

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390676** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.08.07

(51) Int. Cl. *A61K 39/02* (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.24

(54) **ВЫСОКОДОЗНЫЙ ПРЕПАРАТ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ШИГЕЛЛ**

(31) 20201844.6

(32) 2020.10.14

(33) EP

(86) PCT/EP2021/076378

(87) WO 2022/078732 2022.04.21

(71) Заявитель:
**ЭВЕЛИКЬЮР БИОТЕКНОЛОДЖИС
ГМБХ (AT)**

(72) Изобретатель:

**Наги Эштер, Хеникс Тамас, Жирарди
Петра, Нойхаузер Ирен, Харугиунян
Шушан (AT), Наги Габор (HU),
Шиярто Валерия (AT)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Препарат вакцины против шигелл, содержащий 10^8 - 10^{12} КОЕ живого генетически ослабленного штамма *Shigella flexneri*, который содержит хромосомную делецию *setBA* и является неинвазивным, что определено с помощью теста Серени и анализа инвазии *in vitro* с использованием клеток HeLa, причем штамм содержит эндогенную плазмиду инвазии, в которую методами генной инженерии включена гетерологичная экспрессионная конструкция, экспрессирующая патоген-специфичный антиген.

A1

202390676

202390676

A1

ВЫСОКОДОЗНЫЙ ПРЕПАРАТ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ШИГЕЛЛ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к новой ослабленной вакцине против шигелл в составе высокодозного препарата, которая не является реактогенной благодаря специфическим хромосомным мутациям и мутациям в плазмиде инвазии.

10 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Диарейные заболевания представляют собой серьезное медицинское бремя во всем мире. Шигеллы и энтеротоксигенная *Escherichia coli* (EТЕС) остаются двумя основными бактериальными причинами диарейных проявлений у
15 детей в возрасте до 5 лет в эндемичных регионах, путешественников из стран с высоким уровнем дохода в страны с низким и средним уровнем дохода, а также военнослужащих, направленных в эндемичные регионы. Актуальные отчеты показывают, что 950 миллионов ежегодных эпизодов диареи во всем мире приводят к 1,3 миллиона смертей, из которых 500 000 затрагивают детей в
20 возрасте до 5 лет. Одни только шигеллы служат причиной 125 миллионов эпизодов в год, а 165 000 случаев, которые происходят с детьми в возрасте до 5 лет, приводят к 55 000 смертей. Согласно расчетам, EТЕС увеличивает этот показатель еще на 20 000 погибших.

Инфекции, вызванные представителями рода *Shigella*, приводят к
25 умеренному или тяжелому кишечному синдрому, называемому бациллярной дизентерией, или шигеллезом. Естественный иммунитет специфичен к серотипу, и защита обычно развивается против встреченного серотипа, а не против других примерно 50 серотипов четырех видов шигелл. Естественный ответ преимущественно направлен против иммунодоминантного О-антигенного
30 фрагмента структуры бактериального липополисахарида (ЛПС). Тем не менее, идеальная вакцина против шигелл должна вызывать защиту от всех распространенных серотипов. Другим важным условием при разработке вакцины против шигелл является необходимость соблюдения оптимального баланса

между иммуногенностью и безопасностью (Levine, Nat Rev Microbiol 2007, 5: 540–553).

ЕТЕС представляет собой патоген, поражающий слизистую оболочку кишечника, который имеет перекрывающуюся эндемичность с шигеллами, и
5 передача инфекции происходит фекально-оральным путем, так же как при шигеллезе, в районах с низким уровнем развития санитарной инфраструктуры. Этот патоген проявляет свою патогенность через два основных эндотоксина: термостабильный (ST) и термолабильный (LT) токсины. ST представляет собой пептид из 19 аминокислот с высокой токсичностью и низкой иммуногенностью. LT
10 представляет собой сложную макромолекулу, состоящую из одной субъединицы LT-A и 5 субъединиц LT-B. Холотоксин LT тесно связан как структурно, так и функционально с холерным токсином (CT). Штаммы ЕТЕС могут экспрессировать либо LT, либо ST, но часто сразу оба. Таким образом, жизнеспособная вакцина должна делать мишенью как LT, так и ST. Несмотря на многочисленные попытки,
15 было трудно получить нейтрализующие антитела с высоким титром к токсинам ЕТЕС. Пероральный путь иммунизации был бы пригоден для доставки достаточно детоксицированных, но в идеале иммуногенных антигенов, — задача, которую все еще не удалось успешно решить (Buergeois, et al. 2016, Vaccine, 34: 2887-2894; Tribble, 2017; J Travel Med, 1: S6-S12). Более того, так же как и в случае шигелл,
20 сообщается о растущей устойчивости ЕТЕС к антибиотикам.

Kotloff с соавт. (INFECTION AND IMMUNITY 2000, 68(3):1034–1039) описывают живую ослабленную кандидатную вакцину против *Shigella flexneri* 2a со специфическими мутациями в виде делеций в *virG*, *sen*, *set* и *guaBA*. CVD 1207 экспрессирует тип-специфичный О-полисахарид и инвазирует эпителиальные
25 клетки. Было обнаружено, что он хорошо переносится при инокуляции до 10^8 КОЕ. Однако при дозе 10^9 КОЕ наблюдались легкая диарея и один эпизод рвоты. При дозе 10^{10} КОЕ у субъекта наблюдались водянистая диарея и рвота.

Kotloff с соавт. (The Journal of Infectious Diseases 2004; 190:1745–54) описывают вакцинные штаммы (1) Δ *guaBA* *Shigella flexneri* 2a, который содержит
30 делеции в генах пути синтеза гуаниновых нуклеотидов (CVD 1204); и (2) с дополнительным ослаблением, вызванным делециями в генах *set* и *sen*, кодирующих энтеротоксины шигелл (ShET) 1 и 2 соответственно (CVD 1208); и относительную иммуногенность этих конструкций. Было обнаружено, что Δ *set* и Δ *sen* не влияют на инвазивность в отношении клеток HeLa. Было

продемонстрировано, что CVD 1204 и CVD 1208, которые экспрессируют кодируемые плазмидой антигены-инвазины (IPA) в их нативной форме, стимулируют антительные ответы на высокоочищенные рекомбинантные IPAB, -C и -D, и что ответ на IPAB был иммунодоминантным. Однократная пероральная
5 доза CVD 1204 и CVD 1208 (10^7 , 10^8 или 10^9 КОЕ) приводила к нескольким легким и умеренным побочным эффектам.

Kotloff с соавт. (Human Vaccines 2007, 3(6):268-275) описывают, что *Shigella flexneri 2a* с делециями в *guaBA*, *sen* и *set* (штамм CVD 1208) была хорошо переносимой и иммуногенной после однократной пероральной дозы 10^8 или
10 10^9 КОЕ, хотя у 14 % субъектов, которые принимали внутрь либо 10^8 , либо 10^9 КОЕ, наблюдались легкая диарея или несколько часов лихорадки низкой степени тяжести.

Noriega с соавт. (Infection and Immunity 67(2): 782-788, 1999) описали стратегию перекрестной иммунной защиты против 14 серотипов *Shigella flexneri*,
15 включающую применение двух серотипов — 2a и 3a. Описанные ослабленные штаммы представляют собой штамм CVD 1207 *S. flexneri 2a* (\otimes *guaB-A* \otimes *set1* \otimes *sen*) и штамм CVD 1211 *S. flexneri 3a* (\otimes *guaB-A* \otimes *virG* \otimes *sen*).

Fiorentino с соавт. (PLoS ONE 2014, 9(1): e85211) описывают, что инфекция шигеллы дикого типа вызывает серьезное изменение барьерной функции
20 монослоя клеток тонкого кишечника (служащего моделью слизистой оболочки) и может способствовать (наряду с энтеротоксинами) индукции водянистой диареи. Кандидатные вакцины, которые лишены основных энтеротоксинов (*ShET1/2* и *stx*), демонстрируют, что повышенная парацеллюлярная проницаемость, наблюдаемая в монослоях клеток *Caco2* после воздействия самой высокой
25 концентрации бактериального инокулята, может быть связана со специфичным ответом хозяина на инфекцию, а не с бактериальными токсинами. Тот факт, что ослабленные штаммы шигелл индуцируют выраженную иммунную реакцию, показывает, что иммунный ответ хозяина не зависит не только от нарушения функции эпителиального барьера, но и от основной эффекторной
30 энтеротоксической активности бактерий (*ShET1/2* и *stx*).

В WO2014037440A2 описан живой ослабленный вакцинный штамм шигеллы, полученный со специфичными целевыми мутациями с целью индукции независимого от серотипа перекрестного иммунитета и экспрессии гетерологичных (не шигеллезных) антигенов. Типовой штамм *Shigella flexneri 2a*

2457T содержит мутацию *ΔrfbF*, благодаря чему приобретает шероховатый фенотип, и мутацию *ΔipaBC*, которая делает штамм неинвазивным.

5 Ranallo с соавт. (Vaccine 2012, 30: 5159-5171) описывают штаммы *Shigella flexneri* 2a WRSf2G12 и WRSf2G15 — две живые ослабленные кандидатные вакцины, которые, как было доказано, являются инвазивными при анализе инвазии эпителиальных клеток с применением клеток HeLa. Оба штамма не имеют *virG* и, по результатам анализа инвазии эпителиальных клеток, являются инвазивными, но не распространяются через межклеточное пространство, что определяется с помощью теста Серени.

10 Medeiros с соавт. (npj Vaccines 2020, Article number 30) описывают двухвалентную (комбинированную) вакцину, обеспечивающую иммуногенность и защиту от инфекций *S. flexneri* и энтеротоксигенной *E. coli* у мышей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Настоящее изобретение направлено на создание вакцин против шигелл (в частности, для предотвращения диарейных заболеваний), которые являются высокоиммуногенными и имеют улучшенный профиль безопасности.

20 Решению данной задачи служит объект настоящей формулы изобретения, как дополнительно описано в этом документе.

25 Изобретение относится к препарату вакцины против шигелл, содержащему 10^8 – 10^{12} КОЕ живого генетически ослабленного штамма *Shigella flexneri*, который содержит хромосомную делецию *setBA* и является неинвазивным, что определено тестом Серени и анализом инвазии *in vitro* с использованием клеток HeLa или эпителиальной клетки человека, например, в тесте инвазии эпителиальных клеток человека с использованием, например, клеток HeLa. В частности, штамм содержит эндогенную плазмиду инвазии, в которую методами генной инженерии включена гетерологичная экспрессионная конструкция, экспрессирующая патоген-специфичный антиген.

30 В частности, препарат содержит дозу, которая составляет по меньшей мере 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} или 10^{12} КОЕ, предпочтительно до максимальной переносимой дозы, такой как, например, любая из 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} или 1×10^{12} .

В частности, препарат вакцины против шигелл содержит количество КОЕ в предварительно заданном объеме, таком как по меньшей мере одно из 100 мкл, 1 мл, 5 мл, 10 мл, 15 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл или 50 мл. Можно применять любой объем, который удобен для введения препарата вакцины конкретным путем (например, перорально, интраназально или через слизистую оболочку).

