)
1	13	Штамм 10 Δ folT – 10logs - 2 доза	0 %
2	15	Штамм 10 Δ folT – 10logs - 1 доза	6,7 %
3	15	Плацебо [отрицательный контроль]	73,3 %

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный мутант Δ FolT бактерии *Streptococcus suis* (*S.suis*), обладающий сниженной способностью транспорта фолата в сравнении с диким типом, в котором указанная способность была снижена путем удаления или инактивации гена *S.suis*, кодирующего функции транспортера фолата (FolT).
2. Рекомбинантный мутант Δ FolT по п.1, обладающий способностью синтезировать фолат.
3. Рекомбинантный мутант Δ FolT по п.1 или 2, характеризующийся сниженной экспрессией FolT.
4. Рекомбинантный мутант Δ FolT по любому из пп.1-3, характеризующийся мутацией или делецией пептидного домена FYRKP или в нем, или вставкой в пептидном домене FYRKP.
5. Рекомбинантный мутант Δ FolT по любому из пп.1-4, депонированный как "мутант *Streptococcus suis* Δ FolT CBS 140425" в Centraalbureau voor Schimmelcultures 19 августа 2015 года.
6. Рекомбинантный мутант Δ FolT по любому из пп.1-5, депонированный как "мутант *Streptococcus suis* Δ FolT2 CBS 143192" в Westerdijk Fungal Biodiversity Institute 25 августа 2017 года.
7. Композиция, содержащая бактерию по любому из пп.1-6.
8. Иммуногенная композиция, содержащая бактерию по любому из пп.1-6.
9. Вакцина, содержащая бактерию по любому из пп.1-6.
10. Набор для вакцинации свиньи от заболевания, связанного с инфекцией *Streptococcus suis*, включающий:
 - дозатор для введения вакцины свинье;
 - рекомбинантный мутантный штамм Δ FolT по любому из пп.1-6 и, предпочтительно, инструкцию.
11. Рекомбинантный мутант Δ FolT по любому из пп.1-6, в котором аминокислота R в пептидном домене FYRKP подверглась мутации.

