

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042907**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.03.31**

**(21)** Номер заявки  
**201791906**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.09.24**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/04* (2006.01)  
*A61P 31/06* (2006.01)  
*A61K 31/711* (2006.01)  
*C12N 15/31* (2006.01)

---

**(54) ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОГО БЕЛКА И ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА**

---

**(43)** 2019.03.29

**(96)** 2017000096 (RU) 2017.09.24

**(71)(72)(73)** Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ  
ВЛАДИМИРОВИЧ; ФЕДОРОВА  
ЕКАТЕРИНА АЛЕКСЕЕВНА (RU)**

**(56)** RU-A-2015119607  
WO-A2-2014009438  
WO-A1-2010121618

**(57)** Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использовано для осуществления профилактики и лечения туберкулеза. Предложена вакцина для профилактики или лечения туберкулеза, содержащая гибридный белок, охарактеризованный в патенте на изобретение РФ №2615440, включающий белки Ag85B, Tb10.4 *M.tuberculosis*, фрагменты флагеллина FliC *S.typhimurium*, соединенные гибкими мостиками, и плазмидную ДНК, кодирующую белок Ag85A *M.tuberculosis*, и/или плазмидную ДНК, кодирующую белок Ag85B *M.tuberculosis*, в качестве активных агентов, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель и буферный раствор, потребитель вакцины - человек либо животное. Предложенная вакцина имеет эффективность, превышающую таковую БЦЖ.

**042907**

**B1**

**042907**  
**B1**

Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использовано для осуществления профилактики и лечения туберкулеза.

Туберкулез является инфекционным заболеванием, вызывающим наибольшее количество случаев с летальным исходом. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2015 г. в мире 10,4 млн. человек заболели туберкулезом, а 1,8 млн. умерли от этой болезни [WHO | Global tuberculosis report 2016 [Electronic resource]//WHO. URL: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) (accessed: 03.01.2017)]. Лечение туберкулеза осложняется тем, что широко распространены штаммы микобактерий, устойчивые к противотуберкулезным препаратам (ПТП), вызывающие туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). В связи с этим перспективным подходом в борьбе с данным заболеванием является профилактика. Согласно докладу ВОЗ по туберкулезу 2014 г., новая вакцина, которая поможет предотвратить передачу туберкулеза среди подростков и взрослых в развивающихся странах, будет самым экономически эффективным инструментом в смягчении эпидемии [07\_Evans\_GVIRF\_TB\_Vaccine\_Progress.pdf].

На сегодняшний день единственной зарегистрированной и применяемой вакциной для профилактики туберкулеза в России и за рубежом является вакцина BCG, полученная из аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis* и впервые введенная человеку в 1921 г. Ограниченная эффективность вакцинации BCG и побочные эффекты обуславливают острую потребность в разработке эффективных и безопасных средств для профилактики туберкулеза.

В настоящее время данную проблему пытаются решить разными способами: разрабатываются и исследуются альтернативные БЦЖ вакцины, такие как живые вакцины с улучшенными свойствами, инактивированные вакцины, субъединичные вакцины, вакцины, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК, комбинированные варианты. Однако вакцины, безопасной и простой при производстве и применении, которая имела бы эффективность, как минимум сравнимую с таковой БЦЖ, не существует на данный момент. В связи с этим задачей настоящего изобретения является создание обладающей вышеперечисленными свойствами вакцины против туберкулеза, которая также будет иметь низкую стоимость.

Из всех направлений разработки новых противотуберкулезных вакцин авторы настоящей группы изобретений считают наиболее перспективным использование вакцин, получаемых с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Однако их эффективность варьирует и обуславливается массой факторов, одними из самых важных из которых являются подбор компонентов и их форма (структура).

Для создания настоящего изобретения были выбраны иммунодоминантные секретируемые антигены *M.tuberculosis* - белки Ag85A и Ag85B комплекса белков 85 и белок TB10.4 (culture-filtrate protein-7). Данные белки высококонсервативны среди различных штаммов микобактерий, а также способны вызывать иммунный ответ, что позволяет полагать, что возможно получение кросс-реактивного иммунного ответа (WO 96/15241). Важно, что указанные белки не имеют гомологии с известными белками других организмов, что обеспечивает специфичность их действия. Также показано, что белок TB10.4 обладает адьювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий (EA 012037 B1).

Известны следующие наиболее близкие к предлагаемым нами решения на основе вышеперечисленных белков *M.tuberculosis*.

Известна вакцина, содержащая гибридный белок из белков Ag85A, Ag85B, TB10.4, дополнительно может применяться адьювант; либо фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий такой гибридный белок (WO 2005/061534 A2). Однако, по мнению авторов настоящего изобретения, использование ДНК, кодирующей антиген микобактерий, совместно с гибридным белком позволит индуцировать формирование иммунного ответа, более сдвинутого в сторону цитотоксического.

Известна композиция, содержащая в одном из вариантов гибридный белок из микобактериальных антигенов Tb10.4, Ag85B, ESAT6 и от одного вектора, содержащего ДНК, кодирующую от 5 антигенов микобактерий, в том числе Tb10.4, Ag85A, Ag85B (WO 2014009438 (A2)). Использование подходящего адьюванта было бы желательным.

Известна фармацевтическая композиция, содержащая в одном из вариантов гибридный белок, содержащий TB10.4 и Ag85B, и нуклеиновую кислоту, кодирующую в одном из вариантов TB10.4 (US 6991797 B2). Использование адьюванта позволит усилить иммунный ответ на антиген. При этом при включении его в состав гибридного белка оптимизируется процесс производства вакцины за счет производства меньшего количества компонентов.

Предложена вакцина или иммуногенная композиция, вводимая человеку, зараженному латентной формой туберкулеза, для предотвращения реактивации туберкулеза, в одном из вариантов содержащая белок TB10.4, слитый с антигеном, экспрессируемым микобактерией, усиленный для адьювантного действия липидированием, а также плазмиды, с которых экспрессируются гены, кодирующие белки комплекса ESX-1 (WO 2010121618 (A1)). Белок Tb10.4 относится к белкам комплекса ESX-3.