В соответствии с конкретным аспектом штамм *Shigella flexneri* представляет собой штамм *Shigella flexneri 2a* или штамм *Shigella flexneri 2b*. В частности, штамм представляет собой штамм *Shigella flexneri 2a 2457T*.

В частности, штамм содержит делецию определенного (-ых) гена (-ов), который (-ые) является (-ются) эндогенным (-и) для штамма *Shigella flexneri* дикого типа, в частности, мутацию Δset или $\Delta setBA$.

В частности, штамм содержит эндогенную плазмиду инвазии, которая несет эндогенный ген *sen*.

В соответствии с конкретным аспектом штамм *Shigella flexneri* содержит эндогенную плазмиду инвазии, которая содержит (или которая кодирует) систему секреции типа III (ТЗСС), инактивированную посредством генетической модификации плазмиды инвазии, предпочтительно при этом генетическая модификация включает в себя делецию или инактивацию одного или более генов, экспрессирующих компоненты ТЗСС.

В частности, генетическая модификация плазмиды инвазии включает делецию или инактивацию любого из генов в локусе инвазии.

В частности, указанная делеция или инактивация относится к одному или более генам в локусе инвазии, в частности, в пределах оперона *ipa* (например, выбранным из группы, состоящей из *IpaB*, *IpaC*, *IpaA* и *IpaD*), или в пределах оперона *mxi/spa*, либо к одному или более генам, которые являются регуляторами ТЗСС (например, выбранным из группы, состоящей из *VirB* и *VirF*).

Специфичные генные продукты (или гены), упомянутые в этом документе, являются следующими:

Оперон *ipa*:

IpaJ (*ipaJ*), *VirB* (*virB*), *Acp* (*acp*), *IpaA* (*ipaA*), *IpaD* (*ipaD*), *IpaC* (*ipaC*), *IpaB* (*ipaB*), *IpgC* (*ipgC*), *IpgB1* (*ipgB1*), *IpgA* (*ipgA*), *IcsB* (*icsB*),

Оперон *mxi/spa*:

IpgD (*ipgD*), IpgE (*ipgE*), IpgF (*ipgF*), MxiG (*mxiG*), MxiH (*mxiH*), MxiI (*mxiI*), MxiJ (*mxiJ*), MxiK (*mxiK*), MxiN (*mxiN*), MxiL (*mxiL*), MxiM (*mxiM*), MxiE (*mxiE*), MxiD (*mxiD*), MxiC (*mxiC*), MxiA (*mxiA*), Spa15 (*spa15*), Spa47 (*spa47*), Spa13 (*spa13*), Spa32 (*spa32*), Spa33 (*spa33*), Spa24 (*spa24*), Spa9 (*spa9*), Spa29 (*spa29*), Spa40 (*spa40*),
5 ORF131a (*ORF131a*) и ORF131b (*ORF131b*).

В частности, штамм является неинвазивным благодаря мутации плазмиды инвазии, внесенной для удаления одного или более генов, экспрессирующих компоненты T3SS, таких как гены, переносимые в оперонах *ipa* или *mxi/spa*, или регуляторы T3SS.

10 В соответствии с конкретным примером реализации штамм содержит делецию генов *ipaB* и/или *ipaC* и/или других генов *ipa*.

В частности, неинвазивный фенотип характеризуется отсутствием инвазии в эпителиальные клетки и, следовательно, не поглощается эпителиальными клетками. Кроме того, бактерии вакцинного штамма неспособны распространяться
15 внутри или между инфицированными клетками, т.е. неспособны распространяться межклеточно и внутриклеточно. Таким образом, штамм является истинно неинвазивным.

В частности, неинвазивный фенотип определяют с помощью теста на инвазию эпителиальных клеток *in vitro* с использованием клеток HeLa, как
20 дополнительно описано в этом документе.

В частности, неинвазивный фенотип определяют стандартным тестом Серени для определения бактериальной инвазивности *in vivo*, измеряемой у морских свинок. Пример теста дополнительно описан в настоящем документе.

Согласно конкретному аспекту штамм *Shigella flexneri* содержит мутацию в
25 эндогенной плазмиде инвазии, внесенную для включения гетерологичной экспрессионной конструкции, в частности, генетической конструкции, экспрессирующей один или более патоген-специфичных антигенов, в частности, при этом патоген-специфичный (-ие) антиген (-ы) является (-ются) гетерологичным (-и) для клетки-хозяина.

30 В частности, гетерологичная экспрессионная конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, происходящий от патогена.

В частности, антиген выбран из группы, состоящей из бактериального антигена, вирусного антигена, грибкового антигена и паразитарного антигена.

В частности, антиген представляет собой протективный антиген, происходящий из патогена, например, выбранный из группы, состоящей из:

- а) бактериального антигена, предпочтительно токсина или фактора колонизации,
- 5 б) вирусного антигена, предпочтительно от патогена, вызывающего энтеральные или мукозальные инфекции,
- с) грибкового антигена, предпочтительно от патогена, вызывающего энтеральные или мукозальные инфекции, и
- 10 д) паразитарного антигена, предпочтительно от патогена, вызывающего энтеральные инфекции.

В частности, бактериальный антиген происходит от энтеропатогенных бактерий и предпочтительно выбран из группы, состоящей из:

- а. антигенов из *E. coli*, в частности энтеротоксина, выбранного из группы, состоящей из LTB, мутированных LTA и ST из ETEC, их фрагментов, субъединиц или гибридных белков, антигенов из энтероагрегирующих *E. coli* (EAEC) или шига-подобного токсина 1 или 2,
- 15 б. антигенов *Campylobacter jejuni*,
- с. антигенов *Clostridium difficile*, в частности токсинов А и В,
- 20 д. антигенов *Vibrio cholera*, в частности антигена СТА или СТВ, и
- е. мутантных или гибридных белков из белков пунктов а), б), с) или д).

В соответствии с конкретным аспектом антиген состоит из гибрида субъединицы В термолabileного токсина (LTB) и мутированного термостабильного токсина (STm) энтеротоксигенной *Escherichia coli* (ETEC).

- 25 В частности, STm содержит SEQ ID NO: 1 или состоит из SEQ ID NO: 1, предпочтительно исключая последовательность термостабильного токсина ST дикого типа (SEQ ID NO: 2).

- 30 В частности, указанный антиген ETEC представляет собой гибридный белок субъединицы В из LT и мутантного ST (с линкером или без линкера между LTB и ST), предпочтительно гибридный белок LTB-STm, содержащий последовательность LTB или состоящий из последовательности LTB (такой как SEQ ID NO: 3) и содержащий последовательность STm или состоящий из последовательности STm, такой как любая из SEQ ID NO: 1, 4, 5, 6, 7, 8 или 9,

например, которая содержит мутации в ST в положении 13 и/или 12, такие как N12S, N12R или N12K в положении 12; и/или P13F или P13G в положении 13.

В соответствии с конкретным вариантом реализации ST_m содержит или состоит из:

5 SEQ ID NO: 1,
NSSNYCCELCCXXACTGCT,

где

X в положении 12 представляет собой S, N, K или R и/или

X в положении 13 представляет собой P, G, L или F.

10 Предпочтительно при этом последовательность ST_m не является последовательностью ST дикого типа, состоящей из:

NSSNYCCELCCNPACTGCT (SEQ ID NO: 2).

В соответствии с конкретным аспектом:

15 а) LTB содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90 %, 95 %, 98 % или 100 % идентичной SEQ ID NO: 3; и

б) ST_m содержит или состоит из любой из SEQ ID NO: 1, 4, 5, 6, 7, 8 или 9.

20 В соответствии с конкретным примером, LTB-ST_m содержит или состоит из SEQ ID NO: 10, 11 или 12, необязательно при этом последовательность LTB-ST_m содержит линкер между LTB и последовательностью ST_m.

Согласно конкретному примеру, последовательность LTB-ST_m, которая содержит линкер между LTB и последовательностью ST_m, содержит или состоит из SEQ ID NO: 12.

25 Линкер может представлять собой пептид, состоящий из последовательности по меньшей мере из 3, 4, 5 или 6, вплоть до, например, 30, 25, 20, 15 или 10 аминокислот, предпочтительно состоящей из глицина и/или пролина и/или серина.

30 Примеры LTB-ST_m содержат LTB и ST_m, такие как в SEQ ID NO: 11, с линкером или без линкера, такого как линкер, содержащий или состоящий из, например, GP GP (SEQ ID NO: 20).

В соответствии с конкретным аспектом нуклеотидная последовательность, кодирующая LTB-ST_m, по меньшей мере на 90 %, 95 %, 98 % или 100 % идентична SEQ ID NO: 13 или 14.

В частности, вирусный антиген происходит из диарейных вирусов, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из ротавирусов и вируса Норуолк (калицивирусов).

5 В частности, паразитарный антиген происходит от простейших, вызывающих диарею, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из *Giardia lamblia*, видов рода *Cryptosporidium* и *Entameba histolytica*.

В частности, грибковый антиген происходит от вызывающих диарею грибов, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из *Blastomyces dermatiditis* и видов рода *Histoplasma*.

10 Согласно конкретному аспекту гетерологичная экспрессионная конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере два или по меньшей мере три из указанных антигенов, например, в форме тандемной последовательности (понимаемой как гибридная последовательность), причем одна кодирующая последовательность слита с другой кодирующей
15 последовательностью.

В частности, тандемная последовательность содержит промотор перед (ближе к 5'-концу) каждой из кодирующих антиген последовательностей. В частности, кодирующие последовательности заканчиваются стоп-кодоном. После (ближе к 3'-концу) каждой из кодирующих антиген последовательностей могут
20 применяться специфичные последовательности терминатора.

Примеры тандемных конструкций содержат одну или более копий промотора, содержащего предшествующую область оперона *ltBA* из ETEC, такого как промотор, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 15.

25 В частности, идентичный или другой промотор может быть применен перед каждой кодирующей антиген последовательностью для контроля экспрессии антигенов.

В частности, могут быть применены идентичные или разные последовательности терминаторов. Конкретные примеры последовательностей терминатора содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 16, 17 или 18 или
30 любых других подходящих последовательностей, содержащих последовательность терминации трансляции.

Согласно конкретному примеру, тандемная нуклеотидная последовательность содержит две копии или три копии кодирующей антиген последовательности для экспрессии двух и трех копий антигена, такие как

тандемные повторы последовательностей нуклеиновой кислоты, например, где с таких тандемных повторов экспрессируются по меньшей мере две или три копии антигена.

5 Конкретные примеры тандемных нуклеотидных последовательностей содержат дублет или триплет кодирующих последовательностей LTB-ST_m, таких как содержащие по меньшей мере две последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере два антигена, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 10, с линкером или без линкера между LTB и последовательностью ST, например, содержащие по меньшей мере одну, две или три
10 последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, например, по меньшей мере одну, две или три последовательности нуклеиновых кислот, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 13 (кодирующей SEQ ID NO: 12) или SEQ ID NO: 14 (кодирующей SEQ ID NO: 12).