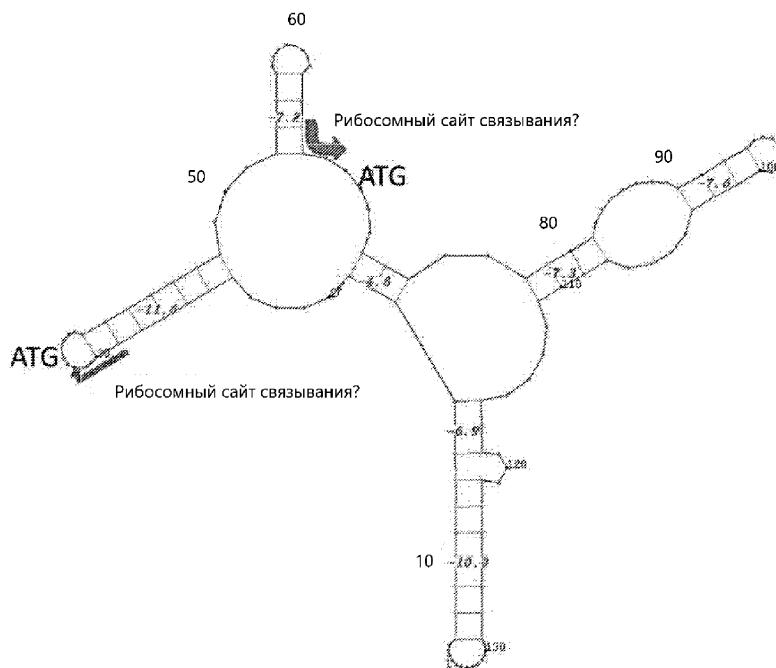


Фиг. 1

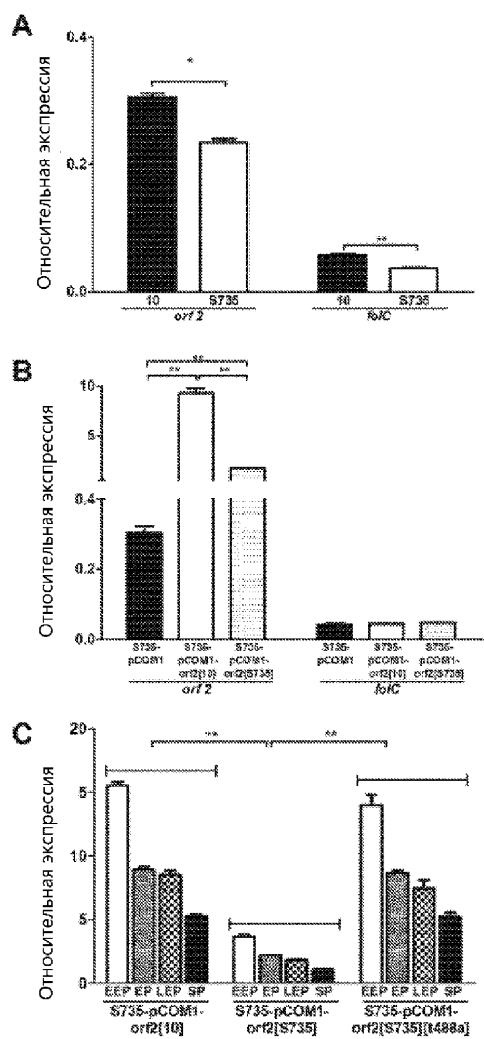


Фиг. 2

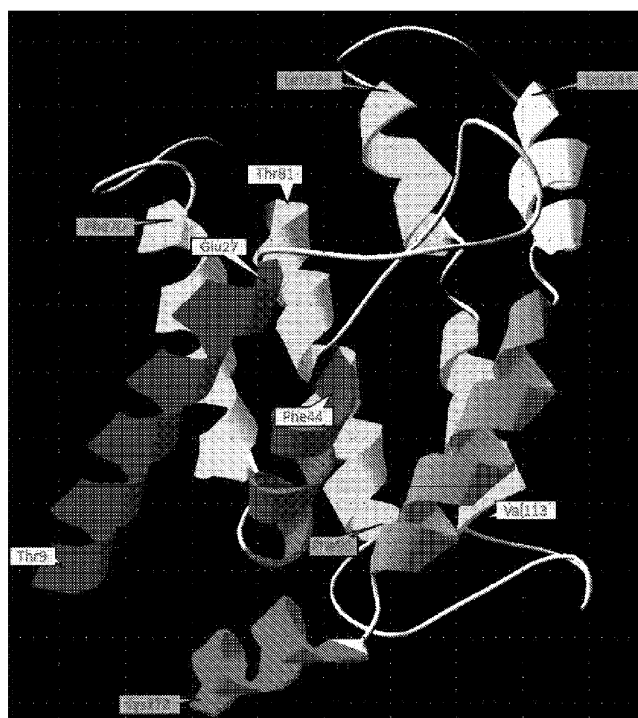
Свободная энергия структуры = -19 ккал/моль



