

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392428** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2024.04.22

(51) Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)  
*C07K 14/315* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.03.29

(54) **ИММУНОГЕННЫЙ СЛИТЫЙ БЕЛОК**

(31) 21165674.9

(72) Изобретатель:

(32) 2021.03.29

**Педерсен Фишер Пер Бо (DK)**

(33) EP

(74) Представитель:

(86) PCT/EP2022/058309

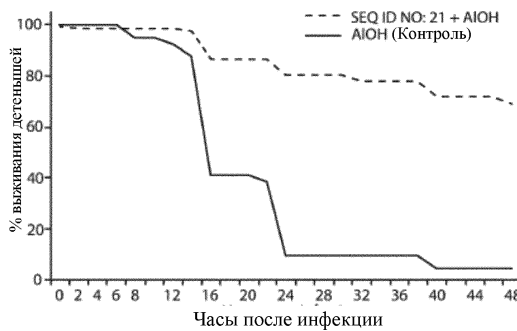
**Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.  
(RU)**

(87) WO 2022/207657 2022.10.06

(71) Заявитель:

**МИНЕРВАКС АПС (DK)**

(57) Настоящее изобретение относится к иммуногенному слитому белку, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности, состоящей из: (1) первой части аминокислотной последовательности, состоящей из 170-178 аминокислот, предпочтительно 174-175 аминокислот, и имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7; (2) второй части аминокислотной последовательности, состоящей из 165-174 аминокислот, предпочтительно 169-170 аминокислот, и имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14; и возможно: (3) линкерной части аминокислотной последовательности, состоящей из 1-20 аминокислот и отделяющей первую часть аминокислотной последовательности от второй части аминокислотной последовательности. Иммуногенный слитый белок предпочтительно состоит из 335-372 аминокислот, предпочтительно 343-353 аминокислот, более предпочтительно 343-347 аминокислот. Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный иммуногенный слитый белок; вектору; клетке-хозяину; вакцине; и способу вакцинации против инфицирования Streptococcus группы В или лечению инфекции Streptococcus группы В.



**A1**

**202392428**

**202392428**

**A1**

## ИММУНОГЕННЫЙ СЛИТЫЙ БЕЛОК

### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к областям микробиологии и вакцинной технологии и относится к разработке иммуногенного слитого белка, способного обеспечивать иммунитет против инфицирования *Streptococcus* группы В. Более конкретно, настоящее изобретение относится к иммуногенному слитому белку, который обеспечивает иммунитет против инвазивных штаммов *Streptococcus* группы В. Также оно относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный иммуногенный слитый белок; вектору; клетке хозяину; вакцине; и способу вакцинации против инфицирования *Streptococcus* группы В или лечению инфекции *Streptococcus* группы В.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Группа В *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) (GBS) представляет собой основную причину инвазивных бактериальных инфекций, включающих менингит, в неонатальном периоде. В одних только Соединенных Штатах в настоящее время имеется приблизительно 5000 случаев в год инвазионного заболевания, вызванного этой бактерией. Эти инфекции имеют общую смертность приблизительно 10%, и многие из младенцев, которые выживают, имеют постоянные неврологические последствия. Ввиду этого были приложены большие усилия для того, чтобы найти способы предупреждения и лечения, и чтобы проанализировать механизмы, посредством которых GBS вызывают инфекции.

GBS также может вызывать мастит у коров, представляющий собой заболевание крупного рогатого скота, которое имеет существенное экономическое значение. Таким образом, разработка вакцины против инфекций GBS представляет интерес также для ветеринарной медицины.

Приблизительно 20% всех женщин являются вагинальными носителями GBS, и вертикальная передача из половых путей матери, вероятно, является наиболее распространенным источником инфекции при неонатальном заболевании, вызванном этой бактерией. Тем не менее, только приблизительно 1% младенцев, которые колонизированы GBS при рождении, страдают от серьезной инфекции. Таким образом,

другие факторы, отличающиеся от воздействия бактерии во время рождения, должны вносить вклад в развитие неонатального заболевания.

Стрептококковые штаммы группы В делятся на девять серотипов (Ia, Ib и P-VIII) на основе структуры полисахаридной капсулы. Четыре “классических” серотипа Ia, Ib, II и III встречаются приблизительно в равных пропорциях среди штаммов в нормальной флоре, но тип III представляет собой клинически наиболее важный серотип, в частности, поскольку он вызывает большинство случаев менингита. Поскольку капсула является известным фактором вирулентности, она была изучена достаточно подробно, в частности в штаммах типа III. Были предприняты усилия для разработки вакцины, в которой полисахаридная капсула III типа была бы существенным компонентом.

В EP 0866133 раскрыта вакцина, способная защищать реципиента от инфекции, вызванной *Streptococcus* группы В. Изобретение относится к использованию комбинации полисахарида и фрагмента белка эписон. Дополнительно раскрыто, что эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что специфическая для типа капсула играет важную роль в иммунитете против инфекций *Streptococcus* группы В (см. стр. 7, строки 2-3). Кроме того, существует множество различных комбинаций между различными белками и полисахаридами, упомянутыми в этой заявке, но все пункты формулы изобретения содержат полисахарид, который демонстрирует важность этого конкретного компонента. Тем не менее, использование полисахаридной капсулы в качестве вакцины может привести к проблемам вследствие перекрестных реакций с человеческими тканями (Pritchard et al., Infect Immun 1992. 60: 1598). Поэтому было бы очень полезно, если бы можно было разработать вакцину, основанную на белках, а не на полисахаридах.

В публикации Gravekamp et al., Infection and Immunity, Dec 1997, p 5216-5221 раскрыта оценка иммуногенности, а также защита множества повторов альфа ( $\alpha$ ) С-белка, а также N-концевого фрагмента в отдельности. Было обнаружено, что иммуногенность уменьшается с увеличением числа повторов (см. фиг. 2B). Тем не менее, в анализе защиты было также обнаружено, что антитела против N-концевой области были преимущественно ответственны за защиту по сравнению с антителами против N-концевой области (см. стр. 5219, левый столбец, строку 6 снизу, и стр. 5220, правый столбец, строки 26-29).

В WO 9410317 описано использование белка альфа, представляющего собой

белок поверхности GBS, при разработке конъюгатной вакцины. Недостаток этого белка заключается в том, что он обычно не экспрессируется штаммами III типа, которые представляют собой причину многих серьезных инфекций GBS. Следовательно, защитный иммунитет против этих штаммов не будет вызван альфа-белковой вакциной.

В WO 9421685 описано применение белка Rib, представляющего собой белок поверхности GBS, при разработке вакцины. Этот белок вызывает иммунитет при введении с квасцами. Тем не менее, белок Rib имеет недостаток, заключающийся в том, что он не вызывает защитный иммунитет против всех штаммов GBS.

В документе Lindahl et al, Nonimmunodominant Regions Are Effective As Building Blocks In A Streptococcal Fusion Protein Vaccine, Cell Host & Microbe 2, 427-434, December 2007, раскрыт слитый белок, содержащий N-концевые области поверхностных белков Rib и AlpC *Streptococcus* группы B.

Аналогично, в WO 2008127179 описан слитый белок, содержащий по меньшей мере одну первую часть N-концевой области белка поверхности *Streptococcus* группы B или аналогичную, гомологичную, производную или иммунологически связанную аминокислотную последовательность или их фрагменты, который слит с по меньшей мере одним вторым фрагментом N-концевой области белка поверхности *Streptococcus* группы B или аналогичной, гомологичной, производной или иммунологически связанной аминокислотной последовательностью или их фрагментами, где первый и второй фрагменты по меньшей мере одной N-концевой области белка поверхности *Streptococcus* группы B получены из различных штаммов *Streptococcus* группы B, и где слитый белок способен вызывать защитный иммунитет против *Streptococcus* группы B.

Несмотря на достижения в продвижении к вакцине, подходящей для предупреждения заболевания GBS, все еще существует потребность в дополнительных способах и вакцинах для предупреждения и лечения инфекций GBS. Таким образом, остается потребность в исследовании стратегий вакцин, способных вызывать защитный иммунитет против широкого диапазона штаммов GBS.

Соответственно, первичная задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить иммуногенный слитый белок, который может быть использован в вакцине, способной вызывать защитный иммунитет против инфекций GBS.

Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить вакцину, которая вызывает защитный иммунитет против многих клинически важных штаммов GBS.

Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить вакцину, содержащую один или несколько иммуногенных слитых белков, которая вызывает защитный иммунитет против инфекций GBS. Один или несколько белков обладают несколькими преимуществами по сравнению с вакциной, состоящей из множества белков, например, стоимостью получения и безопасностью.

Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить иммуногенный слитый белок, способный обеспечивать улучшенную защиту против GBS.

Средства реализации каждой из указанных выше задач, а также другие будут понятны из описания изобретения, которое следует далее.

### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение основано на дополнительном исследовании, проведенном автором настоящего изобретения, в отношении слитого белка, раскрытого в WO 2008127179. В частности, обнаружено, что подходящим является иммуногенный слитый белок с более короткой аминокислотной последовательностью N-концевых областей в Rib и AlpC. Такой иммуногенный слитый белок может быть легче получен и использован для вакцинации. Кроме того, как представлено в Примерах 4 и 5, такой более короткий слитый белок будет обеспечивать улучшенную защиту против GBS, в частности путем обеспечения улучшенной защиты против адгезии к эндотелиальным клеткам и/или инвазии в них.

Дополнительно, разработаны соответствующие молекулы нуклеиновой кислоты с оптимизированными кодонами, кодирующие указанный иммуногенный слитый белок. Они могут быть представлены в векторе. Клетка-хозяин, в свою очередь, может экспрессировать указанный иммуногенный слитый белок или содержать указанный вектор. Каждое из указанного иммуногенного слитого белка, указанной молекулы нуклеиновой кислоты, указанного вектора и указанной клетки-хозяина может быть использовано в вакцине. Указанные иммуногенный слитый белок, молекула нуклеиновой кислоты, вектор, клетка-хозяин и/или вакцина дополнительно могут быть использованы в способе вакцинации против инфицирования *Streptococcus* группы В или для лечения инфекции *Streptococcus* группы В.

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к иммуногенному слитому белку, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности, состоящей из:

1. первой части аминокислотной последовательности, состоящей из 170-178 аминокислот, предпочтительно 174-175 аминокислот и имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7;

2. второй части аминокислотной последовательности, состоящей из 165-174 аминокислот, предпочтительно 169-170 аминокислот и имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14; и возможно:

3. линкерной части аминокислотной последовательности, состоящей из 1-20 аминокислот и отделяющей первую часть аминокислотной последовательности от второй части аминокислотной последовательности,

и где указанный иммуногенный слитый белок предпочтительно состоит из 335-372 аминокислот, предпочтительно 343-353 аминокислот, более предпочтительно 343-347 аминокислот.

Как указано выше, указанный иммуногенный слитый белок может быть легче получен и использован для вакцинации. Указанный иммуногенный слитый белок обладает преимуществом, заключающемся в том, что он является иммуногенным даже без адъюванта, тем не менее, для увеличения иммуногенности он также может быть использован с адъювантом, таким как квасцы или гидроксид алюминия (AlOH).

Еще одно преимущество указанного иммуногенного слитого белка заключается в том, что его можно комбинировать с дополнительным иммуногенным слитым белком, содержащим N-концевые области Alp1 и Alp2. Как видно из примеров, комбинация двух таких иммуногенных слитых белков обеспечивает синергический эффект в отношении количества антител (титры антител), которые достигаются тогда, когда комбинацию используют для иммунизации.

Настоящее изобретение будет подробно описано ниже.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 демонстрирует кратность увеличения IgG, достигаемую через 29 суток после иммунизации с использованием одной дозы иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения либо в отдельности, либо в комбинации с дополнительным иммуногенным слитым белком, включенным в вакцину в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения, в различных дозах с адъювантом или без него.

Фиг. 2 демонстрирует кратность увеличения IgG, достигаемую через 57 суток после иммунизации с использованием первой дозы и второй дозы иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения либо в отдельности, либо в комбинации с дополнительным иммуногенным слитым белком, включенным в вакцину в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения, в различных дозах с адьювантом или без него.

Фиг. 3 демонстрирует выживание детенышей мышей после неонатальной бактериальной инфекции штаммом VM110 *Streptococcus* группы В ( $8 \times 10^3$  КОЕ). Детеныши родились от самок мышей, иммунизированных а) иммуногенным слитым белком с SEQ ID NO: 21 вместе с адьювантным гидроксидом алюминия (AlOH), б) или контролем (только адьювантным гидроксидом алюминия).

Фиг. 4А-4Е демонстрируют результаты исследования инвазии, достигаемой с использованием клинических изолятов и антисывороток для человеческих эпителиальных клеток в результате иммунизации с использованием иммуногенного слитого белка с SEQ ID NO: 21.

Фиг. 5А-5С демонстрируют представления слитого белка в соответствии с WO2008127179, включающего лидерную последовательность с SEQ ID NO: 43 и более короткую аминокислотную последовательность слитого белка в соответствии с SEQ ID NO: 21.