15 Согласно конкретному аспекту штамм *Shigella flexneri* содержит эндогенную плазмиду инвазии, которая содержит генетическую модификацию, внесенную для включения существенного для шигелл гена, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из *infA*, *ppa*, *accD*, *acpS*, *dapE*, *era*, *frr*, *ftsI*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsZ*, *lgt*, *lpxC*, *msbA*, *murA*, *murl*, *nadE*, *parC*, *proS*, *pyrB*, *rpsB*, *trmA*, *rho* и *rhoL*.

20 В частности, существенный ген шигелл вставляют в экспрессионную конструкцию, интегрированную в плазмиду инвазии. Такая экспрессионная конструкция содержит промотор, функционально соединенный с существенным геном шигелл.

25 В частности, существенный ген шигелл, включенный в плазмиду инвазии, является гетерологичным по отношению к плазмиде инвазии. Тем не менее, это может быть эндогенный ген шигелл, такой как ген шигелл природного происхождения, но гетерологичный по отношению к плазмиде инвазии, или хромосомный ген.

30 В частности, исходный аллель хромосомного существенного гена шигелл удаляют в вакцинном штамме шигелл.

В соответствии с конкретным аспектом существенный ген шигелл вставляют в единый блок с гетерологичной экспрессионной конструкцией, экспрессирующей патоген-специфичный антиген.

Согласно конкретному аспекту штамм *Shigella flexneri* имеет шероховатый фенотип благодаря хромосомной делеции одного или более эндогенных генов, уменьшающей количество О-антигенов ЛПС по сравнению с таким же штаммом без хромосомной делеции.

5 В частности, эндогенные гены выбраны из группы, состоящей из генов кластера генов *rfb/wbb*, генов кластера генов *rfa/waa*, *wzx*, *wzy/rfc* и *rfaH*.

В частности, вакцина ослаблена путем мутагенеза одного или более генов, участвующих в синтезе, транспорте и экспрессии ЛПС.

10 Согласно конкретному варианту реализации указанная делеция является делецией одного или более генов *rfb* F, D, C, E, J и/или I или делецией их части либо соответствующих генов в различных серотипах шигелл.

В частности, делеция одного или более эндогенных генов приводит к уменьшению экспрессии соответствующего О-антигена ЛПС, например, по меньшей мере на 90 %.

15 Согласно конкретному аспекту предложен штамм шигеллы, который представляет собой штамм *S. flexneri* 2a, такой как *S. flexneri* 2a 2457T, с делецией *rfbF* и делецией одного или обоих генов *ipaB* и *ipaC* или делецией их существенных частей. В частности, такой штамм шигеллы может дополнительно содержать делецию существенного хромосомного гена и вставку указанного гена
20 в плазмиду инвазии. В частности, указанный штамм шигеллы содержит рекомбинантную плазмиду инвазии, содержащую по меньшей мере одну гетерологичную экспрессионную конструкцию, экспрессирующую ген, кодирующий гетерологичный антиген.

25 Согласно конкретному аспекту изобретение направлено на конструирование живого, ослабленного, неинвазивного вакцинного штамма шигелл, который не экспрессирует компонент О-антигена ЛПС и обеспечивает независимую от серотипа защиту против шигелл. Согласно конкретному примеру реализации, гетерологичный гибридный белок LT-ST экспрессируется вакцинным штаммом для того, чтобы обеспечить представительство ЕТЕС для более
30 широкого охвата диарейных патогенов.

Согласно конкретному примеру реализации, штамм *Shigella flexneri* характеризуется генотипом *Shigella flexneri* 2457T Δ *rfbF* Δ *ipaBC* Δ *infA* Δ *setBA::infA-3x*[LTB-ST(N12S)].

В настоящем изобретении также предложен фармацевтический препарат, содержащий препарат вакцины против шигелл, описанный в настоящем документе, обеспечивающий конкретную дозу, в частности, для однократного применения.

5 В частности, доза представляет собой эффективную дозу для запуска иммунного ответа, например, при одном или более (например, повторно) введениях.

В частности, препарат представлен в составе, который подходит для введения субъекту, нуждающемуся в такой вакцине, посредством однократного (или одного) введения. В частности, вакцину можно вводить субъекту в эффективном количестве, применяя стратегию прайм-буст.

Препарат может содержать фармацевтически приемлемый носитель, например, в иммуногенном составе, и необязательно может содержать или может не содержать адъювант.

15 В настоящем изобретении также предложен набор компонентов для получения фармацевтического препарата или вакцины, описанной в настоящем документе, например, фармацевтический набор, содержащий один или более контейнеров, наполненных одним или более компонентами набора, такими как штамм шигеллы и фармацевтически приемлемые носители. Набор можно
20 применять для получения вакцины *in vitro* перед введением субъекту. В конкретном варианте реализации набор дополнительно содержит инструкции по применению компонентов набора.

В соответствии с конкретным аспектом штамм *Shigella flexneri* предлагается в фармацевтическом препарате, содержащем оральный (включая пероральный)
25 или мукозальный состав, предпочтительно в форме жидкости, порошка или таблетки.

В частности, лечение включает введение вакцины, описанной в настоящем документе, в соответствующем составе. В частности, вакцину вводят субъекту путем перорального, сублингвального, интраназального или внутривентрикулярного
30 введения.

Согласно конкретному аспекту изобретение дополнительно обеспечивает медицинское применение препарата вакцины против шигелл, описанного в настоящем документе. В частности, медицинское применение включает иммунотерапию, в частности иммунопрофилактику, такую как активная

иммунотерапия. Специфические виды иммунотерапии обеспечивают лечение субъекта, затронутого или имеющего риск заражения или страдающего заболеванием или рецидивом заболевания, с помощью способа, включающего индуцирование, усиление, подавление или иное изменение иммунного ответа.

5 Изобретение также относится к применению вакцины и соответствующего препарата в лечении субъекта для индукции иммунного ответа против инфекции, вызванной шигеллами, или иммунного ответа против гетерологичного антигена, экспрессируемого штаммом *Shigella flexneri*.

10 Следовательно, изобретение определено относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в профилактическом лечении, путем введения эффективного количества вакцины, например, для предотвращения инфекции шигелл или вспышки болезни, вызванной шигеллами, и необязательно инфекции целевого патогена (или соответствующего патоген-специфичного заболевания), для которого специфичен гетерологичный антиген, экспрессируемый указанным
15 штаммом шигеллы.

В частности, штамм *Shigella flexneri* экспрессирует антиген ЕТЕС в качестве гетерологичного антигена, и иммунопрофилактика направлена против инфекционного заболевания, которое вызвано ЕТЕС, выступающей в качестве
20 целевого патогена.

Согласно изобретению дополнительно предложен способ предотвращения инфекционного заболевания у субъекта путем вакцинации и иммунизации субъекта, нуждающегося в этом.

В частности, указанное инфекционное заболевание представляет собой заболевание или патологическое состояние, вызванное целевой шигеллой или
25 целевым патогеном, в частности, целевым патогеном, который является гетерологичным по отношению к шигеллам. Согласно конкретному аспекту предложена вакцина для применения для профилактики или иммунопрофилактики у субъекта для предотвращения инфекционных заболеваний, в частности энтерального заболевания, такого как диарейное заболевание. В частности,
30 заболевание выбрано из группы, состоящей из шигеллеза, дизентерии и диареи.

Согласно изобретению дополнительно предложен способ предотвращения инфекционного заболевания у субъекта, в частности энтерального заболевания, в частности путем введения эффективного количества препарата вакцины, описанного в настоящем документе.

В частности, указанное энтеральное заболевание вызвано любым серотипом или видом шигелл.

5 Конкретный вариант реализации изобретения относится к вакцине, в которой вакцина представляет собой поливалентную вакцину с применением штамма, экспрессирующего один или более из гетерологичных антигенов и антигенов шигелл.

10 В частности, иммунный ответ является защитным против одной или более из *S. flexneri* (любого или всех серотипов *S. flexneri*), *S. sonnei*, *S. dysenteriae* (любого или всех серотипов *S. dysenteriae*) и *S. boydii* (любого или всех серотипов *S. boydii*).

В частности, иммунный ответ представляет собой перекрестную защиту, нацеленную на одну или более из *S. flexneri* (любого или всех серотипов *S. flexneri*), *S. sonnei*, *S. dysenteriae* (любого или всех серотипов *S. dysenteriae*) и *S. boydii* (любого или всех серотипов *S. boydii*).

15 В частности, вакцина вызывает независимую от серотипа защиту против шигелл в модели индуцированного летального поражения легких у мышей.

20 Согласно конкретному аспекту штамм *Shigella flexneri* содержит мутацию на эндогенной плазмиде инвазии для включения гетерологичной экспрессионной конструкции, экспрессирующей патоген-специфичный антиген, для применения в лечении субъекта для индукции иммунного ответа против патогена, для которого специфичен антиген.

Согласно конкретному аспекту лечение индуцирует сывороточный, мукозальный и/или фекальный иммунный ответ, предпочтительно индуцируя специфичные антитела IgA, IgG и/или IgM.

25 Согласно конкретному аспекту препарат вакцины является переносимым и нереактогенным у субъекта, что, например, определяют по отсутствию тошноты или рвоты, диареи, боли в животе, потери аппетита, головной боли, утомляемости или миалгии.

30 Согласно другому аспекту изобретения предложен способ получения препарата вакцины, описанного в настоящем документе.

В частности, указанный способ включает следующие этапы:

a) получение родительского штамма *Shigella flexneri*;

b) ослабление штамма посредством

- i. хромосомной делеции эндогенного *set* и превращение штамма в неинвазивный;
- 5 ii. необязательно генно-инженерное изменение штамма для уменьшения экспрессии О-антигенов ЛПС, предпочтительно с получением шероховатого ЛСП-фенотипа; и
- 10 iii. необязательно генно-инженерное изменение штамма для включения гетерологичной экспрессионной конструкции в эндогенную плазмиду инвазии, при этом гетерологичная экспрессионная конструкция экспрессирует патоген-специфичный антиген; и
- iv. необязательно генно-инженерное изменение штамма для включения существенного гена шигеллы в эндогенную плазмиду инвазии, предпочтительно при этом существенный ген шигеллы был

15 c) культивирование штамма и получение состава вакцины, содержащего предварительно определенное количество КОЕ.

В частности, препарат вакцины предложен в лиофилизированной или замороженной форме.

20 Конкретные составы содержат буфер, такой как буфер PBS, необязательно содержащий ПЭГ, такой как 10 % ПЭГ-6000. Согласно конкретному примеру препарат вакцины получают в виде замороженного концентрата живых бактерий, предназначенного для пероральной доставки после размораживания и необязательно разбавления.

ФИГУРЫ

25

Фиг. 1. Последовательности, упомянутые в настоящей заявке

30 SEQ ID NO: 19: Схематическое изображение генетической конструкции, применяемой в примерах, которая переносится большой плазмидой инвазии ShigE_{TEC}. LTB (кодирующая последовательность выделена жирным шрифтом) слита с ST(N12S) (кодирующая последовательность подчеркнута) через линкер GPGP (SEQ ID NO: 20) (кодируемая нуклеотидной последовательностью, которая размещена между кодирующими последовательностями LTB и ST(N12S)). ST детоксифицирован мутацией N12S. Экспрессия управляется промотором LTA (подчеркнут двойной линией) и останавливается последовательностью

терминации LTB. Гибридный ген экспрессируется как 3-кратный тандемный повтор. Конструкция также экспрессирует *infA* (выделен курсивом) в виде отдельного гена с собственными последовательностями промотора и терминатора.

