



(19) RU (11) 2 143 920 (13) С1  
(51) МПК<sup>7</sup> А 61 К 39/085, С 07 К 14/31

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 96112189/13, 04.11.1994  
(24) Дата начала действия патента: 04.11.1994  
(30) Приоритет: 05.11.1993 US 08/147.765  
(46) Дата публикации: 10.01.2000  
(56) Ссылки: WO 93/14198 A1, 22.07.93. EP 0296685 A1, 28.12.88.  
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 05.06.1996  
(86) Заявка РСТ:  
US 94/12752 (04.11.1994)  
(87) Публикация РСТ:  
WO 95/12410 (11.05.1995)  
(98) Адрес для переписки:  
129010, Москва, ул. Большая Спасская, 25,  
стр. 3, ООО "Городисский и Партнеры",  
патентному поверенному Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель:  
Эли Лилли энд Компани (US)  
(72) Изобретатель: Куртис Котс Шайфингер (US),  
Дэвид Ли Смайли (US)  
(73) Патентообладатель:  
Эли Лилли энд Компани (US)

**(54) КОНСТРУИРОВАНИЕ И ПОЛУЧЕНИЕ ВАКЦИНЫ**

(57) Реферат:  
Изобретение предназначено для определения и получения пептидов, связанных с бактериальной адгезией к эластичным эпителиальным тканям молочных желез, которые могут быть использованы в вакцинах для предупреждения мастита сельскохозяйственных животных. Для определения наличия специфических белков у бактерий например у Str. aureus, обладающих способностью прилипать или не прилипать к эластичным эпителиальным

клеткам, получают и экстрагируют стенки клеток бактерий. Белки, присутствующие у адгезирующих бактерии, но отсутствующие у бактерий, используют для получения пептидного субфрагмента. Этот пептид составляет основу маститной вакцины настоящего изобретения. Изобретение позволит получить эффективную вакцину против мастита, блокирующую адгезию штаммов Str. aureus к эластичным эпителиальным клеткам молочных животных. 5 с. и 3 з.п.ф.-лы, 1 табл.

R  
U  
2  
1  
4  
3  
9  
2  
0  
C  
1

RU  
2 1 4 3 9 2 0 C 1



(19) RU (11) 2 143 920 (13) C1

(51) Int. Cl. 7 A 61 K 39/085, C 07 K 14/31

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 96112189/13, 04.11.1994  
(24) Effective date for property rights: 04.11.1994  
(30) Priority: 05.11.1993 US 08/147.765  
(46) Date of publication: 10.01.2000  
(85) Commencement of national phase: 05.06.1996  
(86) PCT application:  
US 94/12752 (04.11.1994)  
(87) PCT publication:  
WO 95/12410 (11.05.1995)  
(98) Mail address:  
129010, Moskva, ul.Bol'shaja Spasskaja, 25,  
str.3, OOO "Gorodisskij i Partnery",  
patentnomu poverennomu Lebedevoj N.G.

(71) Applicant:  
Ehli Lilli ehnd Kompani (US)  
(72) Inventor: Kurtis Kots Shajfinger (US),  
Dehvid Li Smajli (US)  
(73) Proprietor:  
Ehli Lilli ehnd Kompani (US)

(54) CONSTRUCTION AND PREPARATION OF VACCINE

(57) Abstract:  
FIELD: microbiology. SUBSTANCE: invention aims at revealing and isolating peptides fixed by means of bacterial adhesion to elastic epithelial tissues of mammary gland that can be used in vaccines for prevention of mastitis of agricultural animals. In order to reveal specific proteins in bacteria, e.g. in strain aureus, capable of

sticking or not sticking to elastic epithelial cells, walls of bacterial cells are isolated and extracted. Proteins present in adhering cells and missing in other cells are used for preparing peptide subfragment. This peptide constitutes base of mastitis vaccine. EFFECT: provided effective mastitis vaccine blocking adhesion of strain aureus to elastic epithelial cells. 8 cl, 1 tbl, 8 ex

R U  
2 1 4 3 9 2 0  
C 1

R U  
? 1 4 3 9 2 0  
C 1

RU 2143920 C1

Настоящее изобретение предполагает способы определения механизмов микробного прилипания. Знание механизмов, лежащих в основе адгезии микробов, дает возможность выявить молекулу микробы, ответственную за прилипание и, следовательно, позволяет создать вакцину, которая могла бы быть использована для предупреждения или снижения до минимума адгезии микробов к клеткам, медицинским инструментам, протезам и т.д. Таким образом, настоящее изобретение относится к иммунологии и микробиологии.

Адгезия различных бактерий и других микроорганизмов к специфическим клеткам, а также к имплантируемым приспособлениям, таким как протезы, имплантируемые дефибрилляторы, сердечные ритмоводители, искусственные сосуды и др., является серьезной клинической проблемой. Устойчивость прилипающих организмов к антибиотикам и противогрибковым препаратам еще больше усложняет задачу.

Настоящее изобретение включает методы определения природы микробной адгезии посредством оценки несоответствия между поверхностями слипшихся клеток микроорганизмов и неслипшихся организмов. Действенность и необходимость настоящего изобретения иллюстрируется применением описанных выше методов для определения природы адгезии различных видов *Staphylococcus aureus* к эпителиальным клеткам молочных желез коров. Маститная вакцина настоящего изобретения, которая представляет собой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения, иллюстрирует вакцины, получаемые в соответствии со способами настоящего изобретения.

Как известно, целый ряд грам-положительных организмов вызывает маститы. Грам-положительные организмы, такие как, например, *Streptococci*, *Staphylococci* и *Corynebacteria* spp., часто рассматривают в качестве агентов, вызывающих маститы.

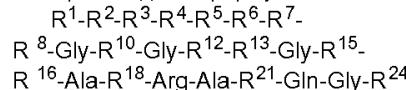
Способность микроорганизмов вызывать маститы коррелируется со способностью этих организмов прилипать к эластичным эпителиальным клеткам вымени коров (A. J. Frost, *Infection and Immunity*, 12:1554-1556 (1975)).