Фиг. 6 демонстрирует взаимодействие между более коротким слитым белком с SEQ ID NO: 21 и  $\alpha 1\beta 1$ -интегрином

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В данном описании изобретения, если не указано иное, то формы единственного числа обозначают “один или более чем один”.

В данном описании изобретения любые и все ссылки конкретно включены в данную заявку на патент путем ссылки.

В соответствии с вышеизложенным, первый аспект настоящего изобретения относится к иммуногенному слитому белку, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности, состоящей из:

1. первой части аминокислотной последовательности, состоящей из 170-178 аминокислот, предпочтительно 174-175 аминокислот и имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7;

2. второй части аминокислотной последовательности, состоящей из 165-174 аминокислот, предпочтительно 169-170 аминокислот и имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14; и возможно:

3. линкерной части аминокислотной последовательности, состоящей из 1-20 аминокислот и отделяющей первую часть аминокислотной последовательности от второй части аминокислотной последовательности,

и где указанный иммуногенный слитый белок предпочтительно состоит из 335-372 аминокислот, предпочтительно 343-353 аминокислот, более предпочтительно 343-347 аминокислот.

Термин “иммуногенный” предназначен для того, чтобы обозначать способность вызывать иммунный ответ. Иммуногенный слитый белок в соответствии с изобретением является иммуногенным и характеризуется способностью вызывать защитный иммунный ответ против по меньшей мере GBS, содержащих поверхностные белки, N-концевые области которых содержатся в иммуногенном слитом белке. Запуск защитного иммунитета против *Streptococcus* группы В понимается как включающая запуск защитного иммунитета против *Streptococcus* группы В, несущей по меньшей мере один из поверхностных белков Rib и AlpC. “Способный” означает, что иммуногенный слитый белок, если его вводить в подходящей дозе индивиду, обладающему иммунной системой, вызывает защитный иммунитет у этого индивида. Иммуногенный слитый белок предпочтительно способен вызывать защитный иммунитет против *Streptococcus* группы В.

Термин “защитный иммунитет” в отношении настоящего изобретения относится к способности антител сыворотки крови и/или ответу цитотоксических Т-клеток, индуцированных во время иммунизации, защищать (частично или полностью) против заболевания, вызванного инфекционным агентом, таким как *Streptococcus* группы В. То есть позвоночное животное, иммунизированное вакцинами в соответствии с изобретением, будет подвергаться ограниченному росту и распространению *Streptococcus* группы В. Для определения того, индуцирован ли защитный иммунитет слитым белком или вакциной, могут быть использованы способы, хорошо известные специалисту в данной области техники. Например, для определения того, индуцирует ли иммунизация слитым белком или вакциной в соответствии с изобретением защитный иммунитет против инфекции *Streptococcus* группы В, иммунизированные



испытываемые животные могут быть сенсibilизированы *Streptococcus* группы В, и могут быть измерены рост и распространение *Streptococcus* группы В. Например, для определения того, индуцирован ли защитный иммунитет, могут быть использованы способы в соответствии со способами, описанными в примерах ниже.

Для задачи настоящего изобретения термин “слитый белок” относится к ассоциации двух или более чем двух белковых областей или их фрагментов. В соответствии с указанным выше иммуногенный слитый белок содержит (или предпочтительно состоит из) аминокислотной последовательности, состоящей из по меньшей мере первой и второй частей аминокислотной последовательности. Эти фрагменты связаны с N-концевыми областями поверхностных белков Rib и AlpC *Streptococcus* группы В, соответственно.

Комбинация частей аминокислотной последовательности для получения слитого белка может быть осуществлена путем слияния, т.е. соединения частей аминокислотной последовательности вместе по одному или обоим их концам (ковалентное сочетание, связь, связывание или конъюгация), или путем соединения вместе отдельных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих соответствующие части аминокислотной последовательности, таким образом, что продуцируется один непрерывный продукт экспрессии, когда транслируются соединенные молекулы нуклеиновой кислоты.

В слитом белке первая и вторая части аминокислотной последовательности могут быть разделены линкерной частью аминокислотной последовательности.

Дополнительно в контексте настоящего изобретения предполагается, что слитый белок может быть получен путем перекрестного связывания частей аминокислотной последовательности или их захвата на макромолекулярной структуре.

Для задачи настоящего изобретения термин “белок” относится к молекулярной цепи аминокислот. Белок не имеет определенной длины, и может, если требуется, быть модифицирован *in vivo* или *in vitro*, путем, например, гликозилирования, амидирования, карбоксилирования или фосфорилирования. Среди прочего, в определение включены пептиды, олигопептиды и полипептиды.

Термин “N-концевая область” в связи с настоящим изобретением относится к N-концевой области (N) белка.

Штаммы *Streptococcus* группы В, также называемые здесь как GBS, известны и могут быть выделены из крови инфицированных людей. GBS является наиболее

распространенной причиной неонатального сепсиса в Соединенных Штатах и ответственен за приблизительно 5000 случаев в год.

Обозначение “*Streptococcus* группы В” происходит из того факта, что стрептококки были разделены на иммунологические группы на основании присутствия специфических углеводных антигенов на их клеточных поверхностях. В настоящее время выделяют группы от А до О.

Белок Rib *Streptococcus* группы В, также называемый в данном описании изобретения как Rib и белок Rib, представляет собой поверхностный белок, известный в области техники, и, например, описанный в WO 9421685. Обозначение “Rib” относится к: устойчивости к протеазам, иммунитету и группе В. Белок Rib был впервые выделен из стрептококкового штамма группы В, имеющего серотип III, как отдельный белок массой 95 кДа. Белок Rib экспрессируют почти все стрептококковые штаммы группы В, имеющие клинически важный серотип III, которые вызывают наибольшее количество случаев менингита, и некоторыми штаммами других серотипов, таких как II. Кроме того, Rib экспрессируют все штаммы гипервирулентного клона типа III. Был разработан способ очистки белка Rib, и было продемонстрировано, что антитела к этому белку защищают против смертельного инфицирования штаммами, экспрессирующими белок Rib (более подробную информацию, такую как последовательности ДНК и белка, см. в WO 9421685).

SEQ ID NO: 7 демонстрирует более короткую N-концевую область Rib:

MAEVISGSAVTLNTNMTKNVQNGRAYIDLVDVKNKIDPLQLITLNSPDLKA  
QYVIRQGGNYFTQPSELTTVGAASINYTVLKTGSPHTKPDGQVDIINVSLTIYNSSAL  
RDKIDEVKKKAEDPKWDEGSRDKVLISLDDIKTDIDNNPKTQSDIANKITEVTNLEKIL  
VPRIP

Молекулы нуклеиновой кислоты ДНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, представлены в SEQ ID NO: 1, 3, 5, где SEQ ID NO: 3 оптимизирована по кодомам для экспрессии в *E. coli*, а SEQ ID NO: 5 оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичника китайского хомячка).

Соответствующие молекулы нуклеиновой кислоты РНК кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 представлены в SEQ ID NO: 2, 4, 6, где SEQ ID NO: 4 оптимизирована по кодомам для экспрессии в *E. coli*, а SEQ ID NO: 6 оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичника китайского хомячка).

Различие между более короткой N-концевой областью Rib, т.е. SEQ ID NO: 7, и последовательностью, приведенной для N-конца Rib в WO 2008127179, представляет собой лидерную последовательность длиной 5 аминокислот GPLGS, SEQ ID NO: 44.

Белок AlpC *Streptococcus* группы B, также известный как белок альфа, представляет собой белок поверхности *Streptococcus* группы B, известный в области техники. В WO 9410317 описана композиция конъюгатной вакцины, содержащая белок альфа. Нативный белок-предшественник AlpC *Streptococcus* группы B, описанный в WO 9410317, имеет молекулярную массу 108 кДа. Отщепление предполагаемой сигнальной последовательности из 41 аминокислоты позволяет получать зрелый белок массой 104 кДа. (Тем не менее, следует отметить, что впоследствии было продемонстрировано, что сигнальная последовательность имеет длину 56 аминокислотных остатков: Stålhammar-Carlemalm et al., J Exp Med 177,1593; 1993). N-концевая область антигена AlpC массой 20 кДа не демонстрирует гомологии с ранее описанными белковыми последовательностями, и за ней следует серия из девяти tandemных повторяющихся единиц, которые составляют до 74% зрелого белка. Каждая повторяющаяся единица (обозначенная здесь как "R") идентична и состоит из 82 аминокислот с молекулярной массой приблизительно 8500 дальтон, которые кодируются 246 нуклеотидами. С-концевая область антигена AlpC содержит мотив якорного домена клеточной стенки, присутствующий в ряде грамположительных белков поверхности.

SEQ ID NO: 14 демонстрирует более короткую N-концевую область AlpC:

STIPGSAATLNTSITKNIQNGNAYIDLVDVKGKIDPLQLIVLEQGFTAKYVFRQ  
GTKYYGDVSQLQSTGRASLTYNIFGEDGLPHVKTGQIDIVSVALTIYDSTTLRDKIEE  
VRTNANDPKWTEESRTEVLTGLDTIKTDIDNNPKTQTDIDSKIVEVNELEKLLVLS

Различие между более короткой N-концевой областью AlpC, т.е. SEQ ID NO: 14, и последовательностью, приведенной для N-конца AlpC в WO 2008127179, представляет собой лидерную последовательность длиной 5 аминокислот GPLGS, SEQ ID NO: 44.

Молекулы нуклеиновой кислоты ДНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, представлены в SEQ ID NO: 8, 10, 12, где SEQ ID NO: 10 оптимизирована по кодонам для экспрессии в *E. coli*, а SEQ ID NO: 12 оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичника китайского хомячка).

Соответствующие молекулы нуклеиновой кислоты РНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, представлены в SEQ ID NO: 9, 11, 13, где SEQ ID NO: 11 оптимизирована по кодонам для экспрессии в *E. coli*, а SEQ ID NO: 13 оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичника китайского хомячка).

Термин “идентичность последовательности” указывает на количественную меру степени гомологии между двумя аминокислотными последовательностями равной длины или между двумя нуклеотидными последовательностями равной длины. Если две сравниваемые последовательности не имеют равной длины, то они должны быть выровнены для наилучшего возможного соответствия. Идентичность последовательности может, например, быть рассчитана программой BLAST, программой BLASTP или программой BLASTN (Pearson W. R и D. J. Lipman (1988) PNAS USA 85:2444-2448) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

Предпочтительно иммуногенный слитый белок состоит из аминокислотных последовательностей.

Первая часть аминокислотной последовательности, состоящая из 170-178 аминокислот, предпочтительно 174-175 аминокислот, имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с полной длиной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

Вторая часть аминокислотной последовательности, состоящая из 165-174 аминокислот, предпочтительно 169-170 аминокислот, имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с полной длиной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

Первая часть аминокислотной последовательности должна состоять максимально из 178 аминокислот, например 170-178 аминокислот, предпочтительно 174-175 аминокислот. В соответствии с указанным, SEQ ID NO: 7 содержит 175 аминокислот. Первый М в последовательности является необязательным, таким образом, приводя в результате к 174 аминокислотам в этих случаях.

Первая часть аминокислотной последовательности имеет по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7.

Вторая часть аминокислотной последовательности должна состоять

максимально из 174 аминокислот, такой как 165-174 аминокислот, предпочтительно 169-170 аминокислот. В соответствии с указанным, SEQ ID NO: 14 содержит 170 аминокислот. Первый А в последовательности может быть необязательным, таким образом, приводя в результате к 169 аминокислотам в этих случаях.

Вторая часть аминокислотной последовательности имеет по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14.

Линкерная часть аминокислотной последовательности является необязательной. Другими словами, линкерная часть аминокислотной последовательности, если включена, может состоять из от 0 до 20 аминокислот. Аминокислоты в линкерной части аминокислотной последовательности могут быть выбраны произвольным образом, т.е. с получением конформации произвольной спирали. Линкерная часть аминокислотной последовательности, если присутствует, отделяет первую часть аминокислотной последовательности от второй части аминокислотной последовательности. Другими словами, линкерная часть аминокислотной последовательности обеспечена между первой частью аминокислотной последовательности и второй частью аминокислотной последовательности.

Любая из первой и второй частей аминокислотных последовательностей могут быть обеспечены с частью лидерной/последующей аминокислотной последовательности по концу, наиболее удаленному от другой из первой и второй частей аминокислотных последовательностей. Указанная часть лидерной/последующей аминокислотной последовательности может содержать одну или более чем одну аминокислоту.

Иммуногенный слитый белок предпочтительно состоит из 335-372 аминокислот, предпочтительно 343-353 аминокислот, более предпочтительно 343-347 аминокислот.

В предпочтительном воплощении иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения:

- первая часть аминокислотной последовательности содержит или предпочтительно состоит из аминокислот 1-175 или 2-175 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и

- вторая часть аминокислотной последовательности содержит или предпочтительно состоит из аминокислот 1-170 или 2-170 последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 14.