5 Последовательность, показанная на Фиг. 1: ENGPGNSSNYCCELCCSPACTGCGY (SEQ ID NO: 21)

Фиг. 2. Клетки HeLa были инфицированы родительским штаммом *Shigella flexneri* 2a 2457T дикого типа, ShigETEC или соответствующими изогенными мутантами при множественности заражения (MOI) 80. Процент
10 внутриклеточных (инвазированных) бактерий относительно инокулята определяли с помощью расчетов КОЕ после посева на чашки. Показаны объединенные данные 4 параллельных биологических анализов с 2 техническими повторами каждого.

Фиг. 3. Экспрессия детоксифицированных антигенов ETEC с применением
15 ShigETEC. (a) Цельноклеточные лизаты ShigETEC тестировали на экспрессию LTB-ST(N12S) путем связывания с рецептором LTB, GM1, в иммуноферментном анализе (ИФА) (серые столбцы). Связанный LTB обнаруживали с помощью антитела к СТВ. Уровень экспрессии LTB-ST(N12S) сравнивали с последовательно разведенным LTB (черные столбцы). Шероховатый
20 неинвазивный мутант шигеллы (*ΔrfbFDipaBC*) без гибридной конструкции LTB-ST(N12S) применяли в качестве отрицательного контроля (белый столбец). (b) ST дикого типа и его мутантная форма N12S были получены рекомбинантными методами в *E. coli*. Супернатанты (SN) культур применяли для стимуляции эпителиальных клеток человека T84 и измеряли ST-индуцированную продукцию
25 цГМФ с помощью ИФА. Указанные количества синтетического ST применяли в качестве положительного контроля. SN от бактерий, несущих пустой вектор, служил отрицательным контролем. Результаты тройных измерений из двух независимых экспериментов объединили.

Фиг. 4. ShigETEC индуцирует защиту от летальной стимуляции
30 гетерологичными штаммами шигелл. Мышей вакцинировали 3 раза интраназально (и/н) 10^8 КОЕ ShigETEC (серая линия) или буфером (черная линия). Через четыре недели после последней вакцинации мышам проводили стимуляцию и/н летальными дозами (a) *Shigella sonnei* (9×10^6 КОЕ) или (b) *Shigella flexneri* 6 ($1,2 \times 10^7$ КОЕ). Выживаемость контролировали в течение

14 дней. Показаны данные двух независимых экспериментов с общим количеством по 10 мышей на группу.

Фиг. 5. Обнаружение сывороточных антител IgG и мукозальных антител IgA, индуцированных при вакцинации ShigEТЕС. (а) Мышей вакцинировали 3 раза и/н 10⁸ КОЕ ShigEТЕС. Методом ИФА оценивали уровни специфичных антител IgG к указанным антигенам в сыворотке, полученной через 4 недели после последней вакцинации, применяя указанные разведения сыворотки. Символы представляют собой средние значения повторных измерений в сыворотках, полученных от отдельных мышей (43 мыши на группу), из трех независимых экспериментов по вакцинации. (b) Мышей вакцинировали 3 раза и/н 10⁸ КОЕ ShigEТЕС и проводили стимуляцию летальными дозами *S. sonnei* или *S. flexneri* 6 через четыре недели после последней вакцинации. Бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) брали через две недели после стимуляции выработки антител. Методом ИФА оценивали уровни специфичных антител IgA к указанным антигенам, применяя указанные разведения сыворотки. Символы представляют собой средние значения повторных измерений в образцах БАЛ, полученных от отдельных мышей, из трех независимых экспериментов по вакцинации с 18 и 41 мышью на группу для имитационного введения и введения ShigEТЕС соответственно.

Фиг. 6. Токсин-нейтрализующая способность сывороток мышей, индуцированная вакцинацией ShigEТЕС. (а) Мышей вакцинировали 3 раза и/н 10⁸ КОЕ ShigEТЕС. Сыворотку в указанных разведениях инкубировали с указанными количествами LT и измеряли связывание LT с планшетами, покрытыми GM1. Связанный LT определяли с помощью поликлонального антитела к холерному токсину. (b) Сыворотки отдельных мышей (3 раза вакцинированных и/н 10⁸ КОЕ ShigEТЕС (серые символы) или буфером (имитационное введение, черные символы)) предварительно инкубировали с 5 нг LT. Индуцированное LT высвобождение цАМФ измеряли в эпителиальных клетках толстой кишки человека T84.

Фиг. 7. SEQ ID NO: 19: нуклеотидная последовательность, указанная в тексте примеров (*nfA*-3x[LTB-ST(N12S)]).

В последовательности указаны: *infA* курсивом, **LTB** жирным шрифтом, ST(N12S) подчеркиванием (мутация **N12S** выделена жирным шрифтом и подчеркнута) и промотор LTA (подчеркнут двойной линией); линкерная последовательность между LTB и ST(N12S) (без выделения).

LTV (кодирующая последовательность выделена жирным шрифтом) слита с ST(N12S) (кодирующая последовательность подчеркнута) через линкер GPGP (SEQ ID NO: 20) (кодируемая нуклеотидной последовательностью, которая размещена между кодирующими последовательностями LTV и ST(N12S)). ST детоксифицирован мутацией N12S. Экспрессия управляется промотором LTA (подчеркнут двойной линией) и останавливается последовательностью терминации LTV. Гибридный ген экспрессируется как 3-кратный тандемный повтор. Конструкция также экспрессирует *infA* (выделен курсивом) в виде отдельного гена с собственными последовательностями промотора и терминатора.

Фиг. 8 (пример 8). Средние геометрические титры когорт, вакцинированных различными количествами КОЕ ShigEТЕС один раз (панель А) или различное количество раз при дозе ShigEТЕС 5×10^{10} КОЕ (панель В). Образцы сыворотки, собранные в дни 6, 10, 28, 60 после (последней) иммунизации, анализировали методом ИФА на титры IgA, реагирующих на лизат вакцинного штамма.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Конкретные термины, используемые в настоящем подробном описании, имеют следующее значение.

Термины «содержать», «иметь» и «включать», используемые в настоящем документе, могут использоваться как синонимичные и должны пониматься как открытое определение, допускающее наличие дополнительных членов или частей или элементов. Термин «состоящий» рассматривается как наиболее близкое определение, без дополнительных элементов определяемой особенности, о которой говорят «состоящая». Таким образом, термин «содержащий» является более широким и включает в себя определение термина «состоящий».

В настоящем документе термин «около» означает одно и то же значение или значение, отличающееся на $\pm 10\%$ или $\pm 5\%$ от данного значения.

Термин «антиген», используемый в настоящем документе, в частности, относится к любой антигенной детерминанте, которая может быть, возможно, распознана по сайту связывания антитела. В частности, предпочтительными антигенами являются те молекулы или структуры, для которых уже доказана

иммунологическая или терапевтическая значимость или способность к ней, особенно те, для которых была изучена клиническая эффективность. В настоящей заявке этот термин, в частности, включает молекулы или структуры, выбранные из антигенов, содержащих иммунодоступные и иммунорелевантные эпитопы, в частности, консервативных антигенов, обнаруженных у одного или более биологических видов или серотипов. Иммунодоступные эпитопы обычно представлены антигенами или содержатся в антигенах, экспрессируемых на внешней поверхности патогена или на поверхности инфицированной клетки.

Антигены могут, в частности, содержать один или более иммунологически релевантных эпитопов, которые в настоящем документе понимаются как структуры, которые распознает иммунная система субъекта и/или соответствующие антитела. Эпитопы могут, например, представлять собой В-клеточные эпитопы или Т-клеточные эпитопы, такие как CD4+ Т-клеточные эпитопы или CD8+ Т-клеточные эпитопы. Антигены, как описано в настоящем документе, специфично предназначены для запуска иммунного ответа у субъекта и, в частности, включают одну или более антигенных детерминант, которые могут быть, возможно, распознаны посредством сайта связывания антитела или способны связываться с пептидной канавкой молекул HLA класса I или класса II или других антигенпрезентирующих молекул, таких как CD1, и как таковые могут служить стимулятором для специфичных Т-клеток.

Термин «ослабленный» используется в настоящем документе для описания вирулентного штамма шигеллы, который был модифицирован таким образом, что он больше не способен вызывать заболевание, т. е. модифицированный штамм является невирулентным. Термин «живой» в отношении ослабленной шигеллы используется в настоящем документе для описания шигеллы, которая способна расти и размножаться. Соответственно, живой штамм шигеллы, описанный в настоящем документе, применяется в ослабленной живой вакцине, и, в частности, он способен колонизировать толстую кишку субъекта, но не вызывает клинические симптомы, связанные с энтеральными заболеваниями, вызванными энтеральными или диарейными патогенами. Кроме того, живой штамм, описанный в настоящем документе, в частности, способен к ограниченному размножению в вакцинированном субъекте и индуцированию защитного иммунного ответа, который защищает от вирулентных штаммов шигеллы. Ослабленный штамм

означает ослабленную бактерию. Ослабление может включать генно-инженерную модификацию с получением мутантов, которые отличаются от нативного штамма.

Ослабленный штамм *Shigella flexneri*, описанный в настоящем документе, в частности, получен из вирулентного штамма любой из соответствующих серогрупп шигелл (любых серотипов *Shigella flexneri*). Например, из серогруппы B: *S. flexneri* (15 серотипов и подсеротипов).

Вирулентный штамм шигеллы, применяемый в настоящей заявке с целью ослабления, может представлять собой известный в клинической практике вирулентный штамм или штамм, который идентифицирован как содержащий факторы вирулентности. В частности, штамм выбран из любой из *S. flexneri*, в частности, штамма *S. flexneri 2a*, такого как *S. flexneri 2a 2457T* (ATCC 700930, DNA=700930D-5) или CIP 107659 (Институт Пастера, Франция), или любого штамма *S. flexneri 2b*.

Вирулентный штамм шигеллы может быть модифицирован способами, известными специалистам в данной области, включая множественный серийный пассаж, температурно-чувствительное ослабление, мутагенез, в частности, целевой мутагенез, или тому подобное, так что полученный мутантный штамм ослаблен, в частности, невирулентен, не способен вызывать заболевание у субъекта.

В некоторых вариантах реализации модификация вирулентного штамма приводит к делеции и/или инактивации гена, включая уменьшение или подавление экспрессии полинуклеотидов или генов, кодирующих факторы вирулентности, или приводит к экспрессии нефункциональных факторов вирулентности.

Существует ряд способов, хорошо известных в данной области, для получения ослабляющих мутаций, например, для уменьшения или отмены экспрессии полинуклеотида. Например, мутация может быть введена в заранее определенном сайте, таком как промоторная область или сайт внутри кодирующей последовательности, для получения нонсенс-мутации с применением технологии рекомбинантных ДНК. Методы рекомбинантных ДНК включают клонирование гена, представляющего интерес, модификацию последовательности гена посредством сайт-направленного мутагенеза, расщепление ферментами рестрикции с последующим повторным лигированием и следующей далее заменой гена дикого типа мутантным геном.