В маститных вакцинах настоящего изобретения используется зависимость между способностью микроорганизмов прилипать к эластичным эпителиальным клеткам вымени коров и конечным патогенезом. С целью определения наличия специфических белков у бактерий, обладающих способностью прилипать к эластичным эпителиальным клеткам, и бактерий, не обладающих способностью прилипать к названным клеткам, получают и экстрагируют стенки клеток бактерий. Белки, присутствующие в слипшихся бактериях, но отсутствующие в бактериях, не способных прилипать к соответствующим клеткам, в дальнейшем используют для получения пептидного субфрагмента, который составляет основу рассматриваемой маститной вакцины настоящего изобретения.

Настоящее изобретение предполагает способы конструирования вакцин путем получения экстрактов клеточных стенок или

мембран, выявления молекул, обуславливающих адгезию при сравнении слипшихся и неслипшихся микробов, биохимического описания молекул, обуславливающих адгезию и использования полученной информации с целью рационального создания вакцины, которая вызывает иммунные реакции, вызывающие в свою очередь, нарушение способности микробы к адгезии.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения предполагает пептидный субфрагмент, который связан с бактериальной адгезией к эластичным эпителиальным клеткам, а также его производные формулы I:



где  $R^1$  представляет собой атом водорода или  $C_{1-16}$ -карбоновую кислоту;

$R^2$  представляет собой Ala, Gly, Ser или пропионовую кислоту;

$R^3$  представляет собой Val, Ile, Leu или D-Val;

$R^4$  представляет собой Lys или Arg;

$R^5$  представляет собой Val, Ile или Leu;

$R^6$  представляет собой Ala, Gly или Ser;

$R^7$  представляет собой Ile, Leu или Val;

$R^8$  представляет собой Asp, Asn или Glu;

$R^{10}$  представляет собой Phe, Tyr или Trp;

$R^{12}$  представляет собой Arg, Asn, Lys или His;

$R^{13}$  представляет собой Ile, Leu или Val;

$R^{15}$  представляет собой Arg, Asn, Lys или His;

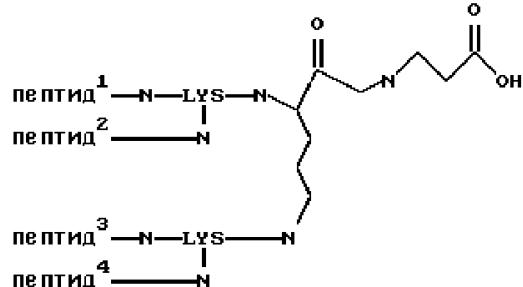
$R^{16}$  представляет собой Leu, Ala, Ile или Val;

$R^{18}$  представляет собой Phe, Asn, Lys или His;

$R^{21}$  представляет собой Ile, Ala, Val или Leu;

$R^{24}$  представляет собой OH, Ala или Ser.

Настоящее изобретение также предполагает пептид сложного антигенного представления с формулой II:



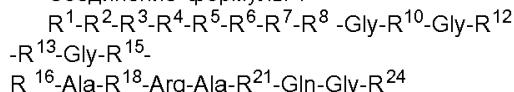
где пептид<sup>1</sup>, пептид<sup>2</sup>, пептид<sup>3</sup> и пептид<sup>4</sup> независимо друг от друга выбирают из числа соединений формулы 1.

Настоящее изобретение также предполагает пептиды и сложные антигенные пептиды в рецептурах, в которых достигается максимальная иммунная реакция на указанные пептиды или указанные пептиды сложного антигенного представления.

Эффективная борьба с маститами коров имеет огромное значение. Молочных животных, страдающих маститом, необходимо лечить с помощью антибиотиков, а также

лечение может привести к накоплению этих антибиотиков в молоке, что по современным регулирующим законам недопустимо. Таким образом, разработка эффективной вакцины против мастита коров имеет коммерческое значение и дает возможность исключить необходимость лечения животных антибиотиками.

Соединение формулы I



где  $R^1$  представляет собой атом водорода или C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>-карбоновую кислоту;

$R^2$  представляет собой Ala, Gly, Ser или пропионовую кислоту;

$R^3$  представляет собой Val, Ile, Leu или D-Val;

$R^4$  представляет собой Lys или Arg;

$R^5$  представляет собой Val, Ile или Leu;

$R^6$  представляет собой Ala, Gly или Ser;

$R^7$  представляет собой Ile, Leu или Val;

$R^8$  представляет собой Asp, Asn или Glu;

$R^{10}$  представляет собой Phe, Tyr или Trp;

$R^{12}$  представляет собой Arg, Asn, Lys или His;

$R^{13}$  представляет собой Ile, Leu или Val;

$R^{15}$  представляет собой Arg, Asn, Lys или His;

$R^{16}$  представляет собой Leu, Ala, Ile или Val;

$R^{18}$  представляет собой Phe, Asn, Lys или His;

$R^{21}$  представляет собой Ile, Ala, Val или Leu;

$R^{24}$  представляет собой OH, Ala или Ser, было получено в результате интенсивных исследований, направленных на определение механизма, посредством которого этиологические маститные агенты прилипают к эластичным эпителиальным клеткам молочных желез молочного скота. Штаммы *Staphylococcus aureus* сравнивают по их способности прилипать к эластичным эпителиальным тканям молочных желез и затем разделяют на две соответствующие группы. Из сросшихся и несросшихся штаммов *S. aureus* экстрагируют препараты внешних мембранных в сросшихся штаммах, но отсутствующих в несросшихся штаммах. Выявлено три белка, которые присутствуют в сросшихся, но отсутствуют в несросшихся штаммах. Молекулярный вес этих белков составляет 36 кДа, 47 кДа и 65 кДа. После химического описания указанных белков белок 36 кДа был выбран как наиболее приемлемый с точки зрения для получения вакцин, защищающих от мастита. Пептид из 22 аминокислот, соответствующий аминному концу белка 36 кДа, был в конечном итоге выбран в качестве оптимального иммуногена для получения противомаститной вакцины. Природная последовательность 22 аминокислот N-конца является предпочтительной для вакцины. Следовательно, в формуле I предпочтительными аминокислотными заместителями являются следующие:

$R^1$  представляет собой атом водорода,  $R^2$  представляет собой Ala,  $R^3$  представляет собой Val,  $R^4$  представляет собой Lys,