SEQ ID NO: 7 содержит 175 аминокислот. Аминокислоты 2-175 соответствуют последовательности аминокислот в SEQ ID NO: 7 за исключением первого метионина (M)

В предпочтительном воплощении иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения аминокислотная последовательность содержит линкерную часть аминокислотной последовательности, и указанная линкерная часть аминокислотной последовательности состоит из 1-10 аминокислот, предпочтительно 2-5 аминокислот, более предпочтительно 2 аминокислот, и наиболее предпочтительно аминокислотной последовательности EF.

Когда линкерная часть аминокислотной последовательности состоит из аминокислот EF (глутамат-фенилаланин), тогда предпочтительно, чтобы вторая часть аминокислотной последовательности содержала или предпочтительно состояла из аминокислот 2-170 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

Предпочтительно иммуногенный слитый белок имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с, предпочтительно всей, аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21.

В предпочтительном воплощении иммуногенный слитый белок состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 21, или, в качестве альтернативы, иммуногенный слитый белок состоит из аминокислот 2-347 SEQ ID NO: 21.

Как представлено в графических материалах, такой иммуногенный слитый белок является более коротким, чем иммуногенный слитый белок, раскрытый в WO 2008127179, в то же время, обладает хорошим действием и подходит для применения в вакцине против GBS.

Кроме того, как представлено в Примерах 4 и 5, такая более короткая аминокислотная последовательность за счет удаления лидерной последовательности SEQ ID NO: 43, будет более эффективной и улучшенной в обеспечении защиты против GBS, в частности путем обеспечения более эффективной и/или улучшенной защиты против адгезии к эндотелиальным клеткам и/или инвазии в них.

SEQ ID NO: 21 соответствует аминокислотной последовательности:

MAEVISGSAVTLNTNMTKNVQNGRAYIDLVDVKNKIDPLQLITLNSPDLKA  
QYVIRQGGNYFTQPSELTTVGAASINYTVLKTGSPHTKPDGQVDIINVSLTIYNSSAL

RDKIDEVKKKAEDPKWDEGSRDKVLISLDDIKTDIDNNPKTQSDIANKITEVTNLEKIL  
VPRIFEFSSTIPGSAATLNTSITKNIQNGNAYIDLVDVCLGKIDPLQLIVLEQGFTAKYVF  
RQGTKYYGDVSQLQSTGRASLTYNIFGEDGLPHVKTDGQIDIVSVALTIYDSTTLRDK  
IEEVRTNANDPKWTEESRTEVLTGLDTIKTDIDNNPKTQTDIDSKIVEVNELEKLLVLS

Различие между более коротким слитым белком в соответствии с SEQ ID NO: 21 и последовательностью, приведенной для слитого белка по WO 2008127179, представляет собой лидерную последовательность длиной 32 аминокислоты: GPLGSASVLIGISFLGGFTQGQFNISTDTVF – SEQ ID NO: 43, последовательность которой не обнаружена в SEQ ID NO: 21.

В еще одном воплощении иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения иммуногенный слитый белок модифицирован путем гликозилирования, амидирования, карбоксилирования или фосфорилирования, или путем конъюгирования с капсульным полисахаридом или антигеном RSV (респираторно-синцитиального вируса), как ниже описано в отношении третьего аспекта настоящего изобретения.

Это является благоприятным, поскольку такой слитый белок может обладать усиленной иммуногенностью. Доступно и хорошо известно специалистам в данной области техники множество способов, которые могут быть использованы без чрезмерного экспериментирования, для того, чтобы существенно увеличить иммуногенность слитого белка. Например, слитый белок может быть модифицирован путем связывания с динитрофенольными группами или арсаниловой кислотой, или путем денатурации посредством нагревания и/или SDS (додецилсульфат натрия). В качестве альтернативы, слитый белок может быть связан с иммуногенным носителем. Обзор некоторых общих соображений в стратегиях связывания см. в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. E. Harlow и D. Lane (1988). Полезные иммуногенные носители хорошо известны в области техники. Примерами таких носителей являются гемоцианин лимфы улитки (KLH); альбумины, такие как бычий сывороточный альбумин (BSA) и овальбумин, PPD (очищенный белок, являющийся производным туберкулина); эритроциты; столбнячный анатоксин; холерный токсин; агарозные гранулы; активированный уголь; или бентонит.

В еще одном воплощении иммуногенный слитый белок конъюгирован с капсульным полисахаридом, предпочтительно бактериальным полисахаридом, более предпочтительно полисахаридом *Streptococcus* группы В.

Под полисахаридом понимают любой линейный или разветвленный полимер, состоящий из моносахаридных остатков, обычно связанных гликозидными связями, и, таким образом, включающий олигосахариды. Предпочтительно, полисахарид содержит от 2 до 50 моносахаридных единиц, более предпочтительно от 6 до 30 моносахаридных единиц.

Полисахаридный компонент может быть основан на или являться производным полисахаридных компонентов полисахаридной капсулы множества грамположительных и грамотрицательных бактериальных патогенов, таких как *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*. Другие бактерии, полисахаридные компоненты которых могут быть конъюгированы со слитыми белками в соответствии с настоящим изобретением, включают *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Shigella dysenteriae*. Полисахаридные компоненты, подходящие для применения в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, включают олигосахарид Hib, липополисахарид *Pseudomonas aeruginosa*, липополисахариды *Salmonella* и O-специфический полисахарид *Shigella dysenteriae*.

Другие полисахаридные компоненты, подходящие для применения в соответствии с настоящим изобретением, хорошо известны специалистам в данной области техники.

Фрагменты бактериального капсульного полисахарида могут быть получены любым подходящим способом, например посредством кислотного гидролиза или ультразвукового облучения. Другие способы получения полисахаридных компонентов будут хорошо известны специалистам в данной области техники.

Полисахарид предпочтительно представляет собой капсульный полисахарид, полученный из *Streptococcus* группы В, или его эквиваленты.

Полисахарид предпочтительно должен быть связан со слитым белком путем ковалентной связи. Особенно предпочтительный способ связывания полисахарида и белка представляет собой восстановительное аминирование. Другие способы включают: активацию полисахарида цианогенбромидом с последующей реакцией с дигидразидом адипиновой кислоты (спейсером) и путем конъюгирования с карбоксидными группами белка-носителя с использованием растворимых карбодиимидов; функционализацию белка-носителя дигидразидом адипиновой кислоты с последующим связыванием с полисахаридами, активированными цианогенбромидом, химическую модификацию как белка-носителя, так и полисахарида



с последующим их сочетанием.

Молекула полисахарида может быть связана со слитым белком посредством спейсерной молекулы, такой как адипиновая кислота. Эта спейсерная молекула может быть использована для облегчения связывания слитого белка с полисахаридом. После осуществления реакции сочетания конъюгат может быть очищен путем диафильтрации или другими известными способами для удаления не прореагировавших белковых или полисахаридных компонентов.

Если полисахарид получен из бактериального патогена, отличающегося от GBS, конъюгат может вызывать иммунитет против двух или более патогенов, например множества типов бактерий. Это представляет собой потенциально важное применение иммуногенного слитого белка.

Второй аспект настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, кодирующий иммуногенный слитый белок в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

Такая молекула нуклеиновой кислоты может быть использована при непосредственном получении указанного иммуногенного слитого белка, например в клеточной культуре, из которой выделяют и получают иммуногенный слитый белок, или опосредованно, например у субъекта, у которого иммуногенный слитый белок должен экспрессироваться для иммунизации.

Молекула нуклеиновой кислоты, например, может представлять собой молекулу ДНК или молекулу РНК. Молекула РНК может представлять собой молекулу мРНК.

Молекула нуклеиновой кислоты может содержать или предпочтительно состоять из первого полинуклеотида, имеющего по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, или 100%, идентичности последовательности с одной из SEQ ID NO: 1-6, слитой непосредственно или через линкерную полинуклеотидную последовательность со вторым полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с одной из SEQ ID NO: 8-13.

Линкерная полинуклеотидная последовательность является необязательной и включена в том случае, если иммуногенный слитый белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, должен иметь линкер, расположенный между первой частью

аминокислотной последовательности и второй частью аминокислотной последовательности. Если первый полинуклеотид слит непосредственно со вторым полинуклеотидом, то отсутствует линкерная полинуклеотидная последовательность, представленная в молекуле нуклеиновой кислоты.

Каждая из SEQ ID NO: 1-6 и SEQ ID NO: 8-13, упоминаемые выше, могут быть возможно усечены путем удаления первых трех оснований, кодирующих исходный метионин (М) в первой части аминокислотной последовательности и исходный аланин (А) в второй части аминокислотной последовательности иммуногенного слитого белка, кодируемого указанной молекулой нуклеиновой кислоты.

Молекула нуклеиновой кислоты может возможно содержать один или более чем один стоп-кодон.

Молекула нуклеиновой кислоты может возможно содержать один или более чем один стартовый кодон.

Молекула нуклеиновой кислоты может быть оптимизирована по кодонам для экспрессии в конкретном организме, таком как *E. coli* или клетки *Cricetulus griseus* (яичника китайского хомячка).

В предпочтительном воплощении молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения указанная молекула нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью нуклеотидов, представленной в одной из SEQ ID NO: 15-20.

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеотидов, представленной в одной из SEQ ID NO: 15-20. Каждая из SEQ ID NO: 15-20, упомянутая в этих предпочтительных воплощениях, может быть возможно усечена путем удаления первых трех оснований, кодирующих исходный метионин (М) в первой части аминокислотной последовательности иммуногенного слитого белка, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты. Кроме того, каждая из SEQ ID NO: 15-20, упомянутая в этих предпочтительных воплощениях, может быть возможно усечена путем удаления последних 1-6 оснований двух стоп-кодонов. Это может быть, например, использовано тогда, когда молекула нуклеиновой кислоты должна быть использована в качестве вакцины ДНК или РНК - транскрипция и/или трансляция будет прекращаться по концу молекулы нуклеиновой кислоты.

Молекула нуклеиновой кислоты может предпочтительно состоять из от 1044 (без исходного М) до 1047 оснований (с исходным М).

Третий аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения.

Большое разнообразие комбинаций экспрессирующей хозяин/вектор может быть использовано при экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты. Полезные экспрессирующие векторы для эукариотических хозяев включают, например, векторы, содержащие последовательности контроля экспрессии из SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, аденовируса, аденоассоциированного вируса, цитомегаловируса и ретровирусов. Полезные экспрессирующие векторы для бактериальных хозяев включают бактериальные плазмиды, такие как плазмиды из *E. coli*, включающие векторы pBluescript, pGEX2T, pUC, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 и их производные, плазмиды более широкого диапазона хозяев, такие как RP4, фаговые ДНК, например многочисленные производные фага лямбда, например лямбда GT10 и лямбда GT11, NM989 и другие ДНК-фаги, такие как M13 и нитевидные одноцепочечные ДНК-фаги. Полезные экспрессирующие векторы для дрожжевых клеток включают плазмиду 2.μi. и ее производные. Полезные векторы для клеток насекомых включают pVL 941.

Кроме того, любая из широкого разнообразия последовательностей контроля экспрессии может быть использована в этих векторах для экспрессии молекул нуклеиновых кислот. Полезные последовательности контроля экспрессии включают последовательности контроля экспрессии, ассоциированные со структурными генами вышеуказанных экспрессирующих векторов. Примеры полезных последовательностей контроля экспрессии включают, например, ранние и поздние промоторы SV40 или аденовируса, систему lac, систему trp, систему TAC или TRC, промоторы T3 и T7, основные операторные и промоторные области фага лямбда, контрольные области белка оболочки fd, промотор 3-фосфоглицеракиназы или другие гликолитические ферменты, промоторы кислой фосфатазы, например Pho5, промоторы дрожжевой системы скрещивания альфа и другие конститутивные и индуцируемые промоторные последовательности, известные для контроля экспрессии генов прокариотических или эукариотических клеток, или их вирусов и их различных комбинации.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину,

экспрессирующей иммуногенный слитый белок в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или содержащей молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения или вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения.

Клетка-хозяин может представлять собой грамотрицательную бактериальную клетку, грамположительную бактериальную клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомых, животную клетку, клетку африканской зеленой мартышки, человеческую клетку или растительную клетку. Клетка-хозяин может быть выбрана из группы, состоящей из *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Lactobacillus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* и грибов. Тем не менее, предпочтительной является *E. coli*.

Дополнительно, могут быть использованы клетки насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (SF9), животные клетки, такие как CHO и мышинные клетки, клетки африканской зеленой мартышки, такие как COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 и BMT 10, человеческие клетки и растительные клетки в культуре ткани. Предпочтительные организмы-хозяева включают бактерии, такие как *E. coli* и *B. subtilis*, и клетки млекопитающих в культуре ткани.