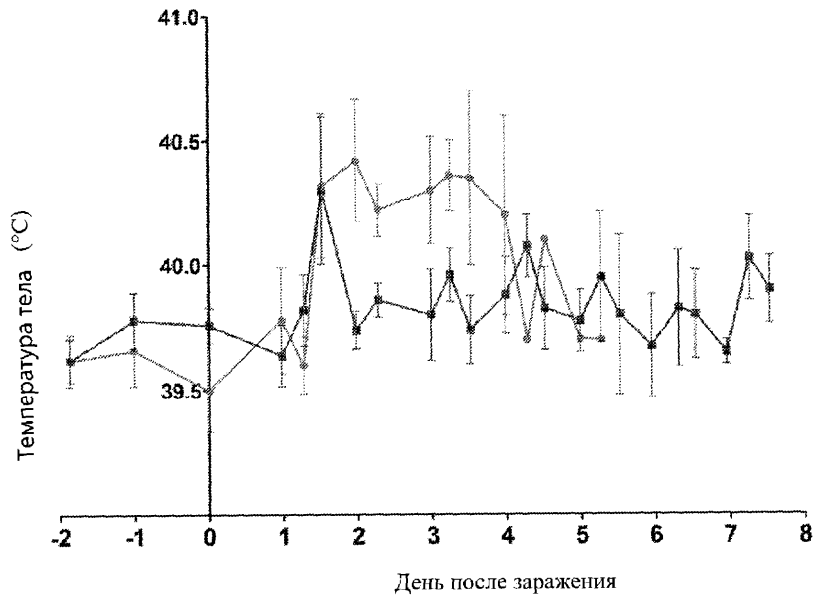
Фиг. 3



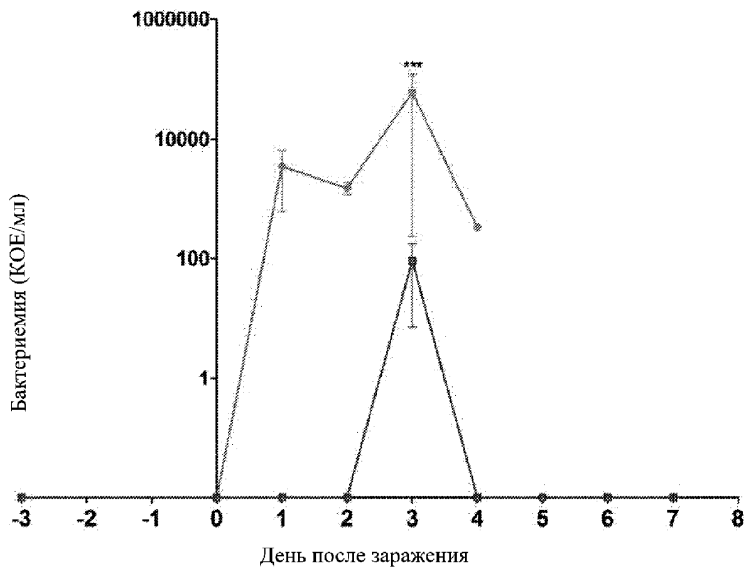
Фиг. 6