$R^5$  представляет собой Val,  $R^6$  представляет собой Ala,  $R^7$  представляет собой Ile,  $R^8$  представляет собой Asp,  $R^9$  представляет собой Gly,  $R^{10}$  представляет собой Phe,  $R^{11}$  представляет собой Cly,  $R^{12}$  представляет собой Arg,  $R^{13}$  представляет собой Gle,  $R^{25}$  представляет собой Arg,  $R^{16}$  представляет собой Leu,  $R^{18}$  представляет собой Phe,  $R^{21}$  представляет собой Ile и  $R^{24}$  представляет собой гидроксигруппу. Другие возможные заместители в формуле I выбираются на основе известных биохимических и иммунологических свойств аминокислот, имеющих аналогичные функциональные группы. Настоящее изобретение включает также иммуногенный субфрагмент соединения формулы I. Пептид сложного антигенного представления формулы II дает представление сложных иммуногенных пептидов формулы I и, таким образом, обеспечивает более крупную молекулу иммуногенных субъединиц, которая может более эффективно вызывать иммунные реакции. Пептиды формулы I, присутствующие в сложном антигенном представлении пептида формулы II, могут быть одним и тем же пентидом или любым сочетанием пептидов формулы I.

Синтез пептидов формулы I может быть легко осуществлен с использованием хорошо известных методик твердофазного синтеза белка. Схемы твердофазных белковых синтезов настоящего изобретения основаны на использовании защитных групп с последующим их снятием. Несмотря на достаточно рутинную природу современных твердофазных пептидных синтезов, для облегчения реализации на практике настоящего изобретения заявители рекомендуют три обзорные работы - G. Barany, et al. International Journal of Peptide and Protein Research, 30: 705-739 (1987); J. M. Stewart, J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984); R.D. Bailey, An Introduction to Peptide and Protein Chemistry, John Wiley and Son. New York (1992) которые могут быть полезны при выборе обычных защитных групп и условий проведения реакций, реагентов для снятия защиты и соответствующих методик, расщепляющих реагентов и рекомендуемых условий и т.д., в тех случаях, когда квалифицированный специалист затрудняется в выборе предпочтительных условий и методик проведения синтеза. Заявители использовали автоматизированный синтезатор пептидов фирмы Applied Biosystems, который полностью укомплектован производителем описанием рекомендуемых методик, растворителями, реагентами и т. д. Конкретные описания практического использования твердофазных синтезов представлены в примерах.

Ниже для более полного понимания настоящего изобретения приведены некоторые термины и аборвейтуры, используемые в данном описании. "Вос" означает трет. -бутиксикарбонил, "Тозил" означает п-толуолсульфонил, "ChxI" означает циклогексил. "2Cl-Z" относится к

RU 2143920 C1

2-хлорбензилоксикарбонилу, "С<sub>1</sub>-С<sub>16</sub>-карбоновая кислота" означает неразветвленный углеводород, содержащий от 1 до 16 атомов углерода в дополнение к "аминоконцевой" карбоновой кислоте. Необязательная С<sub>1</sub>-С<sub>16</sub>-карбоильная группа формулы I является только концевой аминогруппой. В степени замещения и насыщения остатка С<sub>1</sub>-С<sub>16</sub>-карбоновой кислоты существует определенная свобода. Примерами подходящих алициклических карбоновых кислот являются: уксусная, пропионовая, масляная, валериановая, капроновая, энантовая, капроловая, пеларгоновая, каприновая, ундекановая и додекановая кислоты. Как указывалось выше, могут также использоваться ненасыщенные алициклические монокарбоновые кислоты и замещенные насыщенные и ненасыщенные монокарбоновые кислоты.

Квалифицированный специалист будет оценивать генетическую пластичность каждого фрагмента, единственная функция которого заключается в формировании конца. Таким образом, настоящее изобретение включает С<sub>1</sub>-С<sub>16</sub>-карбоновые кислоты и их рассмотренные выше модификации.

LYS в формуле II означает лизин. Субъединицы (R<sup>1</sup>-R<sup>24</sup>) соединения формулы I обычно представляют собой L-аминокислоты, за исключением пропионовой кислоты в положении R<sup>4</sup> и D-Vai в положении R<sup>3</sup>. Соответственно связи между субъединицами представляют собой пептидные связи. Концы пептидов в формулах I и II (R<sup>1</sup>-R<sup>24</sup>) определяют таким образом, чтобы учесть наличие атома водорода или гидроксильной группы, которые при добавлении другой аминокислоты исключаются. Таким образом, когда заместитель R<sup>1</sup> = H, атом водорода не является дополнительным атомом водорода, а является атомом водорода соответствующей аминокислоты или пропионовой кислоты R<sup>2</sup>. Аналогично, когда заместитель R<sup>24</sup> = OH, гидроксильная группа является не дополнительной OH-группой, а OH-группой аминокислоты R<sup>23</sup>. Если заместитель R<sup>24</sup>=Ala или Ser, то присутствует полная аминокислота и концевая карбоильная группа карбоновой кислоты доступна для образования амидной связи, если необходимо получение соединения формулы II. Пропионовая кислота в положении R<sup>2</sup> может быть либо н-пропионовой кислотой, либо изо-пропионовой.

Предпочтительно выделение (по технологии генной инженерии) пептидов формулы I, которые состоят из L-аминокислот. Таким образом, пептиды формулы I, которые содержат только природные аминокислоты, могут быть наиболее эффективно получены по технологии генной инженерии с использованием аминокислотных последовательностей и известного вырождения генетического кода для создания экспрессирующего вектора, способного выделять большие количества пептида при минимальных затратах.

Современное состояние молекулярной биологии, промышленная доступность

обычных ДНК-последовательностей и экспрессирующих векторов для использования в бактериях, дрожжах и клетках млекопитающих таково, что нет необходимости в подробном обсуждении генной инженерии. Специалист, желающий на практике реализовать достижения генной инженерии для получения пептидов настоящего изобретения, может обратиться к работами J. Sambrook, et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (2d ed" 1989); F.M. Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (1989). Названные выше работы служат прекрасным дополнением к любому обсуждению генной инженерии.

Рецептуры, подходящие для того, чтобы вызвать иммунную реакцию, хорошо известны. Полный адьювант Фрейнда (ПАФ, CFA), по-видимому, является наилучшим адьювантом из числа известных адьювантов, обеспечивающих получение оптимальной иммунной реакции. Однако присутствие в полном адьюванте Фрейнда Micobacteria и воспаление, появляющееся при его повторных введениях, ограничивают применение такого адьюванта для лечения молочных животных.