Подбор оптимального адьюванта для индукции необходимого профиля иммунного ответа является непременной задачей в отношении микобактерий. Важно подобрать адьювант, который позволит индуцировать наиболее специфичный по отношению к патогену иммунный ответ, в данном случае способный стимулировать Т-клеточный иммунный ответ, наряду с В-клеточным, а также который будет способст-

вывать формированию местного иммунитета.

В отношении выбора белков, доминирующих в составе вакцины, по мнению авторов настоящего изобретения, следует сделать выбор в сторону белков Ag85A и Ag85B. Данные белки обеспечивают высокую аффинность микобактерий к фибронектину, опосредующему прикрепление *M.tuberculosis* к альвеолярным макрофагам (Pabreja S. et al. Mucosal vaccination against tuberculosis using Ag85A-loaded immunostimulating complexes//Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol. 2014. P. 1-8). Также они помогают поддерживать клеточную стенку, катализируя перенос миколовых кислот на арабиногалактан клеточной стенки и синтез фактора жгутообразования. Они обладают мукозил-трансферазной активностью и катализируют биосинтез наиболее распространенных гликолипидов клеточной стенки, в том числе и вирулентного корд-фактора (Dover L.G. et al. Regulation of cell wall synthesis and growth//Curt. Mol. Med. 2007. Vol. 7, № 3. P. 247-276). Антигены 85 также участвует в формировании Т-клеточного ответа у лиц, инфицированных *M.tuberculosis* (Tang X., Deng W., Xie J. Novel insights into Mycobacterium antigen Ag85 biology and implications in countermeasures for M. tuberculosis//Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 2012. Vol. 22, № 3. P. 179-187, Huygen K. The Immunodominant T-Cell Epitopes of the Mycolyl-Transferases of the Antigen 85 Complex of *M. tuberculosis*//Front. Immunol. 2014. Vol. 5. P. 321).

Известна композиция, содержащая в одном из вариантов нуклеиновую кислоту приведенной структуры (в одном из вариантов для лечения туберкулеза), антиген и флагеллин, для лечения инфекционного заболевания (RU 2010135630 А). В нашем случае предложено средство также профилактического назначения - вакцина, антиген и флагеллин слиты, содержится дополнительный антиген в составе слитой конструкции, векторная структура в данной заявке не подразумевается, в отличие от предложенного нами варианта.

Флагеллин - белок бактериальных жгутиков, присутствующих у многих бактерий, в том числе патогенных. Флагеллин, в зависимости от происхождения из того или иного микроорганизма, различается и состоит из 259-1250 аминокислотных остатков, что, безусловно, влияет на его свойства. Таким образом, указание микроорганизма, флагеллин которого используется, является существенным. Более того, известные флагеллиновые адьюванты проявляют значительные побочные эффекты, и, в частности, собственную антигенную активность и системные провоспалительные свойства при введении *in vivo*.

Связывание флагеллина с TLR-5 происходит только в мономерной форме (Абатуров А. Е. Роль TOLL-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Ч.3. Рекогниция лигандов TLR/A. Е. Абатуров, А. П. Волосовец, Е. И. Юлиш//Здоровье ребенка. - Донецк, 2012, N N 7.-С.157-164), однако при получении полноразмерных флагеллинов они могут полимеризоваться, и сохранение их в растворе в мономерной форме, при этом сохраняющей правильную конформацию, требует специальных условий. При этом совместное использование такого раствора и иных агентов, например, антигена(ов), может негативно сказаться на конформации последних и, соответственно, свойствах. Получается, совместное использование полноразмерного флагеллина и антигена(ов) может не привести к желаемому результату, за счет инактивации одного из агентов при несовпадении условий сохранения активности.

Известна композиция для вакцинации, содержащая полипептид, включающий в одном из вариантов осуществления антигенные части белков Ag85B и TB10.4, также содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд CD40, либо пептид, который обладает способностью связываться с лигандом CD40 и активировать рецептор CD40, экспрессированный на антитело-продуцирующих В-лимфоцитах, которая в одном из вариантов изобретения также содержит флагеллин (WO 2010/034974 A2, дата приоритета 24.09.2008). Недостатком является то, что гибридный белок не охарактеризован структурно, лишь обозначены его компоненты. Также предлагается использовать полноразмерный флагеллин, причем не указана его принадлежность к тому или иному организму, недостатки такого подхода описаны выше. Также не указан тип флагеллина, например, для флагеллина *Salmonella* - FljC или FljB.

Различия в структуре флагеллина наблюдаются и среди одного бактериального вида. Так, большая часть сероваров *Salmonella enterica* двухфазные, т.е. у них чередуется экспрессия разных жгутиковых антигенов (фаз). Это обусловлено возможностью нахождения в активном состоянии только 1 из 2 генов флагеллина (fliC и fljB), локализующихся в разных локусах хромосомы [Baker S., Hardy J., Sanderson K.E. et al. A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella* Typhi. PLoS Pathog, 2007, 3(5): e59. doi:10.1371/journal.ppat.0030059], FljC - phase 1 flagellin (STF), fljB - phase 2 flagellin (STF2). Данные флагеллины имеют одинаковый N-конец, гомологичный, различающийся на несколько а.о., C-конец, а также различный домен D3, соответственно, имеют различную структуру и могут иметь различные эффекты.

Известна противотуберкулезная ДНК-вакцина, доставляемая с помощью хитозановой системой доставки, содержащая хитозан и плазмиды, содержащие полноразмерный ген hsp65 и фрагменты ДНК, кодирующие Т-клеточные эпитопы белков ESAT-6[189-228], Ag85A[369-405], CFP10[162-207] и Ag85B[420-459], в форме капель для носа (CN 101455846).

Известна полиэпитопная противотуберкулезная ДНК-вакцина, содержащая один тип носителя, плазмидную ДНК pсDNA3, и одну вставку-сегмент целевого гена, на 5' конце которого находится ген, кодирующий белок HSP65, на 3' конце последовательно расположены нуклеотидные последовательности, кодирующие эпитопы белков ESAT-6, с 1 по 20 нуклеотид и с 61 по 81 нуклеотид, Ag85A, с 62 по 84

нуклеотид, Ag85B, с 121 по 155 нуклеотид, снова Ag85A, с 143 по 166 нуклеотид, Ag85B, с 234 по 256 нуклеотид, MPT64C, с 177 по 228 нуклеотид, последовательности соединены нуклеотидной последовательностью, кодирующей ААУ, причем HSP65 и полиэпитопный фрагмент синтезируются отдельно, HSP65 - методом ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК микобактерий, полиэпитопный фрагмент синтезируют химически, затем фрагменты сшиваются (CN 101088559 А). Таким образом, создание конструкции усложняется введением этапов сшивки фрагментов. Также непонятно, какой материал используется для синтеза гена HSP65: при использовании лизата микобактерий возникает риск заражения.