Когда клетку-хозяина используют для продуцирования иммуногенного слитого белка, или используют для продуцирования первой и второй частей его аминокислотной последовательности, или используют для продуцирования линкерной части аминокислотной последовательности, тогда продуцируемые части аминокислотной последовательности могут быть выделены из микробной культуры или клеточной культуры и очищены с использованием любых из множества обычных способов, включающих: жидкостную хроматографию, такую как хроматография с нормальной или обращенной фазой, с использованием HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии), FPLC (быстрая жидкостная хроматография белков) и т.п.; аффинная хроматография (такая как хроматография с неорганическими лигандами или моноклональными антителами); ионообменная хроматография, гель-фильтрационная хроматография; иммобилизованная хроматография с хелатами металлов; гель-электрофорез; тангенциальная фильтрация в потоке и т.п. Специалист в данной области техники может выбрать наиболее подходящие методики выделения и очистки, не выходя за рамки объема настоящего изобретения.

Кроме того, иммуногенный слитый белок, первая и вторая части его

аминокислотной последовательности или линкерная часть аминокислотной последовательности могут быть продуцированы посредством нескольких химических способов. Например, они могут быть получены с использованием способа твердофазного синтеза или они могут быть получены путем синтеза в растворе.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к вакцине, содержащей один или более чем один иммуногенный слитый белок в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения или клетку-хозяин в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения.

Количество каждого иммуногенного слитого белка, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора и/или клетки-хозяина предпочтительно представляет собой фармацевтически эффективное количество или количество, способное вызывать защитный иммунитет против *Streptococcus* группы В, или количество, достаточное для запуска иммунного ответа. Кроме того, количество может быть таким, чтобы быть достаточным для уменьшения и наиболее предпочтительно предупреждения клинически значимого дефицита в активности и ответе у субъекта, получающего вакцину. В качестве альтернативы количество является достаточным для того, чтобы вызвать улучшение клинически значимого состояния у хозяина или субъекта.

Как понятно специалистам в данной области техники, количество соединения может изменяться в зависимости от его специфической активности. Подходящие количества дозировок могут содержать заранее определенное количество активной композиции, рассчитанной для получения желаемого терапевтического эффекта в ассоциации с требуемыми разбавителями; то есть носителем или добавкой. Кроме того, доза, подлежащая введению, будет изменяться в зависимости от действующего начала или действующих начал, которые должны использоваться, возраста, массы и т.д. индивида, подлежащего лечению.

Вакцина предпочтительно способна вызывать защитный иммунитет против *Streptococcus* группы В.

Как указано в графических материалах, иммуногенный слитый белок вызывает иммунный ответ при введении субъектам. Такой иммунный ответ может также достигаться опосредованно путем введения молекулы нуклеиновой кислоты в виде молекулы нуклеиновой кислоты ДНК для более поздней транскрипции и трансляции

для экспрессии иммуногенного слитого белка, или в виде молекулы нуклеиновой кислоты РНК или мРНК для трансляции и экспрессии иммуногенного слитого белка. Молекула нуклеиновой кислоты может быть представлена в векторе для повышенного контроля транскрипции и/или трансляции, и вектор в свою очередь может быть представлен в клетке-хозяине для дополнительного контроля и/или увеличения экспрессии иммуногенного слитого белка.

Вакцина может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель и возможно адъювант. Предполагается, что термин “фармацевтически приемлемый носитель” предназначен для обозначения любого подходящего приемлемого эксципиента, адъювантов, носителя, разбавителя, обычно используемых в фармацевтических композициях.

Вакцина может включать вакцинную композицию.

Вакцина может дополнительно содержать другие фармакологически приемлемые ингредиенты, такие как соли, буферы, иммуноактивные компоненты, адъюванты (AlOH), увлажнители, эмульгаторы и суспендирующие агенты, или подсластители, корригенты, ароматизаторы или другие вещества, которые желательны для улучшения эффективности композиции. Композиция считается “фармакологически приемлемой”, если индивид-реципиент может перенести ее введение.

Адъюванты представляют собой вещества, которые могут быть использованы для конкретного усиления специфического иммунного ответа. Обычно адъювант и композиция смешаны до презентирования иммунной системе или презентируются по отдельности, но в одно и то же место животного или человека, которого иммунизируют. Адъюванты можно условно разделить на несколько групп в зависимости от их композиции. Эти группы включают масляные адъюванты (например, полный и неполный адъювант Фрейнда), неорганические соли, например AlK (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, AlNa (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, AlNH<sub>4</sub> (SO<sub>4</sub>), AlOH, диоксид кремния, каолин, и углерод), полинуклеотиды (например, поли IC и поли AU кислоты) и некоторые природные вещества (например, воск D из *Mycobacterium tuberculosis*, а также вещества, обнаруженные в *Corynebacterium parvum* или *Bordetella pertussis*, и члены рода *Brucella*).

Альгидрогель (например, гидроксид алюминия, AlOH) является особенно эффективным адъювантом для иммуногенного слитого белка в соответствии первым аспектом настоящего изобретения и поэтому особенно полезен в вакцине в

соответствии пятым аспектом настоящего изобретения.

Способы получения и приготовления вакцин и вакцинных композиций хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, выбор ингредиентов будет варьировать в зависимости от пути введения композиции. Например, композиции для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей представляют собой пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Носители или окклюзионные повязки могут быть использованы для увеличения проницаемости кожи и улучшения абсорбции антигена. Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут обычно содержать липосомальный раствор, содержащий жидкую лекарственную форму. Подходящие формы для суспендирования липосом включают эмульсии, суспензии, растворы, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, такие как очищенная вода.

Вакцину можно вводить людям или животным, включая млекопитающих и птиц, таких как грызуны (мышь, крыса, морская свинка или кролик); птицы (индейка, цыпленок или курица); другие сельскохозяйственные животные (корова, лошадь, свинья или поросенок); домашние животные (собака, кошка и другие домашние животные); и люди. Хотя многие животные могут быть обработаны вакциной в соответствии с изобретением, предпочтительным индивидом для обработки является человек или коммерчески ценное животное и скот, такие как рыба, например, тилапия, и верблюды.

Вакцина может быть введена индивиду в соответствии со способами, известным в области техники. Такие способы включают, например, парентеральное введение, такое как все пути инъекции в кожу или через кожу: например, внутримышечный, внутривенный, внутрибрюшинный, внутрикожный, через слизистые оболочки, подслизистый или подкожный. Кроме того, они могут быть введены путем местного применения, такого как капли, спрей, гель или мазь на эпителий слизистой оболочки глаза, носа, рта, ануса или влагалища, или на эпидермис внешней кожи любого фрагмента тела. Другие возможные пути применения представляют собой пути применения посредством спрея, аэрозоля или введения порошка путем ингаляции через дыхательные пути. В этом последнем случае используемый размер частиц будет

определять, насколько глубоко частицы будут проникать в дыхательные пути. В качестве альтернативы, применение может быть через пищевой путь, посредством комбинирования с пищей, кормом или питьевой водой, например в виде порошка, жидкости или таблетки, или путем введения непосредственно в рот в виде жидкости, геля, таблетки или капсулы, или в анус в виде суппозитория.

Для определения времени иммунизаций существует множество различных методик. Можно вводить вакцину или компоненты а-г более одного раза для увеличения уровней и разнообразия экспрессии репертуара иммуноглобулинов, экспрессируемых иммунизированным животным. Обычно, если проводится несколько иммунизаций, то они могут быть осуществлены с интервалом от недели до трех месяцев, таким как интервал от двух недель до двух месяцев, таким как интервал от одного до двух месяцев или интервал в четыре недели.

Дополнительно, может быть введена одна или несколько бустерных инъекций вакцины, или могут быть введены компоненты а-г. Предпочтительно, бустерные инъекции могут быть введены приблизительно через 1 и 6 месяцев после первоначальной инъекции или инъекций.

Вакцина в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения может предпочтительно содержать один или более чем один дополнительный иммуноактивный компонент. Дополнительный иммуноактивный компонент может представлять собой антиген, вещество, повышающее иммунитет, и/или вакцину; любое из них может содержать адъювант.

Соответственно, в предпочтительном воплощении вакцины в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения вакцина дополнительно содержит одно или более чем одно из:

а) дополнительного иммуногенного слитого белка, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 42;

б) дополнительной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей дополнительный иммуногенный слитый белок, где указанная дополнительная молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью нуклеотидов, представленной в одной из SEQ ID NO: 36-41;



в) дополнительного вектора, содержащего указанную дополнительную молекулу нуклеиновой кислоты; или

г) дополнительной клетки-хозяина, экспрессирующей указанный дополнительный иммуногенный слитый белок или содержащей указанный дополнительный вектор.

Как будет описано ниже, указанный дополнительный иммуногенный слитый белок получен из N-концевых областей белков поверхности GBS Alp1 и Alp2/3 в соответствии с также раскрытым в WO 2017/068112. В соответствии с представленным в графических материалах и обсуждаемым ниже, существует синергический эффект при использовании вакцины, содержащей как указанный иммуногенный слитый белок, так и указанный дополнительный иммуногенный слитый белок.

Кроме того, за счет включения одного или более чем одного дополнительного компонента а-г вакцина может обеспечивать более широкую защиту против всех штаммов *Streptococcus* группы В.

По аналогии с описанным выше для иммуногенного слитого белка, указанный дополнительный иммуногенный слитый белок может быть экспрессирован опосредованно указанной дополнительной молекулой нуклеиновой кислоты, дополнительным вектором и указанной дополнительной клеткой-хозяином.

Количество каждого из а-г должно предпочтительно представлять собой фармацевтически эффективное количество или количество, способное вызывать защитный иммунитет против *Streptococcus* группы В, или количество, достаточное для того, чтобы вызывать иммунный ответ, или по меньшей мере количество, достаточное для увеличения общего иммунного ответа на вакцину.

Как указано выше, еще один иммуногенный слитый белок имеет по меньшей мере 90%, например 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 42, где SEQ ID NO: 42 представляет следующую аминокислотную последовательность:

MAEVISGSAATLNSALVKNVSGGKAYIDIYDVKNGKIDPLNLIVLTPSNYSAN  
 YYIKQGGRIFTSVNQLQTPGTATITYNILDENGNPYTKSDGQIDIVSLVTTVYDTTEL  
 NNINKVIENANDPKWSDSRKDVLSKIEVIKNDIDNNPKTQSDIDNKIVEVNELEKLL  
 VLPEFSTIPGSAATLNTSITKNIQNGNAYIDLVDKNGGLIDPQNLIVLNPSSYSANYYIK  
 QGAKYYSNPSEITTTGSATITFNILDETGNPHKKADGQIDIVSVNLTIYDSTALRNRIDE  
 VINNANDPKWSDGSRDEVLTGLEKIKKIDIDNNPKTQIDIDNKINEVNEIEKLLVSVL

Молекулы нуклеиновой кислоты ДНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, т.е. включенные в (б), представлены в SEQ ID NO: 36, 38, и 40, где SEQ ID NO: 38 оптимизирована по кодомам для экспрессии в *E. coli* и SEQ ID NO: 40 оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичники китайского хомячка).

Соответствующие молекулы нуклеиновой кислоты РНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, представлены в SEQ ID NO: 37, 39 и 41, где SEQ ID NO: 39 оптимизирована по кодомам для экспрессии в *E. coli* и SEQ ID NO: 41 оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичники китайского хомячка).

В соответствии с упомянутым выше, указанный дополнительный иммуногенный слитый белок получен из N-концевых областей белков поверхности GBS Alp1 и Alp2/3.

Белок Alp1 также известен как белок эпсилон, и представляет собой белок, подобный белку альфа стрептококков группы В.

Аминокислотная последовательность N-концевой области Alp1 приведена в SEQ ID NO: 28:

```
MAEVISGSAATLNSALVKNVSGGKAYIDIYDVKNGKIDPLNLIVLTPSNYSAN
YYIKQGGRIFTSVNQLQTPGTATITYNILDENGNPYTKSDGQIDIVSLVTTVYDTTELR
NNINKVIENANDPKWSDDSRKDVLSKIEVIKNDIDNNPKTQSDIDNKIVEVNELEKLL
VLP
```

Молекулы нуклеиновой кислоты ДНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, представлены в SEQ ID NO: 22, 24 и 26, где SEQ ID NO: 24 оптимизирована по кодомам для экспрессии в *E. coli* и SEQ ID NO: 26 оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичники китайского хомячка).

Соответствующие молекулы нуклеиновой кислоты РНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, представлены в SEQ ID NO: 23, 25 и 27, где SEQ ID NO: 25 оптимизирована по кодомам для экспрессии в *E. coli* и SEQ ID NO: 27 оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичники китайского хомячка).

Белок Alp2 представляет собой еще один белок, подобный белку альфа. Подобно другим членам семейства, белок Alp2 имеет N-концевой домен и несколько повторяющихся доменов в направлении С-конца. N-концевые области Alp2 и Alp3

идентичны. Alp3 представляет собой еще один белок, подобный белку альфа, также известный как R28. Он очень похож на белок R28, также обнаруженный в *S. pyrogenes*.