В настоящее время существует целый ряд адьювантов на основе природных и синтетических масел, и они легко могут быть использованы в настоящем изобретении. Краткое обсуждение таких адьювантов приводится ниже.

К адьювантам может быть отнесен любой препарат, который при одновременном введении с антигеном повышает иммунную реакцию на антиген. Антигены представляют собой материалы, которые отрицательно воздействуют на иммунную систему хозяина и вызывают иммунную реакцию на материал, нарушающий работу иммунной системы (то есть антиген).

Механизм действия адьювантов недостаточно ясен, но полагают, что они притягивают иммунореактивные лимфоциты к сайту антигена, локализуют антиген на сайте воспаления (депо-эффект), задерживают катарболизм антигена, активируют метаболизм реактивных клеток и стимулируют взаимодействие лимфоидных клеток.

Адьюванты могут действовать и по другим механизмам. Например, они могут связывать и модифицировать аутоантиген, изменять его конформацию на границе раздела вода/масло адьюванта Фрейнда или неспецифически стимулировать Т и/или В-лимфоциты.

Большое число адьювантов также может продуцировать и неспецифическое "увеличение" иммунореактивности, если их вводят без специфического антигена. Эффективными адьювантами являются масла, минеральные соли, двухспиральные нуклеиновые кислоты, продукты микроорганизмов и целый ряд других агентов.

Наиболее широко известными масляными адьювантами являются полный и неполный адьюванты Фрейнда, которые кратко описаны выше. Эти адьюванты содержат эмульсию воды или солевого раствора в масле. Обычно растворимый антиген растворяют в солевом растворе и эмульгируют в равных частях масла; например,- Bayol F<sup>TM</sup> (42.5% парафина, 31.4% моноциклических нафталинов и 26.1% полициклических

нафталинов) или Arlacel A (монолат маннита). Добавление нейтрализованных *Mycobacteria* значительно повышает активность адьювантов и такие адьюванты называют полными, в отличие от неполных адьювантов, не содержащих *Mycobacteria*. Другие микробные продукты, в том числе экстракты липидов белка, также могут быть использованы вместо микобактерий. Установлено, что наблюдаемое повышение эффективности антигенов в присутствии полных адьювантов обусловлено, главным образом, гликолипидной и пептидогликановой частями (воск Д) *Mycobacteria*.

Вакцины, в которых используется однозмульсионная система адьювантов, наиболее эффективны при подкожном или внутримышечном введении. Двойные эмульсии (вода-в масле-в воде) представляют собой более "свободно-текущие" эмульсии и имеют больше возможных вариантов введения.

Использование минеральных солей является еще одним способом повышения иммуногенности и, следовательно, эффективности вакцины. Растворы антигенов, осажденные минеральными солями, такими как фосфат калия, двуокись кремния, квасцы (алюмокалиевые квасцы или фосфат алюминия) или паста окиси алюминия, продуцируют гранулемы на участке инъекции и в лимфатических узлах, которые денируют область инъекции. Иммунная гранулема функционирует аналогично гранулеме, продуцируемой адьювантом Фрейнда. Осажденные квасцами антигены используются для повышения иммунной реакции у человека при профилактической вакцинации к антигенам, например, к дифтерийному токсину.

Нерастворимые коллоидные носители составляют еще один класс адьювантов. Кроме осадков квасцов для приготовления адьювантов могут быть использованы коллоидные носители или отдельно, или в сочетании с микробными продуктами или экстрактами и антигеном. Для стимулирования продуцирования антитела против абсорбированных антигенов, как оказалось, может быть использована blood charcoal. Свойствами адьювантов обладают также альгинат кальция или альгинат натрия с контролируемой длиной полимерной части. Полиакриламидные гели также достаточно эффективно стимулируют продуцирование антитела к небольшим количествам инкапсулированного антигена. В качестве эффективного адьюванта успешно используют бентонит.

Метилированный сывороточный альбумин и другие положительно заряженные белки достаточно эффективны в качестве адьювантов при смешении с образованием осадка с отрицательно заряженным антигеном, ДНК или полинуклеотидом с образованием.

Использование микробных экстрактов в качестве адьювантов уже кратко описывалось. Эндотоксины, такие как внутриклеточные липополисахариды грам-отрицательных бактерий, обладают способностью увеличивать иммунную реакцию. Эндотоксины могут выполнять функцию адьюванта, если они назначаются систематически, но более эффективным, если их вводят вместе с антигеном. Большое число

эндотоксинов способно стимулировать синтез антител и пролиферацию В-клеток, а также увеличивать фагоцитарную активность посредством макрофагов.

Предпочтительными эндотоксинами являются эндотоксины из *E. coli* 0111:B4, видов *S. Typhimurium*; *S. enteriditis* и *S. minnesota*. Клетки стенок *Mycobacteria* и некоторые грибы также повышают иммунную реакцию. Эти агенты, по-видимому, притягивают и активируют макрофаги, увеличивая таким образом фагоцитоз на участке воспаления, вызванного антигеном, что в свою очередь приводит к увеличению антигенного проявления А-клетками и в свою очередь увеличивает возбуждение антиген-реактивных клеток В-лимфоцитов, а также медиаторные функции клеток (Т-клеток).

Полинуклеопептиды, особенно двухспиральные полинуклеотиды, такие как полинозин-полицитидиловая (поли-ИЦ) кислота или полиадениловая-полиуридиновая (полу-АУ) кислота являются потенциальными адьювантами и иммуностимуляторами. Они, как оказалось, действуют путем активации антигенреактивности Т-клеток.

Полинуклеотиды также могут служить для активации макрофагов.

В качестве адьювантов находят применение *Bacillus cal-mette guerin* (BCG); *Corynebacterium parvum*, *Listeria monocytogenes* и *Bordetella pertussis* или экстракты этих бактерий. Левамизол (антигельминтное средство) также выполняет функцию адьюванта, вероятно, за счет своей способности активировать Т-клетки, повышать уровни комплементарные и активировать макрофаги.

Выбор адьюванта или сочетания адьювантов может быть легко сделан квалифицированным в данной области специалистом. Адьюванты, которые обсуждались выше, могут быть использованы при проведении экспериментальных исследований, а также в практической ветеринарии. Маститные вакцины настоящего изобретения могут быть рецептурированы с использованием любого из названных выше адьювантов, и такое использование любого из адьювантов в сочетании и в комбинации с заявляемыми пептидами подразумевается настоящим изобретением и входит в его объем.