Известно, что белок Hsp65 микобактерий туберкулезного комплекса имеет гомологию с молекулами, представленными в суставах (van Eden W. et al. The mycobacterial 65 kD heat-shock protein and autoimmune arthritis//Rheumatol. Int. 1989. Vol. 9, № 3-5. P. 187-191), и вызывает формирование адьювантного артрита (Kim E.Y. et al. Modulation of Adjuvant Arthritis by Cellular and Humoral Immunity to Hsp65//Front. Immunol. 2016. Vol. 7. P. 203). Это не позволяет использовать генно-инженерные вакцины, содержащие данный белок.

Известна плазмидная ДНК pcDNA3.1, несущая химерный ген, который содержит ген, кодирующий белок Ag85a микобактерий туберкулеза и ген, кодирующий 125-282 аминокислоты белка Ag85b микобактерий туберкулеза, причем фрагмент гена Ag85b расположен в гене Ag85a, по сайту узнавания эндонуклеазы Kpn I и/или Acc I, это фрагменты, соответствующие а.о. 245-250 или 430-435, соответственно (Li Z. et al. Mycobacterium Tuberculosis Ag85ab Chimeric Gene Vaccine, Its Preparation Method and Application: pat. WO 2011150745 (A1) USA. 2011. № CN 20101191243 20100603). Однако адекватный иммунный ответ на каждый из антигенов более вероятно получить при отсутствии встраивания одного белка в другой.

Прототипом предложенного авторами изобретения, композиции на основе гибридного белка и плазмидной ДНК, является описанное в публикации US 6991797 B2.

Технический результат от использования изобретения заключается в увеличении эффективности активного агента для вакцины, и, соответственно, вакцины против туберкулеза, за счет использования одного компонента, сочетающего в себе и функции специфического микобактериального антигена, и адьюванта, опосредующего оптимальный для подавления развития туберкулезной инфекции иммунитет, правильную конформацию которого, опосредующую полноценное функционирование всех его компонентов, легко обеспечить также благодаря отсутствию иных белковых молекул в составе композиции, требующих иных условий для сохранения активности. Данный технический результат также достигается тем, что вместо белка TB10.4 используется белок комплекса Ag85 (А или В), аргументацию см. выше.

Прототипом предложенного авторами изобретения, композиции на основе гибридного белка и плазмидных ДНК, является описанное в публикации WO 2010121618 A1.

Технический результат от использования изобретения заключается в увеличении эффективности активного агента для вакцины, и, соответственно, вакцины против туберкулеза. Он достигается за счет использования адьюванта, опосредующего оптимальный для подавления развития туберкулезной инфекции иммунитет, аргументацию см. выше. Данный технический результат также достигается тем, что вместо белков комплекса ESX-1 используются белки комплекса Ag85 (А и В), аргументацию см. выше.

Технический результат от использования обоих изобретений выражается в расширении спектра вакцин против туберкулеза. При противопоказаниях к применению аналогов, либо нежелании использовать аналоги ввиду их вышеописанных недостатков, данная вакцина позволит осуществить защиту против туберкулеза. В связи с тем, что проблема туберкулеза стоит очень остро, а выведение на рынок препарата удастся не многим, данное изобретение позволит увеличить шансы в борьбе с данной инфекцией.

Введение иммуногена, соответственно, вакцины, предпочтительно - внутримышечное. Также возможно использование для иммунизации поверхности слизистой, поскольку иммунитет, индуцированный в одной области слизистой, может индуцировать развитие иммунитета на дистальной области слизистой (McGhee, J. R. et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine 1992, 10:75-88). Формирование местного иммунитета важно для предотвращения инфицирования микобактериями. Содержание в составе гибридного белка фрагментов флагеллина также способствует данному процессу, так, известно, что в респираторном тракте флагеллин индуцирует синтез IgA и вызывает Th2-ассоциированный ответ (Soloff AC, Barratt-Boyes SM. Enemy at the gates: dendritic cells and immunity to mucosal pathogens. Cell Res. 2010 Aug;20(8):872-85. doi: 10.1038/cr.2010.94. Epub 2010 Jul 6). Иммунизация поверхности слизистой также значительно облегчает доставку иммуногена.

#### **Сущность изобретения**

Предложена вакцина для профилактики и лечения туберкулеза, содержащая гибридный белок по патенту на изобретение РФ №2615440, и плазмидную ДНК, кодирующую белок Ag85A M.tuberculosis и/или плазмидную ДНК, кодирующую белок Ag85B M.tuberculosis в качестве активных агентов, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель и буферный раствор, потребитель вакцины - человек, либо животное. Предложенная вакцина имеет эффективность, превышающую такую БЦЖ.

#### **Подробное описание изобретения**

Предложенная вакцина для профилактики и лечения туберкулеза содержит:

(1) гибридный белок, защищенный патентом на изобретение РФ №2615440, включающий белки

Ag85B, Tb10.4 *Mycobacterium tuberculosis*, иммуногенные фрагменты флагеллина FliC *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, соединенные гибкими мостиками, и

(2) плазмидную ДНК для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих, представленную остовом, содержащим прокариотические элементы, ориджин репликации и маркерный ген, и эукариотические элементы, сильный промотор, лидерную последовательность мРНК, а также регуляторные последовательности для указанных элементов, от одного сайта для клонирования гена интереса и от одного сайта для посадки от одного праймера для анализа состава плазмидной ДНК, и полинуклеотидом, представленным фрагментом, кодирующим белок Ag85A *M.tuberculosis*, в одном из вариантов также секреторной последовательностью, кодонно оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих, и терминирующей последовательностью, и/или

(3) плазмидную ДНК как описано в абзаце выше (2), в которой вместо белка Ag85A *M.tuberculosis* используется белок Ag85B *M.tuberculosis*.