Аминокислотная последовательность N-концевой области Alp2 приведена в SEQ ID NO: 35:

STIPGSAATLNTSITKNIQNGNAYIDLVDVKNGLIDPQNLIVLNPSSYSANYIYK  
QGAKYYSNPSEITTTGSATITFNILDETGNPHKKADGQIDIVSVNLTIYDSTALNRIDE  
VINNANDPKWSDGSRDEVLTGLEKIKKIDIDNNPKTQIDIDNKINEVNEIEKLLVVS

Молекулы нуклеиновой кислоты ДНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, представлены в SEQ ID NO: 29, 31 и 33, где SEQ ID NO: 31 оптимизирована по кодонам для экспрессии в *E. coli* и SEQ ID NO: 33 оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичники китайского хомячка).

Соответствующие молекулы нуклеиновой кислоты РНК, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, представлены в SEQ ID NO: 30, 32 и 34, где SEQ ID NO: 32 оптимизирована по кодонам для экспрессии в *E. coli* и SEQ ID NO: 34 оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках *Cricetulus griseus* (яичники китайского хомячка).

Таким образом, SEQ ID NO: 42 соответствует SEQ ID NO: 28 (N-конец Alp1), слитой через линкерную часть аминокислотной последовательности, состоящую из аминокислот EF в SEQ ID NO: 35 (N-конец Alp2/3).

Таким образом, второй иммуногенный слитый белок может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, состоящей из:

1. дополнительной первой части аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28;
2. дополнительной второй части аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35; и возможно:
3. дополнительной линкерной части аминокислотной последовательности, состоящей из 1-20 аминокислот и отделяющей указанные дополнительную первую часть аминокислотной последовательности от указанной дополнительной второй аминокислотной части.

В каждой из SEQ ID NO: 28 и 42 исходный М может быть необязательным.

Соответственно, в предпочтительном воплощении вакцины в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения вакцина содержит:

а) иммуногенный слитый белок в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, где указанный иммуногенный слитый белок состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 21, или, в качестве альтернативы, где указанный иммуногенный слитый белок состоит из аминокислот 2-347 SEQ ID NO: 21; и

б) дополнительный иммуногенный слитый белок, содержащий, предпочтительно состоящий из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 42, или, в качестве альтернативы, содержащий, предпочтительно состоящий из аминокислот 2-347 SEQ ID NO: 42.

В этих воплощениях в вакцине предпочтительно отсутствуют другие белки или аминокислотные последовательности, отличающиеся от указанного конкретного иммуногенного слитого белка и указанного конкретного дополнительного иммуногенного слитого белка.

В предпочтительном воплощении вакцины в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения вакцина дополнительно содержит гидроксид алюминия в качестве адьюванта. В этих воплощениях вакцина предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к иммуногенному слитому белку в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, молекуле нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, вектору в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, клетке-хозяину в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения или вакцине в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения для применения в 1) вакцинации против инфицирования *Streptococcus* группы В, или 2) лечении инфекции *Streptococcus* группы В.

Указанные иммуногенный слитый белок, молекула нуклеиновой кислоты, вектор, клетка-хозяин или вакцина могут быть использованы для такой вакцинации или лечения путем введения иммуногенного слитого белка, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина или вакцины субъекту, нуждающемуся в таком введении.

Соответствующий седьмой аспект настоящего изобретения относится к способу 1) вакцинации против инфицирования *Streptococcus* группы В или 2) лечения инфекции *Streptococcus* группы В путем введения иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, клетки-хозяина в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения или вакцины в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения субъекту, нуждающемуся в таком введении.

Соответствующий восьмой аспект настоящего изобретения относится к применению иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, клетки-хозяина в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения для изготовления фармацевтической композиции или лекарственного средства, такого как вакцина, для 1) вакцинации против инфицирования *Streptococcus* группы В, или 2) лечения инфекции *Streptococcus* группы В.

Таким образом, иммуногенный слитый белок в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, клетка-хозяин в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения или вакцина в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения могут быть использованы в способе предупреждения или лечения инфекции, вызванной *Streptococcus* группы В.

Материнская иммунопрофилактика посредством вакцины для защиты против инфицирования *Streptococcus* группы В как матери, так и у младенца первых месяцев жизни, долго предлагалась как потенциальный путь.

Таким образом, в предпочтительных воплощениях шестого, седьмого и восьмого аспектов настоящего изобретения иммуногенный слитый белок в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, клетку-хозяина в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения или вакцину в соответствии с пятым аспектом

настоящего изобретения вводят субъекту-человеку, представляющему собой женщину.

Таким образом, введение способно придавать иммунитет против инфекции GBS нерожденному потомству человека, представляющего собой женщину. Кроме того, введение также может быть осуществлено субъекту мужского пола, если он старше.

В соответствии с этим воплощением указанные иммуногенный слитый белок, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, клетку-хозяин или вакцину вводят женщине, которая не является беременной, или беременной женщине в условиях времени и количестве, достаточных для того, чтобы вызвать продукцию антител, которые служат для защиты как женщины, так и плода или новорожденного (путем пассивного переноса антител через плаценту).

Термины “предупреждение или лечение” в различных грамматических формах в отношении настоящего изобретения относятся к предупреждению, лечению, обращению, ослаблению, облегчению, уменьшению интенсивности, ингибированию, минимизации, подавлению или остановке (1) вредных эффектов расстройства, ассоциирующегося с инфицированием *Streptococcus* группы В, (2) развития расстройства или (3) возбудителя расстройства (*Streptococcus* группы В). Кроме того, предполагается то, что термины “предупреждение или лечение” включают формирование у индивида общего или частичного иммунитета к инфицированию *Streptococcus* группы В.

Девятый аспект настоящего изобретения относится к способу предупреждения или лечения инфекции, вызванной *Streptococcus* группы В, который включает введение нуждающемуся этом индивиду эффективного количества антител, возникающих в результате воздействия на второго индивида указанными иммуногенным слитым белком, молекулой нуклеиновой кислоты, вектором, клеткой-хозяином или вакциной в соответствии с первым-пятым аспектами настоящего изобретения.

В соответствии с этим аспектом устойчивость или иммунитет против *Streptococcus* группы В обеспечивается у индивида путем пассивной иммунизации, т.е. индуцируемые антисыворотки отбирают и непосредственно вводят реципиенту, у которого подозревают наличие инфекции, вызванной *Streptococcus* группы В. Предполагается, что такие антисыворотки можно вводить беременной женщине (во время или до родов) в условиях времени и в количестве, достаточных для того, чтобы указанные антисыворотки служили для защиты плода или новорожденного (посредством пассивного проникновения антител через плаценту).

Таким образом, вакцину или антисыворотки в соответствии с настоящим изобретением можно вводить до начала инфекции (чтобы предупредить или ослабить ожидаемую инфекцию) или после начала фактической инфекции.

Десятый аспект настоящего изобретения относится к способу получения иммуногенного слитого белка, включающему стадии

- предоставления клетки-хозяина в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения,
- размножения указанной клетки-хозяина,
- очистки иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, и
- получения указанного иммуногенного слитого белка.

В качестве альтернативы, указанный иммуногенный слитый белок может быть получен в бесклеточной системе экспрессии. Такие системы содержат все факторы, существенные для экспрессии, из подходящей рекомбинантной нуклеиновой кислоты, функционально связанные с промотором, который функционирует в этой конкретной системе.

#### Пример 1 – иммунизация здоровых женщин

Взрослых здоровых женщин иммунизировали иммуногенным слитым белком, состоящим из SEQ ID NO: 21 в отдельности или вместе с дополнительным иммуногенным слитым белком в соответствии с SEQ ID NO: 42, и с адьювантным гидроксидом алюминия или без него.

Фиг. 1 демонстрирует кратность увеличения IgG, достигаемую через 29 суток после иммунизации с использованием одной дозы иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения либо в отдельности, либо в комбинации с дополнительным иммуногенным слитым белком, включенным в вакцину в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения, в различных дозах с адьювантным гидроксидом алюминия или без него.

На Фиг. 1 первые 7 результатов были получены путем введения иммуногенного слитого белка, состоящего из SEQ ID NO: 21, в отдельности или вместе с адьювантным гидроксидом алюминия (0,5 мг).

В соответствии с указанным на Фиг. 1, применение гидроксида алюминия благоприятно, поскольку он усиливает кратность увеличения дозы IgG 10 мкг до величины, близкой к кратности увеличения дозы IgG 50 мкг. Аналогично, доза 50 мкг

вместе с гидроксидом алюминия обеспечивает похожее кратное увеличение до дозы 250 мкг.

Фиг. 1 дополнительно демонстрирует, что когда используют вакцину, содержащую гидроксид алюминия и как иммуногенный слитый белок в соответствии с SEQ ID NO: 21, так и дополнительный иммуногенный слитый белок в соответствии с SEQ ID NO: 42, тогда дозы 25 мкг каждого из указанных иммуногенных слитых белков обеспечивают ту же самую или более высокую кратность увеличения по сравнению с дозой 250 мкг иммуногенного слитого белка в соответствии с SEQ ID NO: 21. С использованием гидроксида алюминия и 50 мкг каждого из указанных иммуногенных слитых белков обеспечивали самую высокую кратность увеличения в сутки 29.

На изображении приведено количество субъектов (n) для каждого эксперимента.

Фиг. 2 демонстрирует кратность увеличения IgG, достигаемую через 57 суток после иммунизации с использованием первой дозы и второй дозы либо иммуногенного слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения в отдельности, либо в комбинации с дополнительным иммуногенным слитым белком, включенным в вакцину в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения, в различных дозах с адъювантом или без него.

На Фиг. 2 первые 7 экспериментов были осуществлены путем введения иммуногенного слитого белка, состоящего из SEQ ID NO: 21, в отдельности или вместе с адъювантным гидроксидом алюминия (0,5 мг).

В соответствии с указанным на Фиг. 2, две дозы иммуногенного слитого белка, состоящего из SEQ ID NO: 21, 50 мкг и 100 мкг вместе с гидроксидом алюминия обеспечивали кратность увеличения, составляющую приблизительно 100. Тем не менее, обеспечивается даже более высокая кратность, как видно из того, когда используют вакцину, содержащую гидроксид алюминия и как иммуногенный слитый белок в соответствии с SEQ ID NO: 21, так и дополнительный иммуногенный слитый белок в соответствии с SEQ ID NO: 42, даже если доза каждого из иммуногенных слитых белков составляет только 25 мкг или 50 мкг.

На изображении приведено количество субъектов (n) для каждого эксперимента.

#### Пример 2 – иммунизация самок мышей для защиты детенышей

Фиг. 3 демонстрирует выживание детенышей мышей после неонатального бактериального инфицирования штаммом VM110 *Streptococcus* группы B ( $8 \times 10^3$  КОЕ). Детенышей получали от самок мышей, иммунизированных а) иммуногенным слитым



белком с SEQ ID NO: 21 вместе с адьювантным гидроксидом алюминия (AlOH), б) или контролем (только адьювантным гидроксидом алюминия). Как можно видеть на Фиг. 3, детеныши мышей, родившиеся от матерей, иммунизированных иммуногенным слитым белком в соответствии с SEQ ID NO: 21 (пунктирная линия), демонстрировали значительно более высокий уровень выживания в течение эксперимента (0 - 48 часов после инфицирования), чем детеныши мышей, родившиеся от матерей, получавших контроль (сплошная линия). Соответственно, иммуногенный слитый белок с SEQ ID NO: 21 при введении самкам мышей обеспечивал значительную защиту против инфекции GBS и гибели детенышей мышей, родившихся от этих самок мышей. Таким образом, иммуногенный слитый белок обеспечивал защитный эффект против инфекции GBS и гибели, похожие на те, о которых сообщали для мышей, представленных на панелях С и Е на Фиг. 2 в Lindahl et al, Nonimmunodominant Regions Are Effective As Building Blocks In A Streptococcal Fusion Protein Vaccine, Cell Host & Microbe 2, 427-434, December 2007.

#### Пример 3 – исследование инвазии в эпителиальные клетки

Фиг. 4А-4Е демонстрируют результаты, полученные в исследовании инвазии в эпителиальные клетки человека с использованием клинических изолятов и антисывороток, получаемых в результате иммунизации с использованием иммуногенного слитого белка с SEQ ID NO: 21. Соответствующие столбцы демонстрируют относительную процентную долю инвазии в эпителиальные клетки для контроля (отсутствие сыворотки), стадии предварительной иммунизации в сутки 0 (D0) и последующей стадии иммунизации в сутки 57 (D57). Показан хороший эффект в отношении ингибирования инвазии в эндотелиальные клетки. Таким образом, иммуногенный слитый белок обеспечивал ингибирующее действие в отношении инвазии в эпителиальные клетки, похожее на то, которое представлено на панели В на Фиг. 3 в Lindahl et al, Nonimmunodominant Regions Are Effective As Building Blocks In A Streptococcal Fusion Protein Vaccine, Cell Host & Microbe 2, 427-434, December 2007.

Соответственно, Фиг. 1 и 2 демонстрируют, что благоприятно вводить иммуногенный слитый белок вместе с дополнительным слитым белком и что также благоприятно использовать адьювант, например гидроксид алюминия.