Подходящие стандартные методы рекомбинантных ДНК известны специалистам в данной области и описаны, в частности, в публикации Sambrook et al., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» (1989), 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory press).

- 5 Ослабляющие мутации могут быть выполнены с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области, включая клонирование последовательности ДНК гена дикого типа в вектор, например плазмиду, необязательно вставку селективного маркера в клонируемую последовательность ДНК или удаление части последовательности ДНК, приводящее к ее инактивации.
- 10 Делеция может быть введена, например, путем разрезания последовательности ДНК с помощью ферментов рестрикции, которые вносят разрезы в двух точках внутри или непосредственно рядом с границами кодирующей последовательности, и лигирования вместе двух концов в остающейся последовательности. В соответствии с другим вариантом реализации может быть
- 15 сконструирована мутантная аллель, в которой фланкирующие области целевого гена амплифицируют по-отдельности и напрямую соединяют друг с другом в отдельной реакции ПЦР с перекрывающимися праймерами, с пропуском промежуточной целевой последовательности. Плазида, несущая мутированную последовательность ДНК, может быть трансформирована в бактерию известными
- 20 способами, такими как электропорация, химическая трансформация или конъюгация. Затем можно с помощью подходящего метода отбора идентифицировать мутанта, в котором инактивированная последовательность ДНК рекомбинировала в хромосому бактерии, а последовательность ДНК дикого типа стала нефункциональной вследствие гомологичной рекомбинации.
- 25 Кроме того, если используется ген устойчивости к антибиотикам, он обычно удаляется из бактерий перед их применением в вакцине. В соответствии со способом Datsenko с соавт. (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 6640-6645 (2000)) мутагенез основан на рекомбиназной системе Red бактериофага лямбда, которая
- 30 позволяет специфично разрушать как кодируемые плазмидами, так и хромосомные гены. Стратегия заключается в замене таких генов, например, селективным геном устойчивости к антибиотикам, который генерируют с помощью ПЦР с использованием праймеров к целевому гену с гомологичными дополнительными последовательностями длиной 40–60 нуклеотидов. Рекомбинация на основе системы Red опосредуется областями в этих

гомологичных последовательностях. После отбора ген устойчивости к антибиотикам также может быть устранен с помощью вспомогательного вектора, который экспрессирует рекомбиназу FLP, которая использует прямые повторы FRT (FLP recognition target — «целевой сайт распознавания рекомбиназой FLP»),

5 фланкирующие ген устойчивости к антибиотикам.

В некоторых вариантах реализации мутация может быть введена в заранее определенном сайте в хромосомной или внехромосомной ДНК, например плазмиде, посредством вставки, делеции или замены одного нуклеотида другим, например, точечной мутацией, что приводит к образованию мутантного гена,

10 экспрессия которого уменьшена или отсутствует. Мутация должна приводить к получению штамма шигеллы, который имеет пониженную способность вызывать дизентерию. Предпочтительно мутация представляет собой делеционную мутацию, где нарушение гена вызвано эксцизией нуклеиновых кислот. Такую мутацию можно, например, осуществить путем делеции отрезка смежных пар

15 нуклеотидов. Даже очень маленькие делеции, такие как делеции участков из 10 пар нуклеотидов, могут привести к тому, что ген не будет кодировать белок или будет кодировать нефункциональный белок. Даже делеция одной пары нуклеотидов может привести к отсутствию белка или образованию нефункционального белка, поскольку в результате такой мутации другие пары

20 нуклеотидов больше не находятся в правильной рамке считывания либо ингибируется или подавляется транскрипция. Более предпочтительно удаляют более длинный участок, например 100 пар нуклеотидов или по меньшей мере значительную часть гена, например, по меньшей мере 50 % гена. Еще более предпочтительно, чтобы был удален весь ген.

25 Хорошо определенные и преднамеренно внесенные мутации, включающие делецию фрагментов или всего гена, или их комбинации имеют преимущество по сравнению с классическими индуцированными мутациями в том, что они не возвращаются к дикому типу. Таким образом, в некоторых вариантах реализации, описанных в настоящем документе, вакцинный штамм содержит живой

30 ослабленный штамм шигеллы, в котором мутация в гене, кодирующем фактор вирулентности, включает в себя делецию или вставку для нарушения полинуклеотидной последовательности, кодирующей фактор вирулентности, таким образом, что соответствующий белок не продуцируется или указанный белок является нефункциональным.

Ослабление может быть осуществлено, например, путем делеции и/или инактивации одного или более из следующих генов или их (значительной) части, или любого из модуляторов указанного гена, влияющего на функцию указанных генов: *rfb*, *wzy*, *waalA*, *aroA*, *aroC*, *aroD*, *aroE*, *guaA*, *guaB*, *virG* и любого одного или
5 более из *ipaA–D*. Предпочтительные ослабленные штаммы шигелл, описанные в настоящем документе, представляют собой двойные мутанты или множественные мутантные штаммы с по меньшей мере тремя или более ослабляющими мутациями. Предпочтительные комбинации целевых генов для ослабляющих мутаций включают по меньшей мере один ген *rfb* (например, гены *rfb* F, D, C, E, J
10 и/или I) и по меньшей мере один ген *ipa* (например, *ipaB*, *ipaC*).

Способы идентификации бактерий, которые имеют одну или более мутаций в генах, кодирующих факторы вирулентности, известны специалисту в данной области. Соответственно, стандартные методики обнаружения штаммов шигелл, которые были мутированы способами, описанными выше, включают нозерн- и
15 вестерн-блоттинг, ПЦР, ИФА и анализы цитотоксичности, как описано в других местах настоящего документа. Мутантные штаммы без функциональных генов, кодирующих специфические факторы вирулентности, могут быть легко отобраны с применением стандартных методик.

Кодирующие факторы вирулентности гены, которые подлежат ослаблению,
20 могут быть плазмидными. Следовательно, в некоторых вариантах реализации модификация вирулентного штамма шигеллы включает мутирование одной или более эндогенных плазмид шигеллы. Термин «плазмида», в частности, относится к цитоплазматической ДНК, которая реплицируется независимо от бактериальной хромосомы. Можно представить себе мутацию частей плазмиды вирулентности,
25 или инвазивной плазмиды, шигеллы или даже элиминацию плазмиды. Однако предпочтительно, чтобы ослабленная шигелла все еще содержала эндогенную плазмиду инвазии, более предпочтительно стабильную плазмиду инвазии. Это обеспечивает стабильность ослабленного штамма, в частности, с точки зрения потенциальной потери плазмиды инвазии ослабленной клеткой или
30 потенциального поглощения (нативной) плазмиды инвазии, происходящей из шигеллы дикого типа, что может происходить с нестабильным штаммом или если плазмида инвазии нестабильна.

Плазмида инвазии шигелл является эндогенной в большинстве штаммов шигелл. Хотя плазмида инвазии может быть потеряна при культивировании

штамма шигеллы, ее можно сконструировать методами генной инженерии с получением рекомбинантной плазмиды, демонстрирующей высокий уровень стабильности, что делает ее привлекательной мишенью для разработки в качестве полезного вектора для включения гетерологичных генов, кодирующих антигены, в частности, протективные антигены.

Под «перекрестно-реактивной» вакциной или соответствующим иммунным ответом понимают вакцину или ответ, которые защищают от инфекции по меньшей мере одним другим патогеном, например, другим серотипом или видом бактерий, который не идентичен тому, который использовали, чтобы вызвать ответ. Эффективность перекрестной реактивности в типичном случае можно протестировать с помощью иммунных сывороток от подвергавшихся воздействию различных патогенов субъектов, которые проверяют на реакцию с различными патогенами в ИФА или других иммунных анализах.

Термин «перекрестно-реактивный», используемый в настоящем документе в отношении антигенов и иммунного ответа на такие антигены, будет относиться к перекрестным серотипическим или межвидовым реакциям, обеспечивающим иммунитет к одному или более целевым серотипам и биологическим видам соответственно. Перекрестно-реактивные вакцины, описанные в настоящем документе, могут специфично вызывать межвидовой иммунный ответ и выработку соответствующих иммуноглобулинов, например, при применении шероховатого штамма шигеллы, который лишен иммунодоминантных O-антигенов или генов *ipa*, для индукции иммунной реакции, которая распознает ряд целевых серотипов шигеллы. Эпитоп или антиген могут происходить из одного исходного вида и быть перекрестно-реактивными в отношении целевого вида, отличного от исходного вида. Эпитопы могут быть общими для ряда видов и, следовательно, быть перекрестно-реактивными. Перекрестно-реактивный эпитоп и антигены могут вызывать межвидовой реактивный иммунный ответ и выработку соответствующих перекрестно-реактивных иммуноглобулинов.

(Перекрестная) реактивность против определенного целевого патогена может быть определена, например, иммунологическими методами, например, ИФА, иммунофлуоресцентным анализом (FIA), радиоиммунным анализом (РИА), флуоресцентной микроскопией или проточной цитометрией.

Когда перекрестно-реактивный антиген предназначен для индукции перекрестного протективного иммунитета, это можно протестировать на животных

моделях, например, путем иммунизации животных перекрестно-реактивным антигеном, полученным из одного патогена, вызывающим иммунный ответ, и контрольного введения животным по меньшей мере одного патогена, отличного от того, который использовали, чтобы вызвать ответ. В качестве примера, такой

5 перекрестный протективный иммунитет против более чем одного серотипа шигелл или других энтероинвазивных бактерий с перекрестно-реактивными антигенами, таких как *E. coli*, специфично относится к защите от различных вариаций в пределах видов бактерий у разных индивидуумов, например, вариаций на уровне подвидов. Группа сероваров с общими антигенами называется серогруппой или

10 серотипом.

Основой для разработки вакцины широкого спектра, например мультиштаммовой и/или мультисеротипической и/или мультивидовой вакцины против шигелл, является идентификация перекрестно-реактивных антигенов, которые распространены в сероварах шигелл. Это, в частности, включает

15 изоляты, ассоциированные с инфекциями человека.

Когда поливалентная вакцина предназначена для индукции перекрестного протективного иммунитета против различных патогенов, иммунный ответ обычно вызывают несколькими антигенами, например, отдельными антигенами от различных патогенов. В качестве примера, такая поливалентная вакцина может

20 быть основана по меньшей мере на двух различных протективных антигенах из разных видов, таких как полученные из *Shigella* и *Escherichia*, а также на других бактериальных, вирусных, грибковых или паразитарных антигенах. Перекрестно-протективную поливалентную вакцину можно, например, протестировать на

25 животной модели путем иммунизации животных вакциной, содержащей различные протективные антигены, полученные из по меньшей мере двух различных патогенов, вызывающей иммунный ответ, и контрольного введения животным одного, двух или более патогенов.