Маститные вакцины настоящего изобретения, как оказалось, эффективно вызывают гуморальные реакции, в том числе образование антител, которые блокируют связывание прилипающих бактериальных штаммов к культивируемым эпителиальным клеткам молочных желез. Протоколы вакцинации и детальное описание метода оценки бактериальной адгезии к эпителиальным клеткам молочных желез коров представлены в примерах. В табл. 1 приведены данные, подтверждающие эффективность маститных вакцин настоящего изобретения с точки зрения стимулирования гуморальных реакций, ингибирующих адгезию *S. aureus* к эластичным эпителиальным клеткам молочных животных.

Понятие "До" относится к нормализованной способности животных блокировать связывание до вакцинации. Понятие "После" относится к уровню после

вакцинации. Величины "БУСТ" соответствуют величинам, наблюдаемым после проведения бустер-вакцинации, описанной в примерах. Методики, используемые при получении данных, представленных в табл. 1, приведены в примере 6.

Вакцины настоящего изобретения особенно полезны в ветеринарии при лечении мастита у молочного скота. Прилипание бактерий к эластичным эпителиальным клеткам при мастите особенно чувствительно к вакцинам настоящего изобретения вследствие того, что способность вакцины блокировать прилипание бактерий приводит к выходу бактерий через нормальные молочные каналы.

Представленные выше обсуждение и результаты относятся в первую очередь к предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, в котором заявляемый способ используется для конструирования маститных вакцин. Квалифицированный специалист понимает, что настоящее изобретение может быть экстраполировано на множество других областей, где микробная адгезия составляет проблему и, следовательно, подразумевает и другие варианты применения настоящего изобретения, которые также входят в объем настоящего изобретения.

Примеры, в которых описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, иллюстрируют его, но не ограничивают.

#### Пример 1.

##### Синтез AVKVAIDGFGGRIGRIFRAIQG-QH

С помощью циклов двойного связывания на пептидном синтезаторе Applied Biosystems 430A получают 328 мг (0.25 мМ) смолы Boc-GlyOCH<sub>2</sub>PAM (Applied Biosystems) с использованием Всех аминокислот со следующими группами, защищающими боковые цепи: Arg (тозил), Asp (Chx1) и Lys (2-Cl-Z). С полученной смолы снимают N-концевую Boc-группу с помощью TFA-цикла для снятия защиты. Затем смолу переносят в HF реакционный сосуд, где удаляют растворитель и сушат смолу в вакууме. Получают 1.03 г. Затем в сосуд добавляют 1 мл м-крезола и подсоединяют к устройству для получения фтористого водорода (HF, Peninsula Lab.), охлаждают до -78°C, откачивают и конденсируют в сосуде приблизительно 15 мл жидкого фтористого водорода. Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при охлаждении в ледяной бане, затем удаляют HF и полученный остаток суспензируют в 200 мл этилацетата. Твердый продукт фильтруют через фильтр Шотта и дважды промывают эфиром. Пептид солюбилизируют и отделяют от смолы путем промывания собранного продукта 15 мл 50%-ной водной уксусной кислоты (AcOH) (2 раза), 15 мл 10%-ной водной AcOH (2 раза) и 15 мл воды (1 раз). Объединенные водные фильтраты замораживают и леофилизируют.

Леофилизованный продукт снова растворяют в 15 мл 50%-ной водной AcOH, 15 мл 10%-ной водной AcOH и 3 мл CH<sub>3</sub>CN. Отбирают 5 мкл полученного раствора, разбавляют 500 мкл 0.1% TFA и 25 мкл впрыскивают на колонку Vydac C18 (0.46 x 15 см) с использованием для анализа жидкостной хроматографии быстрого разрешения (ЖХБР) (Pharmacia). Объемная

скорость потока составляет 0.5 мл/мин. Хроматографию проводят при комнатной температуре. Для постоянного контроля за разделением используют УФ-монитор с фильтром 214 нм и регулировочную шкалу 0.2A на мониторе системы ЖХБР. В качестве раствора для хроматографии A используют 0.1% TFA, в качестве раствора B - 0.1% TFA/50% CH<sub>3</sub>CN с градиентом 50% B, 5% B, 1% B, 40% B, 0% B и 5% B.

Оставшийся раствор загружают на колонку Vydac C18 (2.2 x 25 см) для препаративной очистки с помощью ЖХБР с использованием градиента 25% B в течение 50 мин, затем с градиентом от 25 до 65% в течение 450 мин. Собирают пятиминутные фракции (25 мл).

УФ-поглощение при 214 нм контролируют с помощью регулировочной шкалы 2.0A монитора ЖХБР. Образцы по 40 мкл фракций 60-74 разбавляют в соотношении 1 :10 с помощью 0.1% TFA и 20 мкл каждого образца анализируют с помощью ВЭЖХ. Фракции 64-68 объединяют, замораживают и леофилизируют, получают 112 мг. Образец полученного продукта исследуют с помощью аминокислотного анализа и масс-спектрометрии. Мольные отношения аминокислот подтверждают получение желаемого продукта.

Масс-спектрометрия при бомбардировке быстрыми атомами указывает на наличие помимо желаемого продукта с молекулярным весом 2315.75 двух компонентов с более высоким молекулярным весом (2375.0 и 2357.4). В соответствии с данными ВЭЖХ степень чистоты продукта составляет более 90%.

#### Пример 2.

##### Синтез больших количеств AVKVAIDGFGGRIGRIFRAIQG-QH

Методика синтеза, расщепления и очистки аналогична методике, описанной в примере 1. При синтезе AVKVAIDGFGGRIGRL-AFRAIQG-OH используют 0.65 г (0.5 мМ) смолы Boc-GlyOCH<sub>2</sub>PAM и получают 2.1 г конечной пептидированной смолы (выход 98%). При расщеплении фтористым водородом используют 1.5 мл м-крезола и 20 мл фтористого водорода, после леофилизации получают 1.06 г сырого продукта. В соответствии с данными ВЭЖХ полученный продукт имеет степень чистоты 75%, а аминокислотный анализ показывает, что присутствуют все необходимые аминокислоты. Аминокислотные отношения находятся в ожидаемом для сырого пептида интервале, но разброс величин несколько выше предполагаемого. В масс-спектре отсутствует продукт с массой 2315.75. Отсутствие продукта с такой массой приписывают наличию фрагмента Asp-Gly в положениях 7 и 8 и HF-расщеплению.