Однако иммуногенный слитый белок вызывал иммунный ответ, например кратность повышения IgG, также в низких дозах (10 мкг) и без адьюванта.

Кроме того, Фиг. 3 и 4А-4Е демонстрируют, что иммуногенный слитый белок

обеспечивает эффекты, похожие на те, которые наблюдаются для иммуногенного слитого белка, раскрытого в Lindahl et al, *Nonimmunodominant Regions Are Effective As Building Blocks In A Streptococcal Fusion Protein Vaccine*, *Cell Host & Microbe* 2, 427-434, December 2007 и WO 2008127179.

Доза каждого иммуногенного слитого белка и дополнительного иммуногенного слитого белка, если его вводят, для людей может находиться в диапазоне от 10 мкг до 250 мкг, например от 10 мкг до 100 мкг, например от 15 мкг до 75 мкг, предпочтительно от 25 мкг до 75 мкг, например от 25 мкг до 50 мкг.

Таким образом, предпочтительная доза каждого иммуногенного слитого белка и дополнительного иммуногенного слитого белка, если его вводят, для людей в присутствии адъюванта, такого как гидроксид алюминия, находится в диапазоне от 10 до 250 мкг, предпочтительно от 10 до 150 мкг, предпочтительно от 25 до 100 мкг или от 25 до 75 мкг.

Если иммуногенный слитый белок вводят вместе с дополнительным иммуногенным слитым белком и в присутствии адъюванта, такого как гидроксид алюминия, то доза каждого слитого белка предпочтительно находится в диапазоне от 15 мкг до 75 мкг, предпочтительно от 25 мкг до 75 мкг, например от 25 мкг до 50 мкг.

В отсутствие адъюванта, такого как гидроксид алюминия, доза каждого иммуногенного слитого белка и дополнительного иммуногенного слитого белка, если его вводят, для людей, будет составлять от 10 до 1000 мкг, предпочтительно от 50 до 500 мкг или предпочтительно от 100 до 250 мкг.

Если иммуногенный слитый белок и дополнительный иммуногенный слитый белок, если его вводят, вводят опосредованно путем введения соответствующих молекул нуклеиновой кислоты, векторов или клеток-хозяев, тогда дозу соответствующих молекул нуклеиновой кислоты, векторов или клеток-хозяев предпочтительно выбирают таким образом, чтобы получить иммунный ответ, похожий на тот, который мог бы быть достигнут, если бы иммуногенный слитый белок и дополнительный иммуногенный слитый белок, если его вводят, вводили бы субъекту непосредственно.

Предпочтительно, дозу каждого иммуногенного слитого белка и дополнительного иммуногенного слитого белка, если его вводят, повторяют. Соответственно, иммуногенный слитый белок и дополнительный иммуногенный слитый белок, если его вводят, вводят в первой дозе и повторяют в виде второй дозы

через некоторое время после первой дозы. Интервал между первой дозой и второй дозой может составлять от одной недели до трех месяцев, например от двух недель до двух месяцев, например от одного до двух месяцев или четыре недели.

Пример 4 – слитый белок в соответствии с SEQ ID NO: 21 обладает уменьшенным скринингом консервативных областей N-конца Rib

Как указано исходно, настоящее изобретение основано на дополнительном исследовании в отношении слитого белка, раскрытого в WO 2008127179. В данном исследовании идентифицировали последовательность иммуногенного слитого белка SEQ ID NO: 21, которая является более короткой, чем последовательность иммуногенного слитого белка, раскрытого в WO 2008127179, и в то же самое время обладает хорошим действием и подходит для применения в вакцине против GBS, как представлено в обсуждаемых выше графических материалах.

В представленном примере приведено дополнительное видение различия между указанным более коротким иммуногенным слитым белком и слитым белком по WO 2008127179.

В частности, различие между последовательностями заключается в лидерной последовательности длиной 32 аминокислоты: GPLGSASVLIGISFLGGFTQGQFNISTDTVFA – SEQ ID NO: 43, которая не обнаружена в SEQ ID NO: 21.

Компьютерную симуляцию осуществляли в отношении последовательности иммуногенного слитого белка по WO 2008127179, включающего лидерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 43. Симуляция была основана на молекулярной динамике, в которой каждый атом в системе моделируется в явной форме. Силы, действующие в отношении каждого атома со стороны соседних атомов, также рассчитываются и используются для обновления относительного положения каждого атома в короткие временные интервалы, как правило фемтосекунды. Симуляция позволяет получить молекулярную траекторию, при которой полная конформация прописывается в определенный интервал времени.

В частности, высококачественная модель полноразмерного слитого белка по WO 2008127179 получена с использованием Alphafold2, version v2.1.0, Jumper et al, Nature volume 596, pages 583–589 (2021). С-концевой домен, т.е. N-концевой AlpC, удаляли, поскольку он удален далеко от лидерной последовательности, оставляя N-концевой домен rib, включающий лидерную последовательность длиной 32 аминокислоты (SEQ

ID NO: 43) и в общей сложности 204 аминокислоты. Gromacs 2021.5 использовали для подготовки системы следующим образом; модель Alphafold2 сольватировали с использованием воды (растворитель gmx) в кубической ячейке, и добавляли ионы, чтобы сделать систему нейтральной (gmx genion). Энергию минимизировали путем сохранения тяжелых атомов в ограниченной конформации с последующей стадией уравнивания (давление и температура (при 300K (26,85°C))). Систему верифицировали таким образом, чтобы оказаться в стабильном состоянии до обработки путем основной симуляции следующим образом. Молекулярные движения глобальной системы симулировали в течение 100 нс с временем дельта 2 фс в течение в общей сложности 50 миллионов шагов, и конформацию системы сохраняли каждые 5000 шагов, приводя в результате к траектории с 10000 моделями. MDanalysis v2.0.0 использовали для анализа глобальной траектории, верифицируя то, что домен *gib* осциллирует около основного состояния, свидетельствуя о том, что молекула стабильна в текущих условиях. Анализ повторяли трижды (Sim1-3).

В качестве частичного результата обнаружили, что лидерная последовательность (аминокислоты 1-32) претерпевает значительные конформационные изменения перед нахождением стабильной конформации после приблизительно 60 нс. Взаимодействия между лидерной последовательностью рассчитывали с использованием Gromacs mindist (gmx mindist). Для обнаружения тесных и стабильных взаимодействий между лидерной последовательностью и доменом *gib* рассматривали 30 нс симуляции (3000 моделей), и рассчитывали возникающие взаимодействия в среднем по трем симуляциям в течение по меньшей мере 30% времени (взаимодействие в течение 900 моделей или больше). Взаимодействие в этой точке определяли в виде минимальной дистанции между любыми атомами аминокислот, составляющей 0,3 нм или меньше. Результаты представлены в Таблице 1 ниже и на Фиг. 5А, которая демонстрирует конец RibN при поверхностной презентации с лидерной последовательностью в шаростержневом представлении. Поверхностное представление конца RibN затемнено от белого, соответствующего частому контакту (высокая фракция) до темного, соответствующего отсутствию или не частому контакту.

Фиг. 5В демонстрирует альтернативное представление конца RibN (представленного в эскизном представлении) и лидерной последовательности

(представленной в шаростержневом представлении). Эскизное представление конца RibN затемнено от белого, соответствующего частому контакту (высокая фракция), до черного, соответствующего отсутствию контакта или нечастому контакту.

Дополнительно, консервативность аминокислот в домене *rib* рассчитывали следующим образом; 144 полных генома *Streptococcus agalactiae* загрузили из PatricBRC, и среди них 95 доменов *rib* обнаружены с использованием blastp 2.9.0+. Указанные 95 последовательностей выравнивали с использованием Muscle v3.8.1551, и нормализованное информационное содержание на аминокислоту рассчитывали с использованием logomaker 0.8. Оценка консервативности представлена в столбце Консервативность (Конс.) в Таблице 1 ниже и на Фиг. 5С, которая демонстрирует конец RibN на поверхностной презентации с лидерной последовательностью в шаростержневом представлении. Поверхностное представление конца RibN затемнено от белого, соответствующего высокой оценке консервативности, до черного, соответствующего отсутствию или низкой оценке консервативности.

Таблица 1

Номер AA в лидерной послед.	Домен (RibN)	Сим.1	Сим.2	Сим.3	Средн.	Фракция	Конс.
1	91	2971	1	2	991	33,03%	0,60
2	93	3000	0	0	1000	33,32%	0,85
3	88	2553	1445	0	1333	44,41%	0,75
3	91	2298	403	344	1015	33,82%	0,60
3	93	2508	1872	0	1460	48,65%	0,85
4	92	0	0	2983	994	33,13%	0,66
4	93	862	0	2955	1272	42,40%	0,85
5	93	2162	0	2746	1636	54,52%	0,85
10	111	0	0	2745	915	30,49%	0,75
11	86	0	0	2729	910	30,31%	0,76
12	93	2763	1436	4	1401	46,68%	0,85
13	86	2754	556	0	1103	36,77%	0,76
14	86	339	2931	0	1090	36,32%	0,76
14	127	2824	0	0	941	31,37%	0,75

<b>14</b>	<b>129</b>	<b>2474</b>	<b>1177</b>	<b>0</b>	<b>1217</b>	<b>40,55%</b>	<b>0,98</b>
15	84	1877	1665	0	1181	39,34%	0,58
15	86	2	2980	0	994	33,12%	0,76
<b>15</b>	<b>111</b>	<b>2893</b>	<b>2992</b>	<b>0</b>	<b>1962</b>	<b>65,37%</b>	<b>0,75</b>
15	113	2986	0	0	995	33,17%	0,74
15	119	2971	0	0	990	33,00%	0,98
<b>16</b>	<b>84</b>	<b>2723</b>	<b>1504</b>	<b>0</b>	<b>1409</b>	<b>46,95%</b>	<b>0,58</b>
<b>18</b>	<b>119</b>	<b>0</b>	<b>2680</b>	<b>32</b>	<b>904</b>	<b>30,12%</b>	<b>0,98</b>
23	119	2230	2339	1223	1931	64,33%	0,98
<b>23</b>	<b>127</b>	<b>2844</b>	<b>2907</b>	<b>2876</b>	<b>2876</b>	<b><u>95,82%</u></b>	<b>0,75</b>
24	126	2989	2968	410	2122	70,72%	1,00
<b>24</b>	<b>127</b>	<b>2994</b>	<b>2998</b>	<b>2953</b>	<b>2982</b>	<b><u>99,36%</u></b>	<b>0,75</b>
24	129	0	0	2739	913	30,42%	0,98
25	126	2694	759	0	1151	38,35%	1,00
25	127	2907	2858	0	1922	64,03%	0,75
<b>25</b>	<b>129</b>	<b>2818</b>	<b>2836</b>	<b>1203</b>	<b>2286</b>	<b>76,16%</b>	<b>0,98</b>
26	109	0	0	2861	954	31,78%	0,77
26	126	2622	871	0	1164	38,80%	1,00
<b>26</b>	<b>129</b>	<b>1002</b>	<b>1285</b>	<b>1504</b>	<b>1264</b>	<b>42,11%</b>	<b>0,98</b>
27	<b>93</b>	<b>0</b>	<b>2819</b>	<b>2968</b>	<b>1929</b>	<b>64,28%</b>	<b>0,85</b>
<b>28</b>	<b>88</b>	<b>0</b>	<b>2835</b>	<b>2985</b>	<b>1940</b>	<b>64,65%</b>	<b>0,75</b>
<b>29</b>	<b>131</b>	<b>2898</b>	<b>2893</b>	<b>0</b>	<b>1930</b>	<b>64,32%</b>	<b>0,77</b>
30	130	2946	0	21	989	32,96%	0,79
<b>30</b>	<b>131</b>	<b>3001</b>	<b>2257</b>	<b>938</b>	<b>2065</b>	<b>68,82%</b>	<b>0,77</b>
31	107	0	1856	1464	1107	36,88%	0,75
<b>31</b>	<b>131</b>	<b>2667</b>	<b>2987</b>	<b>2507</b>	<b>2720</b>	<b><u>90,65%</u></b>	<b>0,77</b>
31	132	488	2558	0	1015	33,83%	0,85
31	133	754	2425	25	1068	35,59%	0,52
<b>32</b>	<b>33</b>	<b>3001</b>	<b>3001</b>	<b>3001</b>	<b>3001</b>	<b><u>100,00%</u></b>	<b>1,00</b>
32	34	1222	1801	1731	1585	52,80%	0,74
<b>32</b>	<b>36</b>	<b>2987</b>	<b>2049</b>	<b>273</b>	<b>1770</b>	<b>58,97%</b>	<b>0,98</b>

<b>32</b>	130	2805	0	0	935	31,16%	0,79
<b>32</b>	131	424	1753	2271	1483	49,41%	0,77
<b>32</b>	132	173	1229	1871	1091	36,35%	0,85

Таблица 1 демонстрирует стабильные взаимодействия между лидерной последовательностью (аминокислоты 1-32) и доменом rib (аминокислоты 33-204). Приведена каждая пара аминокислот между лидерной последовательностью и доменом rib, взаимодействующая в течение по меньшей мере 30% времени в течение последних 30 нс стимулирования. Самая высокая фракция для каждой лидерной последовательности аминокислот представлена жирным шрифтом. Консервативность аминокислот оценивали и представили в столбце “Конс.”.