Основой для разработки многовидовой кандидатной вакцины на основе специфичных ослабленных бактерий шигелл, такой как описана в настоящем

30 документе, является идентификация протективных антигенов, либо перекрестно-реактивных для лечения ряда различных серотипов, либо не перекрестно-реактивных, которые преобладают у различных патогенных видов, против которых требуется защита.

Термин «энтеральный», также известный как «кишечный», используемый в настоящем документе, в частности, в связи с заболеванием или патогеном, будет обозначать болезненное состояние или патоген, относящиеся к кишечнику или влияющие на кишечник, например, дизентерию или диарейное заболевание. В 5 частности, такое энтеральное заболевание обозначает инфекционное заболевание толстой кишки. Конкретные симптомы включают диарею с кровавым, содержащим слизь стулом; боль в животе; лихорадку и потерю жидкости из организма. Диарейное заболевание относится к состояниям, приводящим к трем или более эпизодам мягкого или жидкого стула в сутки либо к более частому стулу, 10 чем это обычно для данного человека. Известно, что энтеральный патоген вызывает энтеральное заболевание у субъекта либо при инфицировании указанным патогеном, либо при интоксикации субъекта токсином, в частности энтеротоксином.

Существует множество причин инфекционных энтеральных заболеваний, 15 таких как дизентерия или диарея, которые включают вирусы, бактерии, грибы и паразитов. Можно привести следующие примеры: норовирус является наиболее частой причиной вирусной диареи у взрослых, а ротавирус является самой частой причиной у детей в возрасте до пяти лет. Аденовирусы типов 40 и 41, а также астровирусы вызывают значительное количество инфекций. Бактерия 20 *Campylobacter* является частой причиной бактериальной дизентерии или диареи, но инфекции, вызванные *Salmonellae*, *Shigellae* и некоторыми штаммами *Escherichia coli* (*E. coli*), часто встречаются на некоторых территориях. У пожилых людей, особенно тех, кто лечился антибиотиками от несвязанных инфекций, токсин, вырабатываемый *Clostridium difficile*, часто вызывает тяжелую диарею. 25 Примеры паразитов включают *Giardia lamblia*, которая может вызывать хронические инфекции, и *Entamoeba histolytica*. Примером энтерального заболевания, от которого, возможно, будет защищать вакцина, описанная в настоящем документе, является шигеллез и связанная с ЕТЕС диарея.

Термин «эндогенный» в настоящем документе в отношении плазмиды 30 означает плазмиду, которая встречается в природе в конкретной клетке-хозяине (дикого типа). Эндогенная плазида может быть создана генно-инженерными методами с получением рекомбинантной эндогенной плазмиды, например, с помощью методик рекомбинантных ДНК для конструирования плазмиды *in situ*, т. е. в клетке-хозяине, содержащей нативную эндогенную плазмиду, или после

удаления плазмиды из клетки-хозяина, проведения над ней лабораторных манипуляций и повторной интродукции в клетку-хозяина того же типа. Инвазивный фенотип шигеллам специфично придает эндогенная плаزمида вирулентности размером 220 т. п. н., также называемая инвазивной плазмидой, либо нативной или эндогенной плазмидой инвазии. Эндогенная плазмида инвазии шигелл, в частности, предложена, как описано в настоящей заявке, для целей рекомбинации, либо в виде выделенной плазмиды инвазии, либо для рекомбинации *in situ*.

Термин «эндогенный» также используется для указания нуклеотидной последовательности или гена штамма шигеллы, описанного в настоящей заявке. Под такой нуклеотидной последовательностью или геном понимают элемент, эндогенный для шигеллы, если он встречается в природе, например, присутствует в нативном штамме шигеллы дикого типа, в частности, при этом такой элемент расположен в геноме, где он встречается в природе без замены.

Эндогенная плазмида инвазии шигелл хорошо охарактеризована в данной области техники, и эти знания полезны при выборе сайтов для проведения рекомбинации в таких плазмидах, а также подходящих условий размножения, например, в положении между нуклеотидами 103187–103328 между генами IS100 и *ipaJ* (эти положения определены для плазмиды инвазии pCP301 штамма *Shigella flexneri* 2a 301).

Термин «существенный», используемый в настоящем документе в отношении гена, относится к гену, необходимому для выживания живого организма, например, для размножения бактериальной клетки. Мутация существенного гена, такая как делеция и/или инактивация, может привести к летальному фенотипу или неспособной к размножению клетке. Существенные гены шигелл могут быть мутированы для удаления гена (-ов) из хромосомы шигеллы и последующего включения гена (-ов) в плазмиду инвазии для стабилизации плазмиды инвазии. Это обеспечивает культивирование шигеллы со стабильной рекомбинантной эндогенной плазмидой инвазии. Среди существенных генов шигелл есть гены *ppa*, *accD*, *acpS*, *dapE*, *era*, *frr*, *ftsI*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsZ*, *infA*, *lgt*, *lpxC*, *msbA*, *murA*, *murl*, *nadE*, *parC*, *proS*, *pyrB*, *rpsB*, *trmA*, *rho* и *rhoL*.

Термин «гетерологичный» в настоящем документе используется для обозначения элемента, такого как, например, экспрессионная конструкция, ген, антиген или эпитоп, являющегося частью более крупной структуры, такой как

молекула нуклеиновой кислоты, плаزمиды, полипептид или белок, который является чужеродным по отношению к другим частям такой более крупной структуры.

5 Что касается гетерологичной экспрессионной конструкции, описанной в настоящей заявке, термин в частности относится к экспрессионной кассете, которая не включена естественным образом в геном или эндогенную плазмиду инвазии штамма шигеллы, которые не были модифицированы генно-инженерными методами для включения указанной экспрессионной кассеты.

10 Экспрессионная конструкция также понимается как гетерологичная, если она содержит искусственную экспрессионную конструкцию, такую как, например, содержащая промотор, функционально присоединенный к гену, причем промотор не контролирует естественным образом экспрессию указанного гена в штамме шигеллы дикого типа.

15 Под нуклеотидной последовательностью, геном или экспрессионной конструкцией в настоящем документе понимают элемент, который является гетерологичным, если он внедрен транспозицией или расположен в другой геномной области, нежели в штамме шигеллы дикого типа. Например, когда такой элемент понимается как гетерологичный по отношению к плазмиде инвазии, если он происходит из хромосомной области шигеллы и включен в плазмиду инвазии.
20 Например, в настоящем документе подразумевается, что экспрессионная конструкция, включенная в плазмиду инвазии и экспрессирующая хромосомный ген шигеллы, является гетерологичной по отношению к плазмиде инвазии.

25 Системы экспрессии, генетические конструкции или модификации, описанные в настоящем документе, могут подразумевать применение инструментов, способов и методик, известных в данной области техники, таких как описанные в публикации J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001). Экспрессионные векторы могут включать, без ограничений, векторы для клонирования, модифицированные векторы для клонирования и специально сконструированные плазмиды.
30

Конкретные экспрессионные конструкции, описанные в настоящей заявке, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую экспрессии, и регуляторные элементы, которые функционально присоединены (тем самым функционально контролируют экспрессию указанной последовательности

нуклеиновой кислоты), что необходимо для экспрессии указанного гена в клетке-хозяине. Примеры регуляторных последовательностей включают промотор, операторы, энхансеры, сайты связывания рибосом и последовательности, контролирующие инициацию и терминацию транскрипции и трансляции.

5 Конкретные экспрессионные конструкции представляют собой экспрессионные кассеты, содержащие промотор, функционально присоединенный к экспрессируемой последовательности ДНК, т. е. при этом экспрессия последовательности ДНК находится под контролем указанного промотора.

10 Что касается гетерологичного антигена, описанного в настоящей заявке, термин в частности относится к антигенам, которые не экспрессируются в природе в штамме шигеллы, который не был сконструирован генно-инженерными методами для экспрессии указанного антигена. Антиген также понимается как гетерологичный, если он содержит мутацию в последовательности антигена, которая не встречается в природе в штамме шигеллы дикого типа.

15 Штамм шигеллы, описанный в настоящем документе, может быть сконструирован генно-инженерными методами для экспрессии гетерологичного антигена, например, нетоксичного компонента или формы LT и/или ST, такого как мутантный ST (STm). В частности, STm отличается от ST дикого типа по меньшей мере одной или двумя точечными мутациями, такими как замена аминокислоты.
20 Такие клетки индуцируют иммунный ответ против гетерологичного антигена, а также нативных антигенов и, следовательно, улучшают защиту, обеспечиваемую вакциной.

В данном документе термин «инактивация» гена всегда относится к кратковременной, индуцируемой или конститутивной понижающей модуляции
25 гена таким образом, чтобы уменьшить или ингибировать экспрессию продукта гена. Это может быть, в частности, сделано путем мутации гена или регуляторной последовательности, функционально присоединенной к гену, такой как промоторы, энхансеры и т.д., которые регулируют экспрессию гена. Среди инактивирующих мутаций есть, в частности, такие, которые приводят к
30 уменьшению или подавлению экспрессии полинуклеотидов или генов, например, генов, кодирующих факторы вирулентности, или приводят к экспрессии соответствующих нефункциональных белков, например, нефункциональных факторов вирулентности.

Термин «инвазивный» или «неинвазивный», используемый в настоящем документе в отношении гена, понимается следующим образом. Инвазивные патогенные бактерии способны проникать в эукариотические клетки. Например, после инвазии шигелла может размножаться внутриклеточно и распространяться в соседние эпителиальные клетки, что приводит к разрушению тканей и характерной патологии шигеллеза. Среди генов, опосредующих инвазивность шигелл, есть, например, гены *ipa*, кодирующие антигены плазмиды инвазии. Делеция и/или инактивация по меньшей мере одного из таких генов может привести к неинвазивной шигелле.

Тест на инвазию эпителиальных клеток является стандартным тестом *in vitro* для определения инвазивности штамма шигеллы. Инвазию и внутриклеточный рост определяют с использованием, например, клеток HeLa (эпителиальных клеток человека). Штамм шигеллы определяется как неинвазивный, если не наблюдается инвазии эпителиальных клеток (ниже минимального предела обнаружения) по сравнению с контролем (инвазивным штаммом шигеллы (например, дикого типа)) после времени инкубации (например, по меньшей мере 30, 40, 50 или 60 мин), которое позволяет контролю осуществить инвазию по меньшей мере примерно на 10 % или 20 %. В таком тесте штамм считается неинвазивным, если процент инвазированных клеток составляет, например, менее 2 % или менее 1 %.

Тест Серени является дополнительным стандартным тестом *in vivo* (на животных, отличных от человека) для определения инвазивности таких микроорганизмов, как шигелла или энтероинвазивная *Escherichia coli* (EIEC) (Wood et al. J. Clin. Microbiol. 24: 498–500, 1986). Он проводится путем инокуляции суспензии бактерий в глаз морской свинки. Тяжелый слизисто-гнояный конъюнктивит и тяжелый кератит свидетельствуют о положительном результате теста. Штамм определяют как неинвазивный или невирулентный, если признаков кератоконъюнктивита не наблюдается.