Плазмидная ДНК должна содержать существенные для организмов ее поддержания и использования элементы, вкуче с соответствующими регуляторными последовательностями. Регуляторные последовательности - нуклеотидные последовательности, способные повлиять на экспрессию гена на уровне транскрипции и/или трансляции, а также на механизмы, обеспечивающие существование и поддержание функционирования плазмидной ДНК.

Существенными для прокариотической системы являются ориджин репликации, для поддержания в клетке со средней, предпочтительно высокой, копийностью, и маркерный ген для возможности селекции штамма-продуцента. Бактериальные элементы плазмидной ДНК не должны отрицательно влиять на экспрессию в клетках млекопитающих и обуславливать побочный эффект от применения плазмидной ДНК. Подходящий ориджин репликации представлен pM1 (der.), ColE1 (der.) и F1, pUC и F1, но не ограничивается ими. Подходящий маркерный ген представлен репортерным геном или геном устойчивости к антибиотику, например, ампициллином, преимущественно канамицином, но не ограничивается ими. В литературе имеются данные о том, что использование гена устойчивости к ампициллину в качестве маркерного гена может быть нежелательным в связи с развитием реакции у пациентов на ампициллин, однако авторы считают такие последствия связанными с низким качеством очистки плазмидной ДНК, но не самим элементом.

Существенными элементами плазмид для использования у млекопитающих являются промотор, лидерная последовательность мРНК, терминирующая последовательность.

Промотор является важным компонентом плазмиды, который запускает экспрессию интересующего гена. Классические промоторы для плазмидных ДНК-компонентов препаратов - это CMV человека/немедленно-ранний или CMV-chicken- $\beta$  actin (CAGG) промотор. Промоторы CMV используется для большинства ДНК-вакцин, так как они опосредуют высокие уровни конститутивной экспрессии в широком диапазоне тканей млекопитающих (Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, et al. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. Hum. Gene Ther. 1993;4(4):419-431) и не подавляют прочитывание downstream. Увеличение уровня экспрессии наблюдают при изменении CMV промотора, например, включением HTLV-1R-U5 downstream от промотора цитомегаловируса или при использовании химерного SV40-CMV промотора (Williams JA, Carries AE, Hodgson CP. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. Biotechnol. Adv. 2009;27(4):353-370). Альтернативой CMV промоторам служат тканеспецифические промоторы хозяина, которые позволяют избежать конститутивной экспрессии антигенов в неподходящих тканях (Cazeaux N, Bennisser Y, Vidal PL, Li Z, Paulin D, Bahraoui E. Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter. Vaccine. 2002;20(27-28):3322-3331).

Промотор может быть с соответствующими регуляторными последовательностями из природных промоторов со своими регуляторными элементами (CaM kinase II, CMV, nestin, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, p-globin, GFAP, GAP43, тирозингидроксилаза, субъединица 1 каинатного рецептора и субъединица В глутаматного рецептора и другие), либо синтетических промоторов с регуляторными последовательностями, для получения необходимого характера экспрессии (соотношения продолжительности и уровня экспрессии) целевого гена на уровне транскрипции.

Возможные регуляторные последовательности по отношению к промотору:

энхансер, для увеличения уровня экспрессии через улучшение взаимодействия РНК-полимеразы и ДНК, инсулятор, для модулирования функций энхансера, сайленсеры, либо их фрагменты, для снижения уровня транскрипции, например, для тканеспецифической экспрессии,

5' нетранслируемая область до промотора, включая интрон.

Плазмидная ДНК по настоящему изобретению содержит от одной из вышеприведенных регуляторных последовательностей, в зависимости от варианта плазмидной ДНК, основанного на выборе промотора и желаемых параметрах экспрессии целевого гена. Опираясь на существующий уровень техники, на известные и очевидные варианты таких элементов и их использования, плазмидная ДНК по настоящему изобретению может содержать любые отвечающие вышеуказанным условиям комбинации, при

которых с плазмидной ДНК осуществляется синтез белка Ag85A или Ag85B *M. tuberculosis* в клетках млекопитающих. При использовании сайленсера, либо инсулятора в составе конструкции возможно регулировать экспрессию целевого гена.

Иные регуляторные последовательности:

нетранслируемая область downstream от промотора, включая интрон, для повышения стабильности мРНК и увеличения экспрессии целевого гена.

Плазмидная ДНК по настоящему изобретению в одном из вариантов дополнительно содержит такой регуляторный элемент.

Плазмидная ДНК по настоящему изобретению содержит и такой важный элемент, как лидерную последовательность мРНК, содержащую последовательность Козака непосредственно перед стартовым кодоном ATG, которая позволяет увеличить экспрессию (Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* 1997;16(9):2482-2492).

Плазмидная ДНК также содержит сайт, преимущественно сайты, разные, для клонирования целевого гена, для осуществления правильной ориентации целевого гена в плазмидной ДНК, и сайт, преимущественно сайты, для посадки праймеров для его секвенирования.

Плазмидная ДНК содержит и фрагмент, кодирующий белок Ag85A или Ag85B *M. tuberculosis*, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих. Использование видоспецифичных кодонов позволяет увеличить экспрессию гена (Frelin L, Ahlen G, Alheim M, et al. Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus non-structural 3/4A gene. *Gene Ther.* 2004;11(6):522-533). Оптимизация по кодонному составу может быть осуществлена вручную, либо с использованием специализированного программного обеспечения, например, на сайте molbiol.ru, на основе аминокислотной последовательности белка. Аминокислотная последовательность белков Ag85A или Ag85B доступна на сайте tuberculist, а также в базе ncbi.