Как видно из Таблицы 1, преобладают взаимодействия четырех пар структурных элементов; первая представляет собой отрезок лидерной последовательности (29-32), наиболее близкий к домену, который упакован в один из основных бета-листов (129-133) домена Rib. Второй элемент расположен между аминокислотами 23-26 лидерной последовательности, которые взаимодействуют с областью петли (126-127) домена Rib, которая соединяет два бета-листа. Третье взаимодействие осуществляется между аминокислотами 12-16 лидерной последовательности, которые взаимодействуют с несколькими бета-листами (84, 113, 127). Наконец, первая часть лидерной последовательности (1-5) взаимодействует с петлей (90-93) домена Rib.

В эти пары взаимодействий вовлечены части N-конца Rib, который имеет высокую пропорцию консервативных аминокислот, которая демонстрирует, что эти части важны для предполагаемой задачи белка Rib, которая заключается в облегчении инфицирования клеток бактериями GBS.

Соответственно, результаты в Таблице 1 демонстрируют, что лидерная последовательность из 32 аминокислот в слитом белке RibN-AlpCN в соответствии с WO 2008127179 в степени, не являющейся незначимой, упакована и взаимодействует с этими важными фрагментами фрагмента Rib слитого белка. Таким образом, лидерная последовательность по времени, т.е. по меньшей мере 30% времени, взаимодействует с этими частями и уменьшает доступ к ним. Соответственно, при использовании для запуска иммунного ответа присутствие указанной лидерной последовательности уменьшает доступ иммунной системы к этим важным частям белка Rib.

Наоборот, более короткий иммуногенный слитый белок в соответствии с SEQ ID

NO: 21 не включает лидерную последовательность. Таким образом, не может быть каких-либо взаимодействий, которые уменьшали бы доступ иммунной системы к этим важным частям и, как следствие, достигается более хороший иммунный ответ.

Следует отметить, что взаимодействия между лидерной последовательностью и доменами Rib осуществляется по различным аминокислотам лидерной последовательности. Таким образом, укорочение иммуногенного слитого белка по WO 2008127179 в каждом случае будет обеспечивать уменьшенное взаимодействие и более хороший доступ иммунной системы ко всем частям домена RibN иммуногенного слитого белка. Соответственно, также минорное укорочение, такое как удаление меньшего количества аминокислот лидерной последовательности, обеспечит более хороший доступ иммунной системы к домену RibN иммуногенного слитого белка.

В соответствии с представленным на Фиг. 5А-5С, лидерная последовательность взаимодействует с одним концевым элементом N-конца Rib. Важность этого наблюдения исследовали в Примере 5 ниже.

Пример 5 – Консервативные области N-конца Rib, отобранные по лидерной последовательности, вовлечены тогда, когда белок Rib взаимодействует с  $\alpha\beta 1$ -интегрином для адгезии к эпителиальным клеткам и инвазии в них

Исследовали важность консервативных областей N-конца Rib, обнаруженных в Примере 4. Выдвинута гипотеза, что консервативные области могут быть вовлечены в облегчение адгезии к эпителиальным клеткам и инвазии в них, учитывая, что Rib представляет собой белок поверхности GBS и что антитела против RibN обеспечивают защиту против инфицирования GBS, включая инвазию в эпителиальные клетки.

Структура в виде альфа-складок для  $\alpha\beta 1$ -интегрина была получена исходя из последовательности, упомянутой в Bolduc et al, *Microbiology* (2007), 153, 4039–4049, и осуществляли симуляции взаимодействия между N-концом Rib, содержащимся в слитом фрагменте в соответствии с SEQ ID NO: 21, и  $\alpha\beta 1$ -интегрином. Фиг. 6 демонстрирует результат, в соответствии с которым  $\alpha\beta 1$ -интегрин представлен в виде черной поверхности, а N-конец Rib представлен в виде светло-серой поверхности. На Фиг. 6А N-конец Rib представлен в ориентации, похожей на Фиг. 5А-5С. Соответственно, хотя лидерная последовательность не представлена на Фиг. 6, она может быть представлена в виде правого концевого элемента N-конца в Rib. Сравнение с Фиг. 5А-5С дополнительно продемонстрировало, что консервативные области, идентифицированные в Примере 4, вовлечены в связывание с  $\alpha\beta 1$ -интегрином. Эти



результаты дополнительно продемонстрировали, что N-конец связывается с доменом 2 (фактор фон Виллебранда, тип А) и доменом 3  $\alpha 1\beta 1$ -интегрин.

Таким образом, Примеры 4 и 5 демонстрируют, что лидерная последовательность взаимодействует с и маскирует консервативную область N-конца Rib, где консервативная область вовлечена в связывание с  $\alpha 1\beta 1$ -интегрином, и, таким образом, с адгезией с эпителиальными клетками и инвазией в них.

Соответственно, иммунизация N-концевой областью Rib с лидерной последовательностью приводит к уменьшенной экспозиции этих консервативных областей вследствие маскирующего эффекта лидерной последовательности. Последнее приводит к менее эффективной иммунной системе и/или антительному ответу против консервативных областей.

Наоборот, если иммунизацию осуществляю с использованием N-конца или Rib, в котором удалена или по меньшей мере укорочена лидерная последовательность (SEQ ID NO: 43), тогда при использовании такого N-конца самого по себе или в виде части слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или SEQ ID NO: 21 эти консервативные области будут в более доступны для иммунной системы. Таким образом, иммунизированному хозяину будет проще продуцировать антитела против консервативных областей. Более эффективная и полная нейтрализация консервативных областей будет увеличивать защиту против адгезии к эпителиальным клеткам и инвазии в них посредством  $\alpha 1\beta 1$ -интегрин.

В заключение, при использовании слитого белка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, пример которого приведен в SEQ ID NO: 21, где лидерная последовательность (SEQ ID NO: 43) составляющего Rib удалена или по меньшей мере укорочена, будет обеспечиваться улучшенная защита против GBS, в частности путем обеспечения улучшенной защиты против адгезии к эндотелиальным клеткам и/или инвазии в них.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**1.** Иммуногенный слитый белок, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, состоящей из:

(1) первой части аминокислотной последовательности, состоящей из 170-178 аминокислот, предпочтительно 174-175 аминокислот, и имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7;

(2) второй части аминокислотной последовательности, состоящей из 165-174 аминокислот, предпочтительно 169-170 аминокислот, и имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14; и возможно:

(3) линкерной части аминокислотной последовательности, состоящей из 1-20 аминокислот и отделяющей первую часть аминокислотной последовательности от второй части аминокислотной последовательности,

и где указанный иммуногенный слитый белок предпочтительно состоит из 335-372 аминокислот, предпочтительно 343-353 аминокислот, более предпочтительно 343-347 аминокислот.

**2.** Иммуногенный слитый белок по п. 1, где:

- первая часть аминокислотной последовательности содержит или предпочтительно состоит из аминокислот 1-175 или 2-175 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и

- вторая часть аминокислотной последовательности содержит или предпочтительно состоит из аминокислот 1-170 или 2-170 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

**3.** Иммуногенный слитый белок по п. 1 или п. 2, где аминокислотная последовательность содержит линкерную часть аминокислотной последовательности, и где указанная линкерная часть аминокислотной последовательности состоит из 1-10 аминокислот, предпочтительно 2-5 аминокислот, более предпочтительно 2 аминокислот, и наиболее предпочтительно представляет собой аминокислотную последовательность EF.

**4.** Иммуногенный слитый белок по любому из пп. 1-3, где указанный иммуногенный слитый белок имеет по меньшей мере 90% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 21.

5. Иммуногенный слитый белок по любому из пп. 1-4, где указанный иммуногенный слитый белок состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 21, или, в качестве альтернативы, где указанный иммуногенный слитый белок состоит из аминокислот 2-347 SEQ ID NO: 21.

6. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, кодирующий иммуногенный слитый белок по любому из пп. 1-5.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 6, где указанная молекула нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью нуклеотидов, представленной в одной из SEQ ID NO: 15-20.

8. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 6 или п. 7.

9. Клетка-хозяин, экспрессирующая иммуногенный слитый белок по любому из пп. 1-5 или содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 6 или п. 7 или вектор по п. 8.

10. Вакцина, содержащая один или более чем один иммуногенный слитый белок по любому из пп. 1-5, молекулу нуклеиновой кислоты по п. 6 или п. 7, вектор по п. 8 или клетку-хозяина по п. 9.

11. Вакцина по п. 10, дополнительно содержащая одно или более чем одно из:

а) дополнительного иммуногенного слитого белка, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 42;

б) дополнительной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный дополнительный иммуногенный слитый белок, где указанная дополнительная молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью нуклеотидов, представленной в одной из SEQ ID NO: 36-41;

в) дополнительного вектора, содержащего указанную дополнительную молекулу нуклеиновой кислоты; или

г) дополнительной клетки-хозяина, экспрессирующей указанный дополнительный иммуногенный слитый белок или содержащей указанный

дополнительный вектор.

**12.** Вакцина по п. 11, где указанная вакцина содержит:

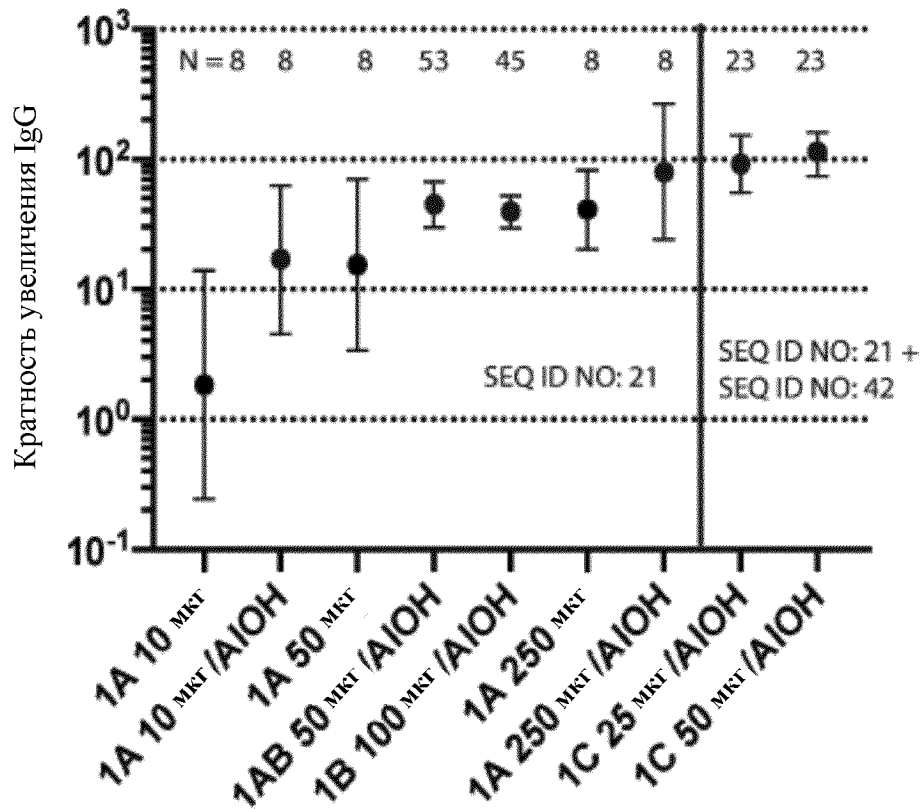
а) иммуногенный слитый белок по п. 5; и

б) дополнительный иммуногенный слитый белок, содержащий, предпочтительно состоящий из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 42, или, в качестве альтернативы, содержащий, предпочтительно состоящий из аминокислот 2-347 SEQ ID NO: 42.