Термин «шероховатый» по отношению к грамотрицательным бактериям, таким как шигеллы, означает отличие от гладкого и будет, в частности, включать бактерии со «слабо шероховатым» (то есть с пониженным синтезом О-антигена), или «полусшероховатым» (с экспрессией одного одиночного повтора О-антигена), или «сильно шероховатым» (с укороченным кором ЛПС) фенотипами. Термин «шероховатый» при использовании в настоящем документе может включать такие

характеристики, как нерегулярная морфология колоний, и может включать, например, волнистую и/или лопастную морфологию. Термин, в частности, означает, что штамм не способен и/или в существенной степени не способен продуцировать О-полисахарид. Повторяющийся гликановый полимер, содержащийся в ЛПС, называют О-антигеном, О-полисахаридом или О-(боковой) цепью грамотрицательных бактерий. О-антиген присоединен к кору олигосахарида и образует самый крайний домен молекулы ЛПС. Наличие или отсутствие О-цепей определяет, считается ли ЛПС шероховатым или гладким. Бактериальные штаммы, которые имеют измененные структуры О-антигена, меняют свой внешний вид с гладкого на матовый при выращивании на чашках с агаром. Полноразмерные О-цепи делают ЛПС гладкими, в то время как отсутствие или уменьшение О-цепей делает ЛПС шероховатыми. «Гладкие» бактерии включают бактерии с полными кором и О-антигеном. «Шероховатые» бактерии включают бактерии, у которых отсутствует О-антиген ЛПС, что означает отсутствие О-антигена, или уменьшенную длину цепи О-антигена, или уменьшенное количество цепей гладких ЛПС. Термин «слабо шероховатый» относится к подгруппе шероховатых бактерий, у которых уменьшена длина цепи О-антигена или уменьшено количество цепей гладких ЛПС. «Сильно шероховатые» бактерии представляют собой подгруппу шероховатых бактерий, которые потеряли части кора ЛПС, следовательно, также не имеют О-антигенов. «Полушероховатые» мутанты представляют собой подгруппу шероховатых бактерий, которые экспрессируют один единичный повтор О-антигена на коре ЛПС из-за потери функции фермента полимеразы О-антигена.

Термин «уменьшение О-антигенов ЛПС», используемый в настоящем документе в отношении шероховатых шигелл, в частности, относится к менее чем 50 %, или менее чем 40 %, или менее чем 30 %, или менее чем 20 %, или менее чем 10 % содержанию, или по существу к отсутствию О-антигена ЛПС, согласно определению в стандартном анализе.

Для определения характеристик шероховатой морфологии штамма может применяться стандартный тест.

Например, фенотип мутантов по ЛПС может быть определен, например, с помощью разделения ЛПС в ДСН-ПААГ и окрашивания серебром или с помощью тестов на агглютинацию с использованием иммунных сывороток, специфичных к О-антигену.

Шероховатая шигелла может быть получена путем мутации по меньшей мере одного гена или его существенной части, например, путем делеции и/или инактивации, причем указанный ген участвует в синтезе, транспорте и/или экспрессии ЛПС, предпочтительно выбран из группы, состоящей из генов в кластере оперона *rfb*, или одного или более генов в кластере генов *rfb/wbb*, кодирующих белки синтеза О-антигена, *waal*, кодирующего лигазу О-антигена, *wzx*, кодирующего флиппазу О-антигена, участвующую в транспорте О-антигена, *wzy/rfc*, участвующих в полимеризации О-антигена, генов в кластере генов *rfa/waa*, кодирующих белки синтеза кора ЛПС, регуляторных генов, влияющих на экспрессию О-антигена, таких как *rfaH*, либо генов, потеря функции (-й) которых приводит к уменьшению экспрессии О-антигенов по меньшей мере на 90 %.

Конкретными примерами генов, участвующих в синтезе сахара ЛПС, являются *rfbA*, B, D и C.

Конкретными примерами генов, участвующих в переносе сахара ЛПС, являются *rfbF* и G.

Конкретным примером гена, участвующего в полимеризации О-антигена ЛПС, является *rfc/wzy*.

Кластер оперона *rfb* расположен либо на хромосоме, либо на плазмиде инвазии (*Shigella sonnei*). Специфичными генами в этом кластере являются гены *rfb F, D, C, E, J* и/или I.

Термин «*set*» или «*setBA*», используемый в настоящем документе, относится к гену (-ам), эндогенному (-ым) по отношению к шигелле и кодирующему (-им) энтеротоксин шигеллы (ShET), в частности, ShET1, например, как описано Kotloff с соавт. (2000, 2004 или 2007).

Термин «*sen*», используемый в настоящем документе, относится к гену, эндогенному по отношению к шигелле и кодирующему энтеротоксин 2 шигеллы (ShET2), например, как описано Kotloff с соавт. (2000, 2004, или 2007).

Термин «происхождение», используемый в настоящем документе в отношении антигена, происходящего от патогена, понимается как описывающий соответствующую аминокислотную последовательность, которая идентична соответствующей последовательности, встречающейся в природе в патогене, которая может быть использована в качестве источника указанного антигена, и которая может быть использована в качестве матрицы для получения модифицированной последовательности путем модификации встречающейся в

природе (исходной) последовательности с получением мутантной формы или ее производного. Такая мутантная форма понимается в настоящем документе как мутантная форма, происходящая из указанного источника.

Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантный» относится к молекуле или конструкции, которые не встречаются в клетке-хозяине естественным образом. В некоторых вариантах реализации молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержат две или более встречающиеся в природе последовательности, которые соединены друг с другом таким способом, который не встречается в природе. Рекомбинантный белок означает белок, который кодируется и/или экспрессируется рекомбинантной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах реализации «рекомбинантные клетки» экспрессируют гены, которые не обнаруживаются в идентичной форме в нативной (т. е. не рекомбинантной) форме клетки, и/или экспрессируют нативные гены, которые иным образом аномально сверхэкспрессируются, недоэкспрессируются и/или не экспрессируются вообще из-за преднамеренного вмешательства человека. Рекомбинантные клетки содержат по меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид или полипептид. «Рекомбинация», «рекомбинирование» и получение «рекомбинантной» нуклеиновой кислоты обычно включает в себя соединение по меньшей мере двух фрагментов нуклеиновой кислоты.

Термин «рекомбинантный» в настоящем документе, в частности, означает «полученный путем или в результате генной инженерии», то есть посредством вмешательства человека. Рекомбинантная нуклеотидная последовательность может быть создана генно-инженерными методами путем внесения одной или более точечных мутаций в исходную нуклеотидную последовательность и может быть экспрессирована в рекомбинантной клетке-хозяине, которая содержит экспрессионную кассету, содержащую такую рекомбинантную нуклеотидную последовательность. Полипептид, экспрессируемый такой экспрессионной кассетой и клеткой-хозяином, соответственно, также называют «рекомбинантным». Для целей, описанных в настоящем документе, могут применяться традиционные методы молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантных ДНК в рамках уровня техники. Конкретные варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к получению химерного антигена и рекомбинантным средствам такого получения, включая нуклеиновую кислоту,

кодирующую аминокислотную последовательность, экспрессионную кассету, вектор или плазмиду, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, подлежащую экспрессии, и клетку-хозяина, содержащую любое такое средство. Подходящие стандартные методы
5 рекомбинантных ДНК известны специалисту в данной области и описаны, в частности, в публикации Sambrook с соавт. «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» (1989), 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory press).

В настоящем документе термин «субъект» понимается как включающий людей или теплокровных млекопитающих, таких как люди или домашние
10 животные (в частности, включая, например, свиней), животные-компаньоны и лабораторные животные, которые являются либо пациентами, страдающими от специфического заболевания, либо здоровыми субъектами. Термин «субъект» включает тех, кто получает либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

15 В частности, лечение и медицинское применение, описанные в настоящем документе, относятся к субъекту, нуждающемуся в профилактике или терапии болезненного состояния, связанного с патогенной инфекцией. В частности, лечение может заключаться во вмешательстве в патогенез болезненного состояния, при котором патоген является причинным агентом этого состояния.
20 Субъект может являться субъектом, подверженным риску такого болезненного состояния или страдающим от заболевания.

Термин «подверженный риску» определенного болезненного состояния относится к субъекту, у которого потенциально может развиваться такое болезненное состояние, например, из-за определенной предрасположенности,
25 контакта с патогеном или инфицированными патогеном субъектами; или который уже страдает от такого болезненного состояния на различных стадиях, в частности, связанного с другими причинными болезненными состояниями или другими состояниями или осложнениями, возникающими вследствие патогенной инфекции.

30 Термин «лечение» в настоящем документе всегда относится к лечению субъектов в профилактических (т. е. для предотвращения инфекции и/или болезненного состояния) или терапевтических (т. е. для лечения заболеваний, независимо от их патогенеза) целях. Препарат вакцины, описанный в настоящем документе, в частности, предназначен для активной иммунотерапии.

В частности, термин «профилактика» относится к профилактическим мерам, которые должны включать предотвращение начала патогенеза или профилактические меры для снижения риска патогенеза.

5 Термин «терапия», используемый в настоящем документе в отношении лечения субъектов, обозначает медицинское лечение субъекта с намерением вылечить, облегчить симптомы, стабилизировать, уменьшить частоту или предотвратить заболевание, патологическое состояние или нарушение, которые по отдельности или вместе понимаются как «болезненное состояние».

10 Вакцина, описанная в настоящем документе, в частности, содержит клетки шигеллы в эффективном количестве, которое в настоящем документе, в частности, понимается как «эффективное количество» или «иммунологически эффективное количество». Под «иммунологически эффективным количеством» подразумевается, что введение указанного количества субъекту, либо в однократной дозе, либо в составе серии доз, является эффективным с точки зрения терапевтических или профилактических целей лечения.

15 «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата, такого как предотвращение инфекции целевого патогена или ингибирование начала или прогрессирования заболевания, вызванного целевым патогеном. Это количество будет варьировать в зависимости от состояния здоровья и физического состояния субъекта, которого лечат, возраста, способности иммунной системы субъекта синтезировать антитела, типа и степени желаемого иммунного ответа, состава вакцины и других условий.

20

25 Эффективное количество или дозировка могут быть представлены в виде определенного количества колониеобразующих единиц (КОЕ), которое определяет количество жизнеспособных бактерий в препарате.

Термин «КОЕ» является аббревиатурой термина «колониобразующая единица» и используется в настоящем документе для количественной оценки числа жизнеспособных бактерий в препарате. Подсчет в колониеобразующих единицах требует культивирования микроорганизмов и подсчета только жизнеспособных клеток, в отличие от микроскопического исследования, при котором подсчитывают все клетки, живые или мертвые. Количество КОЕ обычно определяют по количеству клеток, присутствующих в образце, которые способны

30

давать начало колониям в конкретных условиях питательной среды, температуры и времени. Результаты в КОЕ могут быть получены методами микробиологического посева и подсчета. Как правило, серийные разведения бактериальной суспензии высевают на чашки с соответствующим агаром (например, LB-агар или TSA) и инкубируют в течение 16–24 часов при 37 °С. Затем колонии, образованные в соответствующих разведениях, подсчитывают, и полученное число, умноженное на коэффициент разведения, определяет концентрацию бактерий (т. е. КОЕ/мл) исходной бактериальной суспензии.