Плазмидная ДНК также содержит терминирующую последовательность, содержащую последовательно стоп-кодон, 3' нетранслируемую область с сигналом и сайтом полиаденилирования, стоп-кодон, за счет которой сохраняется стабильность мРНК, и осуществляется надлежащее прекращение транскрипции и экспорт мРНК из ядра. На экспрессию генов можно повлиять путем изменения терминирующей последовательности, которая необходима для сохранения стабильности мРНК, надлежащего прекращения транскрипции и экспорта мРНК из ядра, в том числе ее укорачиванием. Во многих современных ДНК-вакцинах используют последовательность терминатора транскрипции бычьего гормона роста (Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, et al. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* 1993;12(9):777-783). Полиаденилирование (полиА) необходимо для стабилизации транскрипта. Изменение последовательности полиА может привести к увеличению уровня экспрессии гена (Norman JA, Hobart P, Manthorpe M, Feigner P, Wheeler C. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. *Vaccine.* 1997;15(8):801-803). В плазмиде pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) область терминатора бычьего гормона роста содержит область гомопурина, которая чувствительна к нуклеазе. Показано, что альтернативная полиА последовательность может значительно улучшить стабильность плазмиды к нуклеазе (Azzoni AR, Ribeiro SC, Monteiro GA, Prazeres DMF. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J Gene Med.* 2007;9:392-402). Введение двух стоп-кодонов перед 3' нетранслируемой областью позволяет увеличить эффективность терминатора транскрипции. Опираясь на существующий уровень техники, на известные и очевидные варианты такого элемента, плазмидная ДНК по настоящему изобретению может содержать любую отвечающую вышеуказанным условиям терминирующую последовательность, при которой с плазмидной ДНК осуществляется синтез целевого белка в клетках млекопитающих.

Плазмидная ДНК также может содержать гетерологичную секреторную последовательность, кодонно оптимизированную для млекопитающих. В одном варианте изобретения содержит, например, секреторную последовательность ТРА (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein (Homo sapiens), NCBI Reference Sequence: NP\_000921.1), но ею не ограничивается. Преимущество использования секреторной последовательности ТРА - в обширном предшествующем клиническом опыте, а также в том, что показана ее высокая производительность в отношении экспрессии секретируемого белка с различных генов-мишеней.

Оптимальная конструкция плазмиды для осуществления назначения объединяет "бактериальные" и "эукариотические" элементы, с соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить высокую копияность в процессе производства и высокий уровень экспрессии у млекопитающих (Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2012 Feb;11(2): 189-209. doi: 10.1586/erv.11.188).

Для создания плазмидной ДНК по настоящему изобретению можно использовать плазмидную ДНК, как минимум, стандартно применяющуюся для доставки генов и их экспрессии в организме млекопитающего, в том числе человека (Hartikka J, Sawdey M, Cornefert-Jensen F, Margalith M, Barnhart K, Nolasco M, Vahlsing HL, Meek J, Marquet M, Hobart P, Norman J, Manthorpe M. An improved plasmid DNA

expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 1996 Jun 20;7(10):1205-17 и др.), а также плазмиду, которая может быть создана средним специалистом в данной области с использованием рекомендаций по элементам векторов ("Cloning Vectors", ed. Pouwls et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018), либо оптимизированную по вышеперечисленным параметрам, в том числе подробно описанную в статье Williams et al., 2009 (Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.* 2009;27(4):353-370).

Предпочтительными плазмидными ДНК для использования у человека являются векторы, проверенные на людях, содержащие описанные выше элементы с соответствующими регуляторными последовательностями, возможно, модифицированные для соответствия заявленным критериям, что позволяет уменьшить количество требуемых исследований для регистрации средства. Однако возможно и использование иных плазмидных ДНК, содержащих требуемые описанные элементы.

В руководстве FDA (2007) заявлено, что исследования биораспределения вещества после его введения в организм могут быть отменены для ДНК-вакцин, производимых клонированием нового гена в плазмидный вектор, в отношении которого ранее документально установлено приемлемые биораспределение и профиль интеграции. В руководстве ВОЗ (2007) заявлено, что исследования биологического распределения и сохранения требуются, если еще не имеется значительный опыт работы с почти идентичным или аналогичным продуктом. В руководстве ЕМЕА (2006) заявлено, что опыт работы с векторной системой позволит оптимизировать и сфокусироваться на доклинических исследованиях. Исследования по безопасности с использованием ДНК-векторов с различными клонированными генами продемонстрировали аналогичное биораспределение (Sheets RL, Stein J, Manetz TS, Duffy C, Nason M, Andrews C, Kong WP, Nabel GJ, Gomez PL. Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts. *Sheets RL, Stein J, Manetz TS, Duffy C, Nason M, Andrews C, Kong WP, Nabel GJ, Gomez PL. Toxicol Sci.* 2006 Jun;91(2):610-9. Epub 2006 Mar 28.) и токсикологию (Sheets RL, Stein J, Manetz TS, Andrews C, Bailer R, Rathmann J, Gomez PL. Toxicological safety evaluation of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar despite differing plasmid backbones or gene-inserts. *Toxicol Sci.* 2006 Jun;91(2):620-30. Epub 2006 Mar 28). Для плазмидной ДНК для применения у млекопитающих, кроме человека, требования менее строгие, в связи с чем возможно использование более широкого спектра плазмид.

Последовательность расположения описанных элементов в плазмидной ДНК понятна среднему специалисту в данной области.

Фармацевтически приемлемые носители и буферные растворы известны из уровня техники и включают те, которые описаны в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованного изобретения. Полученные результаты исследований проиллюстрированы примерами (1-3) и фиг. 1-3.

Пример 1. Получение вакцины.

1.1. Получение гибридного белка.

Препарат гибридного белка с чистотой 98% для создания вакцины получен как описано в патенте на изобретение РФ №2615440, в количестве, достаточном для проведения исследования.

1.2. Получение плазмидной ДНК, кодирующей белок Ag85A или Ag85B *M.tuberculosis*.

1.2.1. Аминокислотные последовательности белков Ag85a и Ag85b *Mycobacterium tuberculosis* были найдены с использованием специализированного сайта tuberculist. Была рассчитана последовательность нуклеотидов каждого гена, коллинеарная данной аминокислотной последовательности, с одновременной оптимизацией по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих и добавлением фланкирующих ген сайтов рестрикции, NheI и HindIII для клонирования в плазмиде pcDNA3.1(+), а также последовательности Козак до старт-кодона для инициации трансляции, и в одном из вариантов также сигнальной последовательности ТРА для секреции синтезируемого белка из эукариотической клетки, и стоп-кодона, в одном из вариантов также дополнительного стоп-кодона. Рассчитанная последовательность целевых генов для клонирования в плазмиде pcDNA3.1(+) с ТРА и одним стоп-кодоном охарактеризована SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO:2. Осуществляли химический синтез всех рассчитанных ДНК.