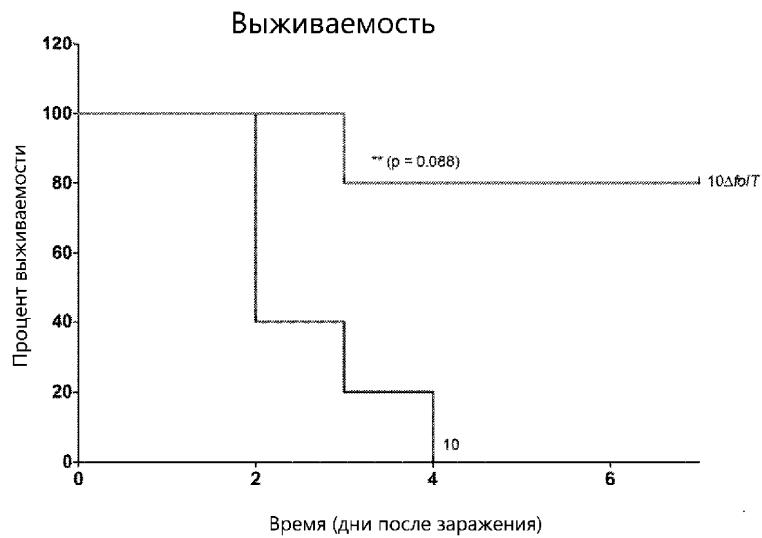
Фиг. 7



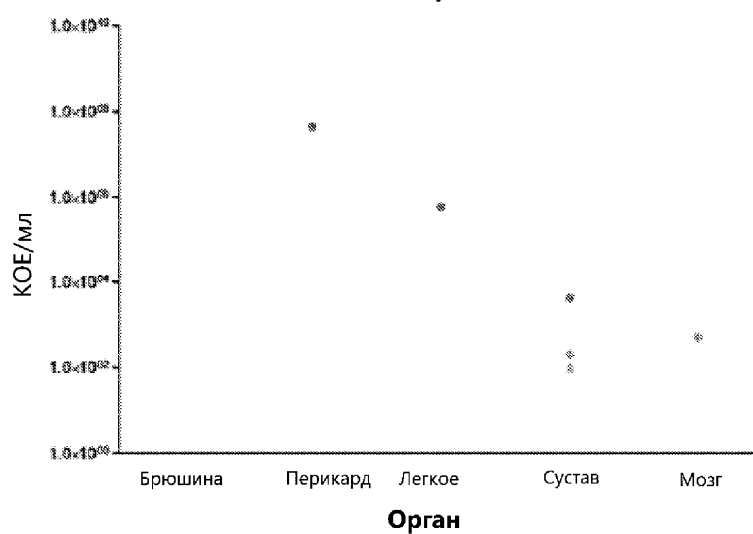
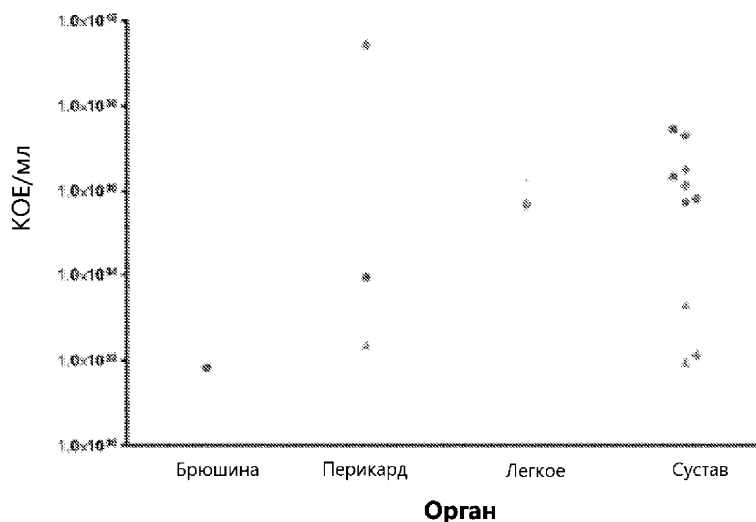
Фиг. 8