#### Пример 3.

##### Синтез AVKVAIEGFGAIGRIFRAIQG-OH

Синтез, очистку и расщепление проводят по методике примера 1. При проведении данного синтеза положения 7 и 8 отличаются от соответствующих положений продукта примера 2. Положения 7 и 8 этого пептида выбраны так, чтобы они были совместимы с условиями расщепления фтористым водородом данного процесса. С помощью синтеза, при котором для защиты боковой цепи Gly<sup>7</sup> служит Chx1, получают 650 мг (0.5

мМ) смолы Вос" GlyOCH<sub>2</sub>PAM. Двойное связывание осуществляют на пептидном синтезаторе AB1 430A в соответствии с методикой примера 1. После сушки получают 2.08 г (97%) пепидилированной смолы. По методике примера 2 проводят HF-расщепление. Выделенный и промытый водой твердый продукт анализируют с помощью ВЭЖХ, а оставшиеся 100 мл водного раствора очищают с помощью препаративной хроматографии.

Фракции 90-107 объединяют, замораживают и леофилизируют, получают 400 мг. В соответствии с данными ВЭЖХ чистота продукта - 95%. Аминокислотные отношения соответствуют теоретическим значениям, а данные масс-спектрометрии подтверждают наличие продукта с желаемым молекулярным весом (2329.78).

#### Пример 4.

Синтез сложного антигенного представления маститного пептида: (AVKVAIDGFGGRIGKLAFAIQG)<sub>4</sub> (САП с 4 ответвлениями)

По методике примера 1 с помощью твердофазного синтеза на синтезаторе пептидов AB1 430A (Applied Biosynthesis) получают 1 г (0.5 мМ) сложного антигенного представления (САП) трет. -Вос-смолы с 4 ответвлениями. После сушки получают 2.7 г пептида и при расщеплении используют 25 мл жидкого фтористого водорода. После удаления HF и осаждения эфиrom отфильтровывают твердый продукт, который промывают эфиrom, пептид экстрагируют путем промывания 50%-ной водной AcOH (2 раза), 10%-ной водной AcOH (2 раза) и водой. Объединенные водные экстракти замораживают и леофилизируют. Получают 830 мг. При анализе с помощью ВЭЖХ проявляется один широкий пик, а аминокислотный анализ показывает, что аминокислотные отношения лежат в интервале от 68 до 127% от теоретических значений. Содержание белка, как установлено, соответствует 36%. Полученный продукт используют для вакцинации без дополнительной очистки и описания.

#### Пример 5.

##### Композиция вакцины

Предпочтительную маститную вакцину настоящего изобретения готовят в виде двойной эмульсии (вода-в масле-в воде). Необходимое количество предпочтительного пептида растворяют в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (ФБР), содержащем 0.5% CaCl<sub>2</sub>, и эмульгируют в эквивалентном объеме полного адьюванта Фрейнда (Difco) с помощью смесителя Omni Corp., снабженного микроприспособлениями. Для предупреждения термического повреждения пептида используют ледянную баню. Другая методика эмульгирования заключается в использовании двух шприцов и запорного вентиля (Leur Lock Valve) для многократного перемещения эмульсии между шприцами. Независимо от способа эмульгирования эмульсия должна быть проверена с точки зрения устойчивости к рассеиванию в воде. Для проведения такой оценки каплю эмульсии помещают на поверхность воды и наблюдают за рассеиванием эмульсии. Если эмульсия остается на поверхности воды в течение пары минут, то она считается хорошей.

Пептид в ФБР (исходная водная фаза), эмульгированный в масле (адьювант Фрейнда), затем эмульгируют в равном объеме 2% TWEEN™ 80 (Sigma) с использованием смесителя, снабженного микроприспособлениями. Также можно использовать шприцы с запорным вентилем.

#### Пример 6.

##### Протоколы вакцинации

###### Вакцинация крупных молочных животных

До начала вакцинации у каждого животного отбирают небольшую пробу крови. В табл. 1, значения, полученные для этих образцов, представлены в столбце "До". При проведения вакцинации используют 1 мл указанного инъекционного средства и все инъекции проводят подкожно. Животным контрольной группы вводят по 1 мл ФБР каждый раз, когда животным подопытной группы вводят вакцину. Начальная вакцинация включает 50 мкг

предпочтительного пептида, эмульгированного в модифицированном полном адьюванте Фрейнда, описанном в примере 5. Через 7 дней после первичной инъекции каждому "подопытному животному" вводят подкожно вторую инъекцию 75 мкг в модифицированном неполном адьюванте Фрейнда (суммарный объем 1 мл).

Подопытные животные получают 100 мкг предпочтительного пептида в модифицированном неполном адьюванте Фрейнда. Бустер-вакцинацию проводят через 7 дней после начала вакцинации для всех подопытных животных, получивших 100 мкг модифицированного неполного адьюванта Фрейнда. Отбирают образцы крови и оценивают на наличие антител, которые могут блокировать адгезию бактерий к эластичным эпителиальным клеткам.

##### Вакцинация коз

Высокая стоимость проведения исследований на крупных молочных животных привела к тому, что для предварительных исследований с целью определения сероконверсии (продуцирование антител против предпочтительного пептидного иммуногена настоящего изобретения) используют коз. Протокол вакцинации, график отбора проб и полученные результаты приведены ниже.