1.2.2. Осуществляли клонирование синтезированных генов в плазмиды pVAX1 (Invitrogen), pcDNA3.1(+) (Invitrogen). Также получили вектор pcDNA3.1(+), неспособный к экспрессии неомицина, за счет рестрикции данного вектора рестриктазой NsiI, в области SV40 промотора (-71 п.о.). В полученный вектор также клонировали рассчитанные нуклеотидные последовательности.

1.2.3. На реакцию лигирования брали 3 мкл раствора синтезированной ДНК, 1 мкл раствора готового вектора, 5 мкл буфера для лигирования  $\times 2$  и 1 мкл T4-лигазы. Реакцию проводили при +20°C в течение 2 ч.

После этого смесь прогревали при +95°C в течение 10 мин и очищали от солей диализом на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,025 мкм (Millipore, США). Диализ проводили против раствора, содержащего 0,5 мМ ЭДТА в 10% глицерине, в течение 10 мин.

1.2.4. Затем трансформировали клетки *E.coli* штамма DH10B/R (F-mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\phi$ 80dlacZAM15,  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139,  $\Delta$ (ara, leu)769, galU, galK $\lambda$ -, rpsL, nupG) полученными плазмидными ДНК методом электропорации с использованием электропоратора MicroPulser (BioRad). Данный штамм не содержит метилазу, что позволяет минимизировать возможность возникновения мутаций в ДНК, в том числе в клонированном в плазмиде, поддерживаемой в данном штамме, гене. К 12 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл диализованной лигазной смеси, помещали между электродами порационной ячейки и обрабатывали импульсом тока.

После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM глюкоза) и инкубировали в течение 40 мин при +37°C.

1.2.5. Проводили выявление клонов клеток *E.coli*, содержащих полученную плазмидную ДНК, на селективной среде, содержащей LB-агар, 50 мкг/мл канамицина (для плазмидных ДНК на основе pVAX1), либо ампициллина (для плазмидных ДНК на основе pCDNA3.1 (+)). Из выросших клонов выделяли плазмидную ДНК. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Wizard Mini-preps DNA Purification System (Promega, США). Очищенную рекомбинантную плазмидную ДНК проверяли с помощью секвенирования.

1.2.6. Секвенирование клонированных фрагментов проводили по методу Энджера с использованием набора Applied Biosystems BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по прилагающейся к нему инструкции. Для мечения продуктов реакции использовали меченные флуоресцентным красителем ddNTP, причем каждому ddNTP соответствовал свой краситель. Для секвенирования использовали немеченные специфические для плазмид праймеры. Проводили ПЦР-реакцию, затем реакционную смесь очищали от свободных меченых ddNTP по инструкции к набору BigDye X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США) и разделяли продукты реакции секвенирования с использованием капиллярного секвенатора Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) и реактива 3500/3500xL Genetic Analyzer Polymer "POP-6™" (Applied Biosystems, США).

Результаты разделения продуктов реакции секвенирования регистрировались путем сканирования лазером и детекции четырех флуоресцентных красителей, включенных во все типы ddNTP.

1.2.7. Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью персонального компьютера с использованием программ Chromas и BioEdit. Нуклеотидные последовательности исследованных фрагментов ДНК были выровнены относительно рассчитанных, была продемонстрирована идентичность синтезированных фрагментов рассчитанным. В результате были отобраны клоны клеток *E.coli*, содержащие полноразмерные последовательности целевых генов в составе плазмид последовательности ДНК, кодирующие белки Ag85A и Ag85B микобактерий.

1.2.8. Отдельную колонию *E.coli*, выращенную на LB-агаре в чашке Петри с добавлением канамицина (либо ампициллина), помещали в 10 мл селективной среды. Клетки растили в течение ночи при +37°C в условиях постоянного перемешивания (250 об/мин). Полученные клетки собирали центрифугированием при 4000g. Дальнейшее выделение и очистку плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen), позволяющего получить апирогенную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК анализировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле, измеряли ее концентрацию с помощью флуориметрии.

В качестве контрольного раствора использовали воду без добавления тестируемого препарата. В ячейку для измерения оптической плотности объемом 2 мл вносили 1,950 мл воды и 0,05 мл тестируемого раствора, перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны 260 нм. Определение концентрации ДНК проводили по формуле:

$$C(\text{мкг/мл})=40A_{260}K,$$

где  $A_{260}$  - оптическая плотность препарата, измеренная при длине волны 260 нм; K (мкг/мл) - для ДНК 50 мкг/мл (50 мкг/мл двухцепочечной ДНК в воде); 40 - разведение тестируемого препарата.

В итоге определили, что получили плазмидные ДНК с концентрацией (3,5-4,4) мг/мл.

Выход плазмидной ДНК составил от 3,5 до 4,8 мг из 1 л питательной среды.

О чистоте полученного препарата плазмидной ДНК судили по отношению оптической плотности препарата, измеренной при длине волны 260 нм, к оптической плотности препарата, измеренной при длине волны 280 нм ( $A_{260}/A_{280}$ ) и отношению оптической плотности препарата, измеренной при длине волны 260 нм к оптической плотности препарата, измеренной при длине волны 230 нм ( $A_{260}/A_{230}$ ). Измерения проводили в водном растворе, в качестве контрольного раствора использовали воду без добавления тестируемого препарата.

Для чистых препаратов ДНК характерно  $A_{260}/A_{280}>1,80$  и  $A_{260}/A_{230}>1,80$ . Определенные в эксперименте значения соответствовали значениям отношений  $A_{260}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{230}$  для чистых препаратов, для всех полученных препаратов плазмидной ДНК. Также проводили количественное определение примесей белка в полученных препаратах плазмидных ДНК с помощью microBCA assay (Smith, P.K., et al, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* 150, 76-85 (1985)), измеряя оптическую плот-



ность образующихся окрашенных белковых комплексов с медью и бидинхониновой кислотой при длине волны 562 нм. Чувствительность метода microBCA assay составляет 0.5-20 мкг/мл белка. Концентрация тотального белка ни в одном из исследуемых препаратов плазмидной ДНК не превышала норму (от 0,5 до 10 мкг/мг плазмидной ДНК). Определяли и содержание бактериального липополисахарида в препаратах плазмидных ДНК, с использованием гель-тромб варианта ЛАЛ-теста, с чувствительностью >0,25 EU/мл (ToxinSensor, GenScript, США). ЛАЛ-реагентом служил лизат амебоцитов подковообразного краба *Limulus polyphemus*. ЛАЛ-реактив специфически реагирует с бактериальными эндотоксинами, в результате ферментативной реакции происходит изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации эндотоксина. Результаты оценивали по наличию или отсутствию плотного тромба на дне пробирки путем переворачивания пробирки. Гель-тромб не образовался при исследовании образца, разведенного в 10 раз, для части препаратов плазмидных ДНК и в 5 раз для остальной части препаратов плазмидных ДНК, т.е. при чувствительности метода 2,5 EU/мл и 1,25 EU/мл, соответственно, что, учитывая концентрацию плазмидной ДНК в образце, говорит о допустимом показателе очистки от эндотоксинов.