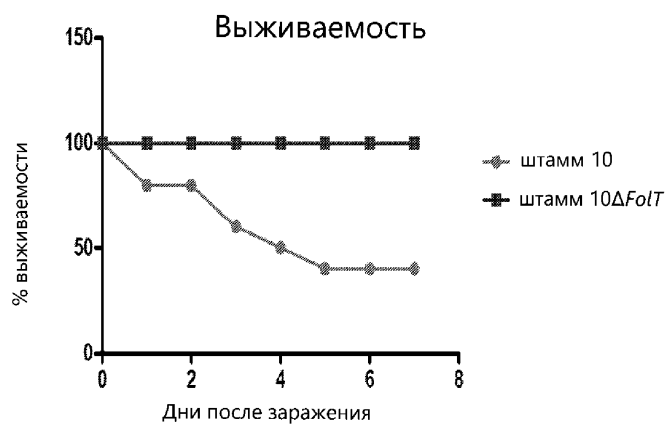
Фиг. 9



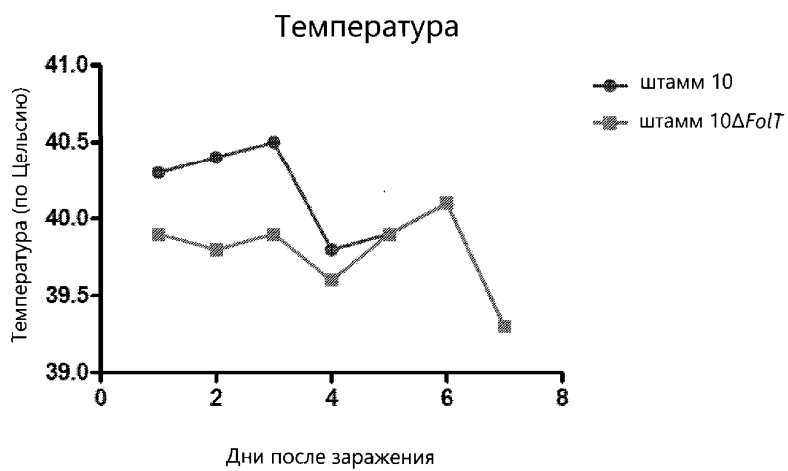
Фиг. 10



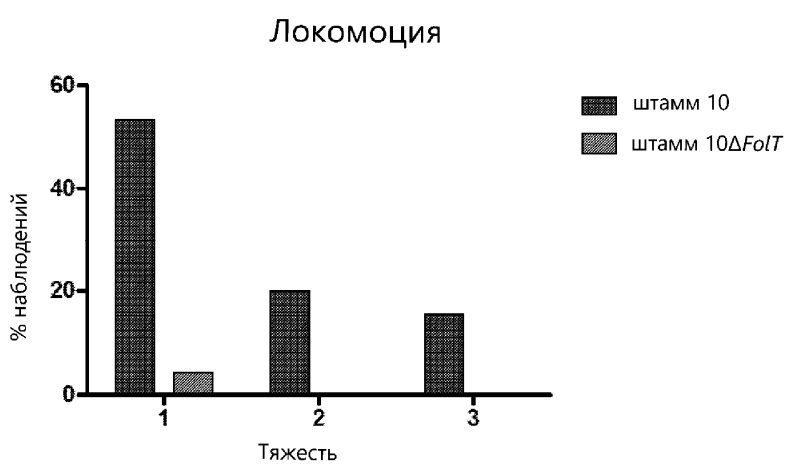
Фиг. 11



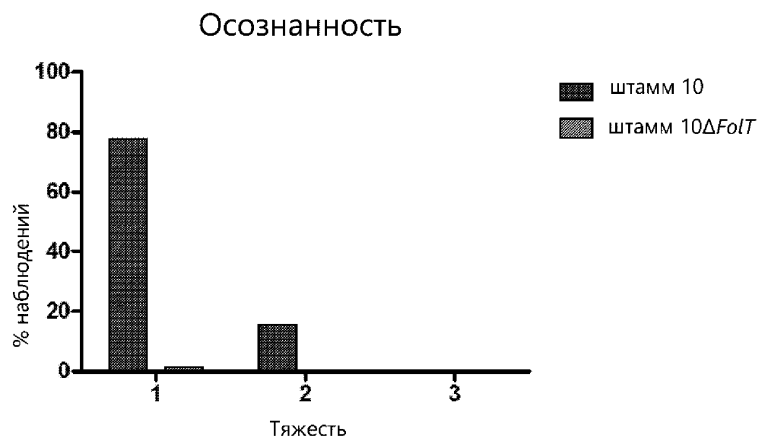
Фиг. 12



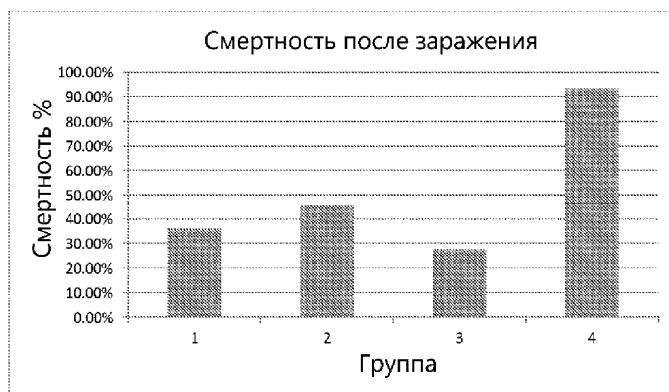
Фиг. 13



Фиг. 14

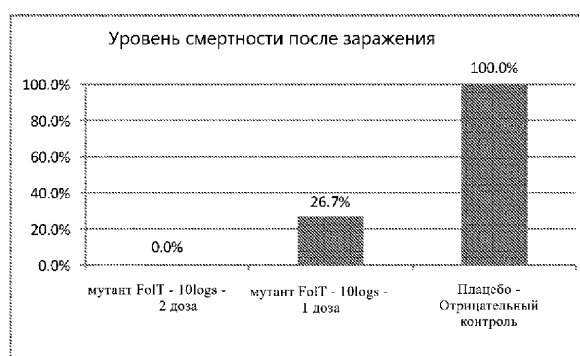


Фиг. 15



Фиг. 16

Уровень смертности (CSB 140425)



Фиг. 17