Неделя 1 2 3 4 6 7 8 10

Введение вакцины x x x x x

Отбор образцов крови x x x x x x x

% ингибирования 8.8 31 37 46 55 56 52

#### Пример 7

Препарат эпителиальных клеток молочных желез коров

##### А. Выделение тканей

Отбирают животных с учетом нормального функционирования вымени, то есть с учетом отсутствия заболеваний или повреждений. Животных безболезненно умерщвляют и отделяют вымя. Вымя тщательно промывают стерильным 0.85%-ным солевым раствором при комнатной температуре. Затем вымя рассекают на две части параллельно среднему лигаменту. Отбирают здоровые ткани. Выбор здоровых тканей требует определенного навыка. Даже когда специалист, выполняющий данную процедуру, не имеет достаточной квалификации, заявители настоящего изобретения предполагают, что отбираются ткани, которые по внешнему виду являются

гранулярными. Отобранные образцы ткани разрезают на мелкие кусочки до тех пор, пока фрагменты ткани не будут проходить через иглу 20-го размера. Фрагменты тканей помещают в стерильный контейнер, содержащий сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) (Difco), который содержит гентамицин и фунгизон (50 частей/миллион). Существует две модификации HBSS, одна из которых содержит Mg и Ca. HBSS без Mg и Ca обозначается HBSS<sup>-</sup>. Квалифицированный специалист понимает необходимость промывания полученных хирургическим путем образцов с помощью физиологически приемлемых растворов, содержащих потенциальные антибиотики и противогрибковые препараты, для снижения вероятности загрязнения получаемых культур. Могут быть использованы также и другие солевые растворы, антибиотики и противогрибковые препараты.

#### Б. Препаратор тканей

Приблизительно 100 г ткани, подготовленной на стадии А, помещают приблизительно в 400 мл свежеприготовленного охлажденного льдом HBSS. Ткани выдерживают во льду до проведения следующих экспериментов, которые необходимо выполнять как можно быстрее. Образцы небольших фрагментов ткани извлекают из стерильного сосуда, в котором они измельчены до кашеобразной консистенции. Измельченные образцы объединяют и промывают холодным HBSS до тех пор, пока надсадочная жидкость не перестанет быть молочной.

#### В. Методика сжигания

Для сжигания внутриклеточных матриц и выделения отдельных клеток готовят ферментный "коктейль". Раствор ферментов готовят путем растворения в 400 мл HBSS<sup>-</sup>, содержащем гентамицин и фунгизон, следующих компонентов:

Коллагеназа - 1.38 г

Альфа-химотрипсин - 1 г

Эластаза - 20 мг

Гуалуронидаза - 1 г

Соевый трипсиновый ингибитор - 50 мг

Бычий сывороточный альбумин - 10 г

Указанные реагенты поставляются различными компаниями.

Предпочтительными поставщиками являются Sigma Chemical Company и Worthington Biochemicals. Полученный ферментный коктейль фильтруют, стерилизуют и используют для сжигания приблизительно 100 г тканей. Сжигание проводят при 37 °C в течение приблизительно 45 мин. Точное время зависит от температуры, смешения, размера фрагментов ткани, активности ферментов и т.д. Заявители настоящего изобретения рекомендуют периодически отбирать аликвоты сжигаемой смеси и оценивать на наличие скоплений, содержащих более 100 клеток. Для этих целей используют микроскоп и гемоцитометр.

Сосуд для сжигания извлекают из водяной бани с температурой 37°C или из инкубатора (предпочтительно использовать водяную баню вследствие быстрого установления температурного равновесия по сравнению с инкубатором) и жидкость декантируют в стерильные пробирки с использованием сита на 20 меш для фильтрации жидкости.

Оставшиеся скопления, содержащие более 200 клеток, если они присутствуют, частично разрушают с использованием специальной резиновой палочки (вместо палочки можно использовать фиксатор шприца с резиновым наконечником). Сосуд для сжигания снова помещают в водяную баню, при тщательном контроле получают препарат со скоплениями из 50-100 клеток. Важно исключить избыточное сжигание, чтобы получить жизнеспособный препарат, который может быть использован.

Колбу извлекают из водяной бани и жидкость декантируют через стерильное сито Collector™ (20 меш) с использованием при необходимости специальной палочки для разрыва любых остаточных скоплений, которые не проходят через отверстия. Ткани, оставшиеся на сите, выбрасывают, а препарат клеток переносят в пробирку для центрифugирования. Клетки собирают путем центрифугирования, дважды промывают HBSS и снова супензируют в среде Media 199 с солью Эрла (Earl's salt) (Difco), содержащей фетальную телячью сыворотку и 10% диметилсульфоксида, при концентрации клеток приблизительно  $6 \cdot 10^6$  клеток/мл.

#### Г. Хранение тканей

Препарат клеток со стадии В делят на аликвоты по 1 мл и помещают в пластиковые криопробирки на 2.0 мл (Sarstedt, W. Germany). Пробирки предварительно замораживают в холодильнике при -70°C в течение 24 ч, а затем переносят для хранения в жидкий азот.

#### Пример 8

##### Оценка ингибирования связывания

А. Эпителиальные клетки молочных желез

Объединяют три криопробирки с эпителиальными клетками молочных желез и промывают три раза 40 мл ФБР, pH 7.2, при 25°C.

#### Б. Выращивание бактерий

С помощью петли переносят инокулят штамма *Staphylococcus aureus*, который, как заранее установлено, прилипает к эпителиальным клеткам молочных желез, в 5 мл стерильного соевого бульона и инкубируют в течение 20 ч при 39°C. Клетки собирают центрифугированием и промывают один раз равным объемом ФБР. После промывания клетки супензируют в ФБР с концентрацией  $10^6$  клеток/мл.

#### В. Оценка бактериальной адгезии

В стерильной стеклянной пробирке (12 x 75 мм) смешивают промытые эпителиальные клетки молочных желез (0.5 мл,  $10^4$  клеток/мл супензии) с 0.5 мл супензии бактериальных клеток, полученной на стадии Б, и выдерживают в бане шейкера при 39°C в течение 30 мин. После инокулирования смесь клеток промывают четыре раза ФБР для удаления не прилипших бактерий. Берут мазки, сушат на воздухе и окрашивают с помощью фиолетового кристаллического грама в течение 15 мин. Количество бактерий, прилипших к 100 эпителиальным клеткам, определяют путем подсчета количества *Staphylococcus aureus*, прикрепившихся к 25 клеткам молочных желез в нескольких мазках.

Эффективность вакцин настоящего изобретения определяют, в частности, путем титрования сыворотки, полученной от вакцинированных животных, и сравнения

RU 2143920 C1

способности разбавленных серий ингибировать адгезию. Полученные данные представлены в табл. 1.