### 1.3. Приготовление вакцин на основе белка и ДНК.

Гидроксид алюминия, в форме порошка, в количестве 37 мг добавлялся к 5 мл раствора с концентрацией гибридного белка, охарактеризованного в патенте на изобретение РФ №2615440, 400 мкг/мл, осуществлялось связывание с белком в течение 10 мин, после чего осуществлялось дальнейшее разведение. В качестве жидкой среды использовался физиологический раствор, либо PBS. Плазмидную/ые ДНК добавляли в полученный раствор белка в требуемом количестве.

#### Пример 2. Демонстрация профилактического эффекта вакцины.

Эксперимент выполнен на белых мышах неинбредных линий (Питомник лабораторных животных "Рапполово"). Животные, весом 19-22 г, содержались в стандартных условиях, при температуре окружающей среды  $+27\pm 2^\circ\text{C}$  с постоянной влажностью воздуха 55%, при 12-часовом световом дне, получали сухой стандартизованный корм и воду без ограничения.

Группы животных (число мышей в группе):

интактные (10) - К-;

контроль заражения (15) - К+;

вакцинация БЦЖ (15) - 1

Вакцинация гибридным белком, охарактеризованным SEQ ID NO: 1 из патента на изобретение РФ №2615440, и плазмидными ДНК pcDNA3.1(+)*ag85a* и pcDNA3.1(+)*ag85b*, содержащими секреторную последовательность ТРА (13), в/м - 2 Вакцинация гибридным белком, охарактеризованным SEQ ID NO: 1 из патента на изобретение РФ №2615440, и плазмидными ДНК pVAX1*ag85a* и pVAX1*ag85b* (17), в/м - 3, Вакцинация гибридным белком, охарактеризованным SEQ ID NO: 1 из патента на изобретение РФ №2615440, и плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)*ag85a*, лишенной гена устойчивости к неомицину (15), в/м - 4.

Вакцинация гибридным белком, охарактеризованным SEQ ID NO: 1 из патента на изобретение РФ №2615440, и плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)*ag85b*, лишенной гена устойчивости к неомицину и с введенным вторым стоп-кодоном (15), в/м - 5.

Осуществляли однократную иммунизацию БЦЖ и двукратную иммунизацию вакциной на основе гибридного белка и ДНК, с интервалом в две недели. Использовали дозу 20 мкг белка и 50 мкг ДНК (по 25 мкг каждой плазмиды при использовании двух плазмид) на мышь в группах 2,4,5 и по 10 мкг белка и 25 мкг ДНК (по 12,5 мкг каждой плазмиды) на мышь в группе 3, вводили в объеме 100 мкл внутримышечно. Для доведения требуемого объема использовали физиологический раствор в группах 2,4,5 и PBS в группе 3. Заражение осуществляли через две недели после последней вакцинации.

Заражение осуществляли через 10 дней после последней вакцинации. Для моделирования туберкулеза использован стандартный тест-штамм *M. tuberculosis Erdman*. Микобактериальная суспензия для заражения мышей приготовлена ex tempore из трехнедельного штамма, культивируемого на среде Левенштейна-Иенсена. Заражающая доза -  $10^6$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/мышь в 0,2 мл физраствора, путь введения - в латеральную хвостовую вену.

Мыши выведены из опыта через шесть недель после заражения путем декапитации в соответствии с Методическими рекомендациями МЗ СССР (1985).

Определяли показатели тяжести течения туберкулезной инфекции.

1. Коэффициенты массы легких (КМЛ) и селезенки (КМС), рассчитывали по формуле, в условных единицах:

масса органа (г)×100;

масса тела (г).

2. Индекс поражения легких (ИПЛ), устанавливали по совокупности экссудативных и продуктивных изменений в условных единицах - баллах [12].

Экссудативные изменения:

легкие воздушны - 0;

единичные безвоздушные очаги - 0,25;

легкие безвоздушны на 1/2 - 0,5;

легкие безвоздушны на 2/3 - 0,75;  
 легкие безвоздушны на всем протяжении - 1,0.  
 Продуктивные очаги:  
 единичные субмилиарные очаги - 0,5;  
 многочисленные (не более 20) - 1,0;  
 многочисленные субмилиарные (более 20) - 1,5;  
 единичные милиарные - 1,75;  
 многочисленные сливающиеся субмилиарные и единичные милиарные - 2,0;  
 многочисленные милиарные (не более 10) - 2,25;  
 многочисленные милиарные, сливающиеся - 2,75;  
 появление мелких казеозных некротических фокусов - 3,0;  
 обширный казеоз - 4,0;  
 сплошное поражение легких - 5,0.

3. Бактериологические показатели. Проводили дозированный посев гомогената ткани легких на плотную яичную среду Левенштейна-Иенсена методом серийных разведений (3 и 4 разведение). Определяли массивность роста микобактерий и рассчитывали индекс защиты органа. Массивность роста микобактерий выражали в десятичном  $\log$  (lg) от числа КОЕ на массу легких. Расчет индекса защиты органа осуществляли по разнице между lg КОЕ иммунизированных мышей и lg КОЕ мышей группы контроля заражения. При оценке результатов положительным эффектом по задержке роста микобактерий считается индекс защиты  $\geq 0,5$  lg.

Результаты части опытов приведены на фиг. 1-3. Проведенные исследования продемонстрировали эффективность вакцинации разработанными вакцинными кандидатами, причем большую, чем БЦЖ, причем как при использовании двух плазмидных ДНК, так и при использовании одного вектора, вкуче с гибридным белком, охарактеризованным в патенте на изобретение РФ №2615440. Также выявлено, что различия между группами достоверны.