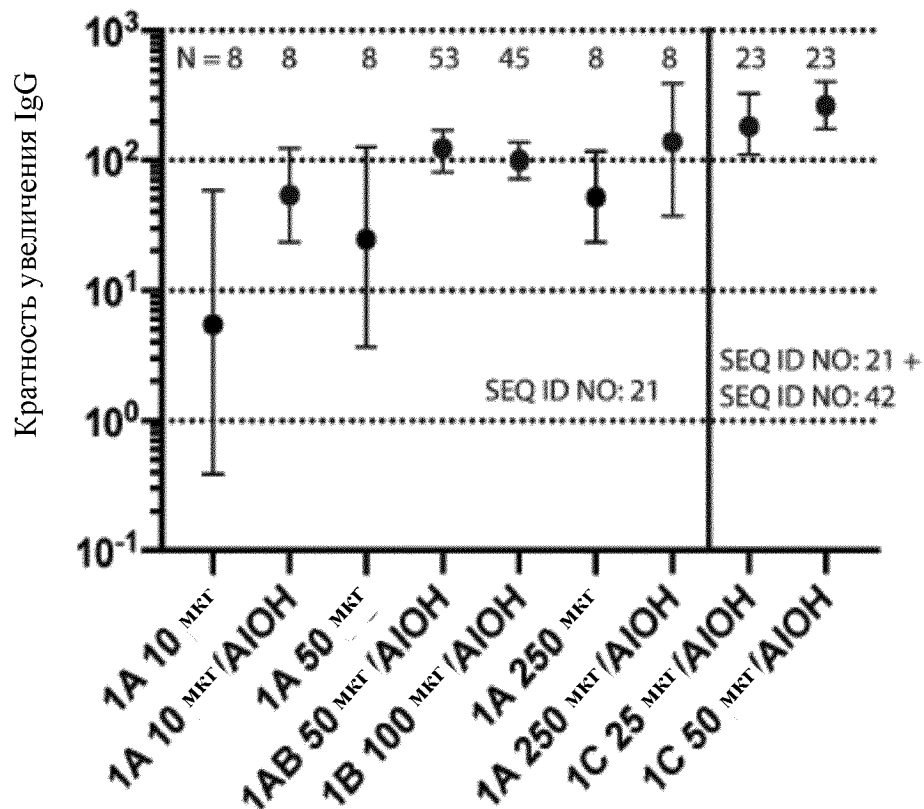
**13.** Вакцина по любому из пп. 10-12, дополнительно содержащая гидроксид алюминия в качестве адьюванта.

**14.** Иммуногенный слитый белок по любому из пп. 1-5, молекула нуклеиновой кислоты по п. 6 или п. 7, вектор по п. 8, клетка-хозяин по п. 9 или вакцина по любому из пп. 10-13 для применения в 1) вакцинации против инфицирования *Streptococcus* группы В, или 2) лечении инфекции, вызванной *Streptococcus* группы В.

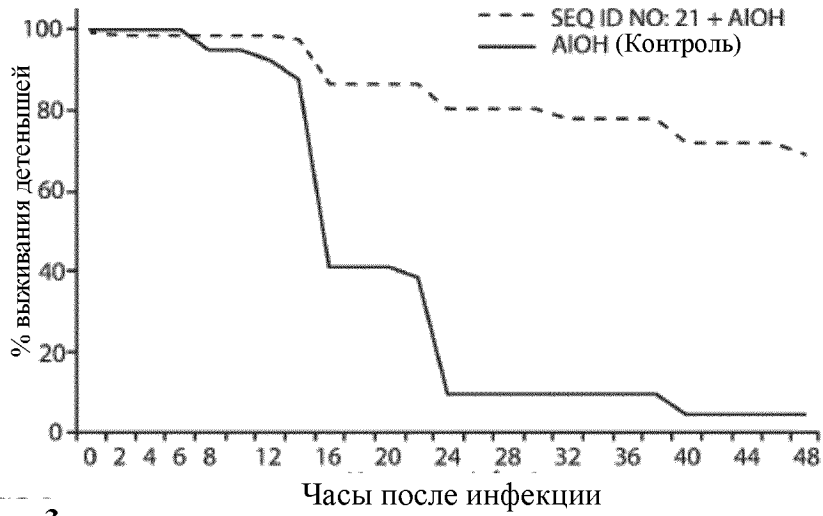
**15.** Иммуногенный слитый белок по любому из пп. 1-5, молекула нуклеиновой кислоты по п. 6 или п. 7, вектор по п. 8, клетка-хозяин по п. 9 или вакцина по любому из пп. 10-13 для применения по п. 14, где указанные иммуногенный слитый белок по любому из пп. 1-5, молекулу нуклеиновой кислоты по п. 6 или п. 7, вектор по п. 8, клетку-хозяина по п. 9 или вакцину по любому из пп. 10-13 вводят субъекту-человеку, представляющему собой женщину.



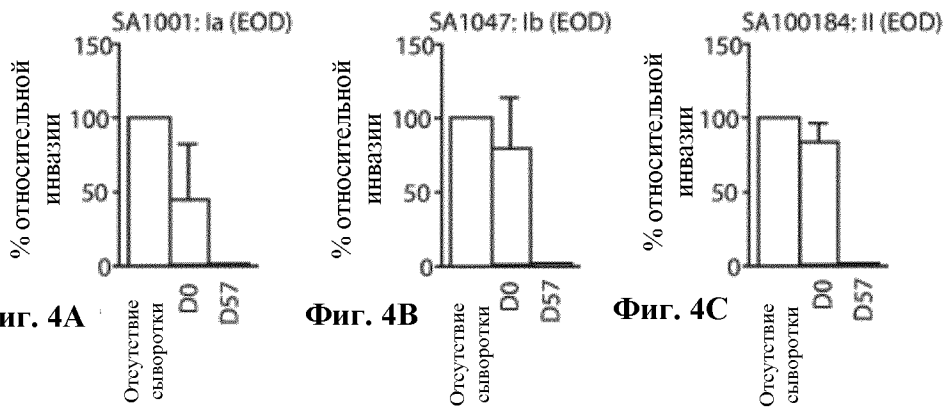
Фиг. 1



Фиг. 2



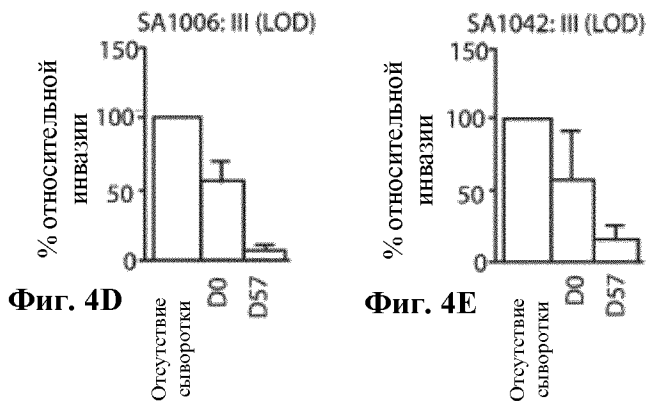
Фиг. 3



Фиг. 4А

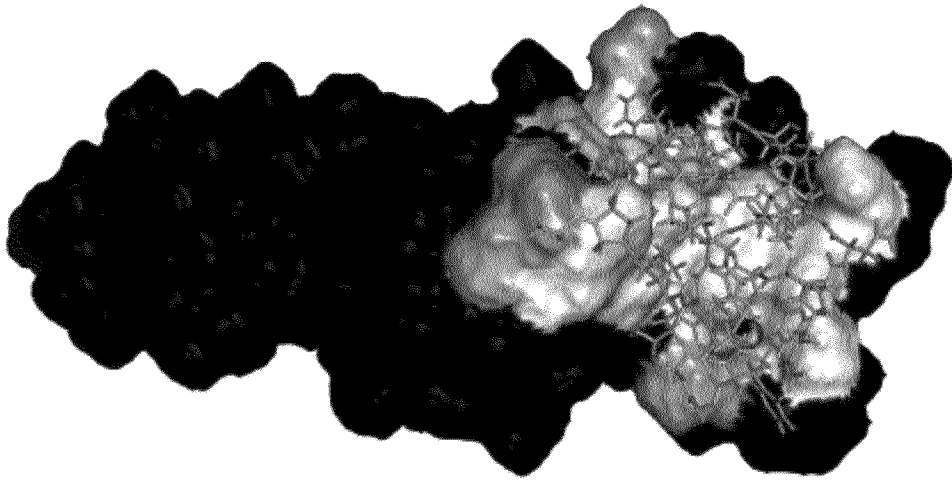
Фиг. 4В

Фиг. 4С

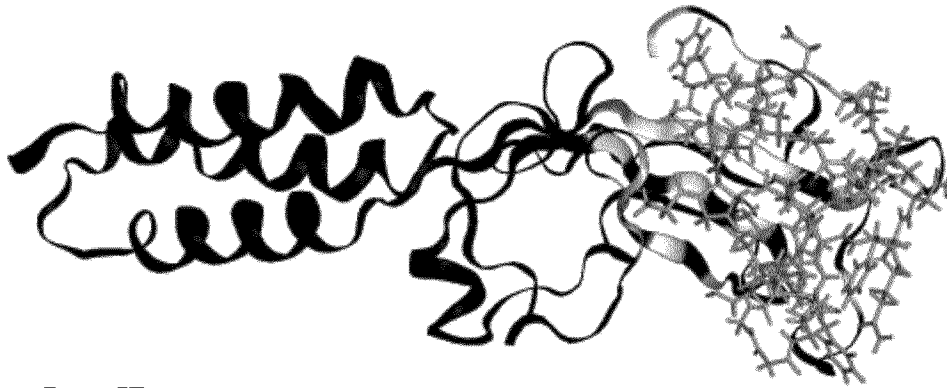


Фиг. 4D

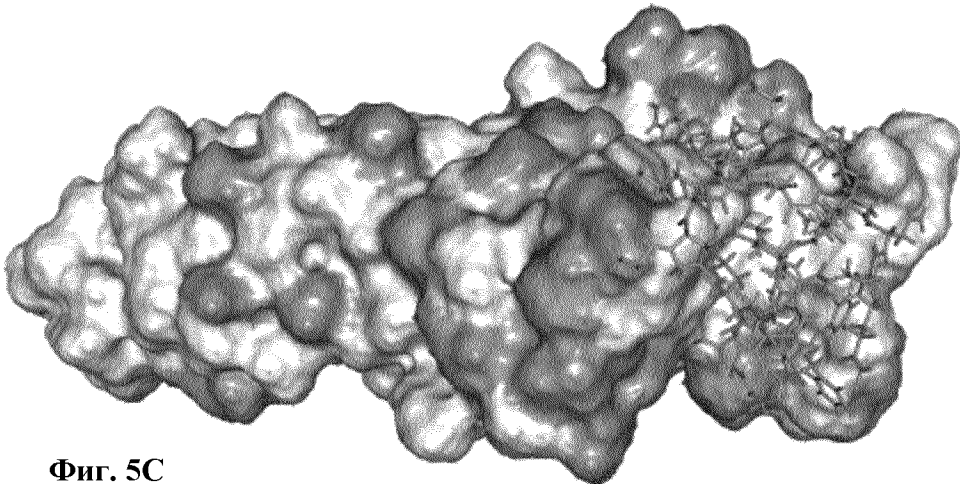
Фиг. 4E



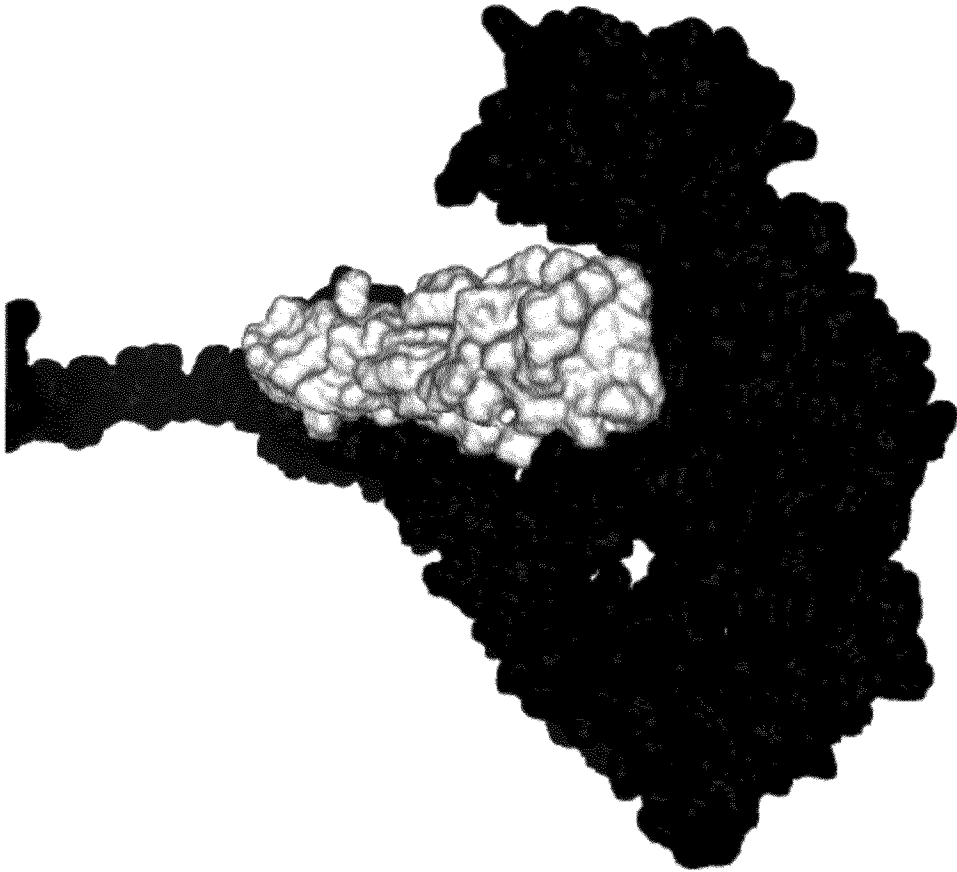
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 5С



Фиг. 6