### Формула изобретения:

1. Пептид маститной вакцины, ответственный за бактериальную адгезию к эластичным эпителиальным клеткам, имеющий общую структурную формулу

$$R^1-R^2-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-R^8-Gly-R^{10}-Gly-R^{12}-R^{13}-Gly-R^{15}-R^{16}-Ala-R^{18}-Arg-Ala-R^{21}-Gln-Gly-R^{24},$$

где  $R^1$  представляет собой атом водорода или С<sub>1</sub>-С<sub>16</sub>-карбоновую кислоту;

$R^2$  представляет собой Ala, Gly, Ser или пропионовую кислоту;

$R^3$  представляет собой Val, Ile, Leu или D-Val;

$R^4$  представляет собой Ius или Arg;

$R^5$  представляет собой Val, Ile или Leu;

$R^6$  представляет собой Ala, Gly или Ser;

$R^7$  представляет собой Ile, Leu или Val;

$R^8$  представляет собой Asp, Asn или Glu;

$R^{10}$  представляет собой Phe, Tyr или Trp;

$R^{12}$  представляет собой Arg, Asn, Lys или His;

$R^{13}$  представляет собой Ile, Leu или Val;

$R^{15}$  представляет собой Arg, Asn, Lys или His;

$R^{16}$  представляет собой Leu, Ala, Ile или Val;

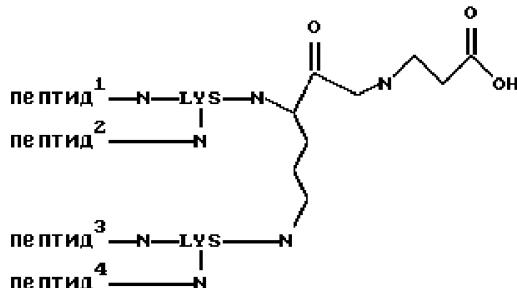
$R^{18}$  представляет собой Phe, Asn, Lys или His;

$R^{21}$  представляет собой Ile, Ala, Val или Leu;

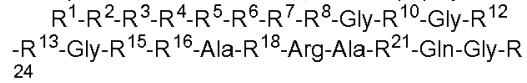
$R^{24}$  представляет собой OH, Ala или Ser.

2. Пептид по п.1, где  $R^2$  представляет собой Ala,  $R^3$  представляет собой Val,  $R^4$  представляет собой Lys,  $R^5$  представляет собой Val,  $R^6$  представляет собой Ala,  $R^7$  представляет собой Ile,  $R^8$  представляет собой Asp,  $R^9$  представляет собой Gly,  $R^{10}$  представляет собой Phe,  $R^{11}$  представляет собой Gly,  $R^{12}$  представляет собой Arg,  $R^{13}$  представляет собой Ile,  $R^{15}$  представляет собой Arg,  $R^{16}$  представляет собой Leu,  $R^{18}$  представляет собой Phe,  $R^{21}$  представляет собой Ile и  $R^{24}$  представляет собой гидроксигруппу.

3. Пептид сложного антигенного представления, ответственный за бактериальную адгезию, имеющий общую структурную формулу



где пептид<sup>1</sup>, пептид<sup>2</sup>, пептид<sup>3</sup>, пептид<sup>4</sup> независимо друг от друга выбираются из числа соединений формулы



где  $R^1$  представляет собой атом водорода или С<sub>1</sub>-С<sub>16</sub>-карбоновую кислоту;

$R^2$  представляет собой Ala, Gly, Ser или пропионовую кислоту;

$R^3$  представляет собой Val, Ile, Leu или D-Val;

$R^4$  представляет собой Ius или Arg;

$R^5$  представляет собой Val, Ile или Leu;

$R^6$  представляет собой Ala, Gly или Ser;

$R^7$  представляет собой Ile, Leu или Val;

$R^8$  представляет собой Asp, Asn или Glu;

$R^{10}$  представляет собой Phe, Tyr или Trp;

$R^{12}$  представляет собой Arg, Asn, Lys или His;

$R^{13}$  представляет собой Ile, Leu или Val;

$R^{15}$  представляет собой Arg, Asn, Lys или His;

$R^{16}$  представляет собой Leu, Ala, Ile или Val;

$R^{18}$  представляет собой Phe, Asn, Lys или His;

$R^{21}$  представляет собой Ile, Ala, Val или Leu;

$R^{24}$  представляет собой OH, Ala или Ser.

4. Пептид по п.3, где каждый пептид<sup>1</sup>, пептид<sup>2</sup>, пептид<sup>3</sup> и пептид<sup>4</sup> включает соединение, в котором  $R^2$  представляет собой Ala,  $R^3$  представляет собой Val,  $R^4$  представляет собой Lys,  $R^5$  представляет собой Val,  $R^6$  представляет собой Ala,

$R^7$  представляет собой Ile,  $R^8$  представляет собой Asp,  $R^9$  представляет собой Gly,  $R^{10}$  представляет собой Phe,

$R^{11}$  представляет собой Gly,

$R^{12}$  представляет собой Arg,  $R^{13}$  представляет собой Ile,  $R^{15}$  представляет собой Arg,  $R^{16}$  представляет собой Leu,

$R^{18}$  представляет собой Phe,

$R^{21}$  представляет собой Ile и  $R^{24}$  представляет собой гидроксигруппу.

5. Фармацевтическая композиция против мастита, содержащая соединение по п.1 в адьюванте.

6. Фармацевтическая композиция против мастита, содержащая соединение по п.3 в адьюванте.

7. Способ определения пептида по п.1 или 3, отличающийся тем, что получают экстракти клеточных стенок или клеточных мембран адгезирующих и неадгезирующих штаммов возбудителя мастита, сравнивают полученные экстракти и при наличии пептида, присутствующего в адгезирующих и отсутствующего в неадгезирующих штаммах, определяют пептид, ответственный за адгезию.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что используют адгезирующие и неадгезирующие штаммы *Staphylococcus aureus*.

ТАБЛИЦА 1

	Ингибирование связывания, %		
	До	После	БУСТ
<b>Контрольные коровы</b>			
1	0	8	34
2	11	20	28
3	12	17	39
<b>Среднее значение</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>34</b>
<b>Подопытные коровы</b>			
1	10	35	58
2	21	52	63
3	0	41	58
4	5	54	57
5	10	38	51
6	5	36	58
7	2	46	55
8	12	40	57
9	12	36	59
10	3	32	52
11	0	55	54
12	0	30	53
13	12	45	57
14	31	36	55
15	17	46	51
<b>Среднее значение</b>	<b>9</b>	<b>41</b>	<b>56</b>

R U 2 1 4 3 9 2 0 C 1

R U ? 1 4 3 9 2 0 C 1