Таким образом, продемонстрирована высокая эффективность разработанной рекомбинантной противотуберкулезной вакцины, которая оказалась больше, чем таковая БЦЖ, в профилактической модели, на лабораторных животных, при внутримышечном введении. Возможны и иные парентеральные, либо иные мукозальные способы введения данной вакцины. Различия между группами животных достоверны.

Аналогичные исследования с использованием иных комбинаций вариантов гибридного белка, защищенных патентом на изобретение РФ №2615440, и плазмид(ы), кодирующей(их) белок(и) Ag85a или/и Ag85b, продемонстрировали схожие результаты.

Пример 3. Демонстрация терапевтического эффекта вакцины.

Эксперимент выполнен на белых мышах неинбредных линий (Питомник лабораторных животных "Рапполово"). Животные, весом 18-22 г, содержались в стандартных условиях, при температуре окружающей среды  $+27 \pm 2^\circ\text{C}$  с постоянной влажностью воздуха 55%, при 12-часовом световом дне, получали сухой стандартизованный корм и воду без ограничения.

Для моделирования туберкулеза использован стандартный тест-штамм *M. tuberculosis* Erdman. Микобактериальная суспензия для заражения мышей приготовлена *ex tempore* из трехнедельного штамма, культивируемого на среде Левенштейна-Иенсена. Заражающая доза -  $10^6$  КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора, путь введения - в латеральную хвостовую вену.

Осуществляли введение иммуногена через 6 дней после заражения. Использовали дозу 20 мкг гибридного белка и 50 мкг ДНК (по 25 мкг каждой плазмиды при использовании двух плазмид) на мышь, вводили в объеме 100 мкл внутримышечно. Для доведения требуемого объема использовали физиологический раствор.

Мыши выведены из опыта через шесть недель после заражения путем декапитации в соответствии с Методическими рекомендациями МЗ СССР (1985).

Группы животных (n - число мышей в группе):

интактные (10) - К-;  
 контроль заражения (10) - К+;  
 изониазид 10 мг/кг (15) - 1.

Терапевтическая вакцинация (гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO: 1, из патента на изобретение РФ №2615440, и плазмидные ДНК pсDNA3.1(+)*ag85a* и pсDNA3.1(+)*ag85b* (13), в/м - 5 раз в неделю, в/м (15) - 2.

Терапевтическая вакцинация (гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO:2, из патента на изобретение РФ №2615440, и плазмидные ДНК pVAX1*ag85a* и pVAX1*ag85b*, с ТРА (15), в/м - 3.

Терапевтическая вакцинация (гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO:3, из патента на изобретение РФ №2615440, и плазмидная ДНК pсDNA3.1(+)*ag85a*, с ТРА (15), в/м - 4.

Терапевтическая вакцинация (гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO:4, из патента на изобретение РФ №2615440, и плазмидная ДНК pсDNA3.1(+)*ag85b*, лишенной гена устойчивости к неомизину и с введенным вторым стоп-кодоном (15), в/м - 5.

Этиотропное лечение начинали с 6 дня после заражения животных. Длительность лечения составила 36 дней.

У животных, получавших наряду с этиотропной терапией разработанную вакцину на основе гибридного белка, отмечено значительное уменьшение коэффициента массы легких и индекса поражения легких, а также выражено снижение высеваемости микобактерий из селезенки. Аналогичные исследования с использованием иных комбинаций вариантов гибридного белка, защищенных патентом на изобретение РФ №2615440, и плазмид(ы), кодирующей(их) белок(и) Ag85a или/и Ag85b продемонстрировали схожие результаты.

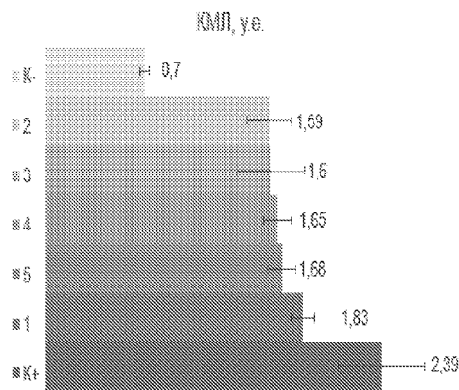
Таким образом, использование разработанной вакцины вместе с этиотропной терапией экспериментального туберкулеза значительно повышает ее эффективность.

Также продемонстрирована безопасность предлагаемой вакцины: животные соответствующих групп выжили и были выведены из эксперимента принудительно, в процессе испытаний побочные эффекты не наблюдали.

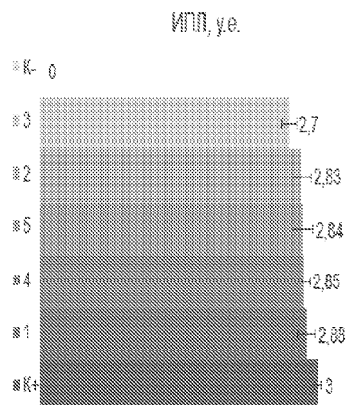
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина для профилактики или лечения туберкулеза у человека или животного, содержащая (i) гибридный белок, включающий белки Ag85B, Tb10.4 *Mycobacterium tuberculosis*, иммуногенные фрагменты флагеллина FliC *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, соединенные гибкими мостиками, и (ii) плазмидную ДНК, кодирующую белок Ag85A *M.tuberculosis*, и/или плазмидную ДНК, кодирующую белок Ag85B *M.tuberculosis*, в качестве активных агентов, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель и буферный раствор.

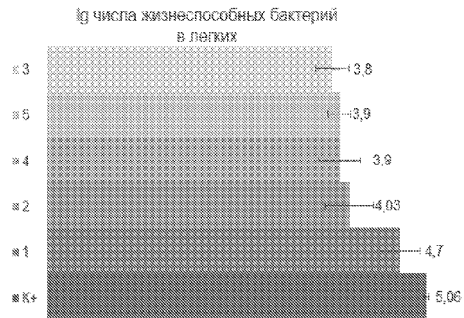
2. Вакцина по п.1, характеризующаяся тем, что плазмидная ДНК имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