Препарат вакцины, описанный в настоящем документе, можно вводить в качестве высокодозного лечения субъекта в ходе активной иммунотерапии для предотвращения энтерального заболевания, в частности, дизентерии, вызванной шигеллой и, необязательно, гетерологичными энтеральными или диарейными патогенами. Это может быть достигнуто с помощью вакцины, описанной в настоящем документе, которая является перекрестно-протективной и/или поливалентной.

Например, эффективная дозировка способна вызывать у субъекта иммунный ответ с эффективными уровнями титра антител для связывания и нейтрализации целевого патогена, например, через 1–3 месяца после иммунизации. Эффективность может быть проанализирована по соответствующим титрам антител в образцах крови, взятых у субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество представляет собой количество, которое коррелировало с положительным эффектом при введении в рамках конкретного режима дозирования, например, однократного введения или серии введений, таких как введения в режиме «бустинга». Для лечения вакцину, описанную в настоящем документе, можно вводить сразу или можно разделить на отдельные компоненты и/или ряд меньших доз, которые следует вводить с определенными временными интервалами. Как правило, после праймирования субъекта первым введением вакцины, описанной в настоящем документе, одно или более бустерных введений могут быть выполнены в течение определенного периода времени посредством того же самого или других путей введения. При применении нескольких введений последующие введения могут быть осуществлены, например, в течение любого периода из 1, 2, 3, 4, 5, 6 дней; или в течение любого периода из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

или 8 недель; или в течение любого периода из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев (например, в течение 1–52 недель) после предыдущего введения.

Вакцина, описанная в настоящем документе, может содержать клетки шигеллы в фармацевтическом препарате, который необязательно имеет
5 иммуногенный состав. Конкретные варианты реализации изобретения включают фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества или носители.

Фармацевтические носители, подходящие для облегчения определенных способов введения, хорошо известны специалистам в данной области. Конкретные варианты реализации относятся к иммуногенным составам, которые
10 содержат фармацевтически приемлемый носитель и/или адъювант, которые вызывают гуморальный (В-клеточный, антительный) или цитотоксический (Т-клеточный) иммунный ответ. Адъюванты могут, в частности, применяться для повышения эффективности вакцины. Адъюванты могут быть добавлены непосредственно в вакцинную композицию или могут быть введены отдельно,
15 либо одновременно с вакцинным антигеном, либо незадолго до или вскоре после введения вакцинного антигена.

Используемый в настоящем документе термин «адъювант», в частности, относится к соединению, которое при введении в сочетании с антигеном усиливает и/или перенаправляет иммунный ответ на антиген, но при введении в одиночку не
20 вызывает иммунный ответ на антиген. Адъюванты могут усиливать иммунный ответ по нескольким механизмам, включая рекрутирование лимфоцитов, стимуляцию В- и/или Т-клеток и стимуляцию макрофагов.

Вакцина, описанная в настоящем документе, может быть составлена с применением известных способов составления ослабленных бактериальных
25 вакцин. Вакцина предпочтительно представлена в форме для перорального приема, например, в виде водного раствора или высушенного порошка для восстановления в подходящем буфере перед введением. Восстановление преимущественно осуществляют в буфере при подходящем значении рН для обеспечения жизнеспособности бактерий. Для защиты ослабленных бактерий и
30 вакцины от кислой среды желудка предпочтительно вводят защитный агент, такой как бикарбонат натрия, при каждом введении вакцины. В соответствии с другим вариантом, вакцина представлена в лиофилизированной инкапсулированной форме.

Вакцинные штаммы можно вводить в фармацевтически приемлемом носителе, например, в виде спрея или в смеси с пищевыми продуктами и/или водой, или доставлять в смеси с подходящим носителем, разбавителем, адъювантом или вспомогательным веществом, такими как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза или тому подобное. Вакцинные штаммы могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты для поддержания pH, адъюванты, гелеобразующие или улучшающие вязкость добавки, консерванты, ароматизирующие агенты, красители и т. п., в зависимости от пути введения и желаемого препарата. Фармацевтические носители для получения фармацевтических композиций и лекарственных средств хорошо известны специалистам в данной области, как изложено в таких учебниках, как «Remington's Pharmaceutical Sciences» (1990), 18th Edition (Mack Publishing Co.).

Фармацевтически приемлемые носители обычно включают любые и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, консерванты, такие как антибактериальные (в частности, агент, который не эффективен против шигелл) и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и тому подобное, которые физиологически совместимы с бактериальным препаратом, описанным в настоящем документе. Конкретные примеры фармацевтически приемлемых носителей включают стерильную воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол, полиэтиленгликоль и тому подобное, а также их комбинации. Дополнительные фармацевтически приемлемые носители известны специалистам в данной области и описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd revised edition (Allen Jr, LV, ed., Pharmaceutical Press, 2012). Жидкие лекарственные формы могут представлять собой растворы, эмульсии или суспензии и могут включать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие агенты, солюбилизаторы, поверхностно-активные вещества, консерванты и хелатообразующие агенты. Примерами носителей являются липосомы или катионные пептиды. В соответствии с конкретным примером, называемым в настоящем документе ShigETEC, лекарственная форма представляет собой концентрат живых бактерий в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 10 % ПЭГ-6000, для пероральной доставки, который может храниться и поставляться в замороженной форме.

Предпочтительный препарат находится в готовой к применению, стабильной при хранении форме, со сроком годности по меньшей мере один или два года. Настоящее изобретение также направлено на создание изделия для доставки, например, шприца, предварительно наполненного вакциной, описанной в настоящем документе.

Вакцину, описанную в настоящем документе, можно вводить обычными путями, известными в области знаний о вакцинах, например, нанесением на поверхность слизистой оболочки (например, слизистой глаза, внутренней части носа, ротовой полости, желудка, кишечника, прямой кишки) или посредством местного введения (например, через пластырь).

Вакцинные штаммы, описанные в настоящем документе, можно вводить в дозах и с применением способов, хорошо известных специалистам в области медицины или ветеринарии, принимая во внимание такие факторы, как возраст, пол, масса тела, биологический вид и состояние субъекта-реципиента и путь введения. Вакцинные штаммы могут быть введены отдельно или могут быть введены совместно или последовательно с другими лекарственными препаратами или видами лечения. Лекарственные формы для введения могут включать суспензии, сиропы или эликсиры, такие как стерильные суспензии или эмульсии.

Вышеприведенное описание будет более полно понято после ознакомления со следующими примерами. Такие примеры, однако, являются только примерами способов осуществления одного или более вариантов реализации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение вакцинного штамма ShigETEC

В качестве родительского штамма использовали полностью секвенированный штамм *Shigella flexneri* 2457T (номер доступа в Genbank: ADUV00000000.1), содержащий большую плазмиду инвазии около 200 т. п. н. (140 МДа) (Wei et al. Infect Immun 2003, 71, 2775-2786). Для генетических манипуляций применяли рекомбиназную систему Red (Datsenko and Wanner, Proc.

Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 6640-6645 (2000)). Для удаления определяющего серотип и доминантного антигена, что должно обеспечивать независимую от серотипа защиту, родительский штамм дикого типа был превращен в шероховатый, т. е. не имеющий экспрессии О-антигена ЛПС, путем делеции гена *rfbF* из хромосомы. С целью получения неинвазивного вакцинного штамма для перорального применения из плазмиды инвазии (ПИ) были удалены два гена, участвующие в функции системы секреции типа III, — *ipaB* и *ipaC*. Кроме того, для снижения риска реактогенности вакцины специфичный предполагаемый энтеротоксин штамма *S. flexneri* 2 — ShET-1, токсин AB₅, аналогичный холерному токсину и LT (Kotloff et al. 2004), тоже удалили путем делеции генов *setBA* из хромосомы, в результате чего также был устранен фактор вирулентности Pic, который кодируется в том же локусе на комплементарной цепи ДНК.

Чтобы обеспечить дополнительную эффективность вакцины в отношении ETEC, был сконструирован синтетический гибридный ген, который кодирует химерный гибридный токсин LTB-STm.

Аминокислотная последовательность гибридного токсина LTB-STm указана в SEQ ID NO: 12. Кодирующая нуклеотидная последовательность указана в SEQ ID NO: 13.

Субъединица LTB не токсична в отсутствие субъединицы LTA голотоксина LT, в то время как пептид ST токсичен по своей природе. По этой причине в ген ST была внесена мутация N12S. Было показано, что эта мутация устраняет токсичность ST при сохранении его антигенности (Taxt et al. Infect Immun 2016, 84, 1239–1249). Для обеспечения более высоких уровней экспрессии в ПВ встроили тройной тандем гена гибридного белка LTB-mST. Вставка была дополнена геном *infA*, однокопийным существенным геном (Cummings et al. J Bacteriol 1994, 176, 198-205), который впоследствии удалили из хромосомы для достижения стабилизации плазмиды инвазии (Schuch et al. Infect Immun 1997, 65, 3686–3692). Схематическая структура этой синтетической конструкции, а также последовательность токсина ST и линкерной области между LTB и токсином ST показана на Фиг. 1.

Полученный штамм обозначен *Shigella flexneri* 2457TΔ*rfbF*Δ*ipaBC*Δ*infA*Δ*setBA*::*infA*-3x[LTB-ST(N12S)], или ShigETEC. Чтобы продемонстрировать, что в штамме ShigETEC были успешно выполнены все

намеченные генетические манипуляции, все ожидаемые фенотипические изменения были подтверждены с помощью ПЦР и секвенирования.

Определение КОЕ

5 ShigETEC стандартно выращивают в триптическом соевом бульоне (TSB), промывают в PBS и концентрируют до требуемой КОЕ/мл в буфере для лекарственной формы. Замороженные запасы хранят при -80 °С.

Точную концентрацию вакцинного препарата в КОЕ определяют путем посева. Соответствующие разведения проводят в PBS. Выбор того, какие разведения приготовить и посеять, зависит от ожидаемого значения КОЕ
10 исходного материала. Для получения поддающегося подсчету количества бактериальных колоний, которое больше или равно 10 и меньше или равно 250, по 100 мкл по меньшей мере 3 разведений распределяют на чашках с TSA в двух повторностях. Например, для ожидаемого значения КОЕ можно проводить посев
15 следующих разведений:

Ожидаемое значение КОЕ	Разведения для посева		
1×10^9	5×10^4	1×10^5	2×10^5
1×10^{10}	5×10^5	1×10^6	2×10^6
5×10^{10}	2×10^6	5×10^6	1×10^7
2×10^{11}	5×10^6	1×10^7	2×10^7

Серийные разведения в стерильном PBS готовят в пробирках вместимостью 15 мл. Наименьший объем образца для разведения 1/10 составляет 500 мкл, которые добавляют к 4,5 мл среды для разведения. Для
20 разведения 1/10 добавляют 1 объем образца к 9 объемам разбавителя.

По 100 мкл соответствующего разведения образца высевают на чашку в двух или трех повторностях (по 2 или 3 чашки на разведение) и инкубируют при температуре 37 °С в течение периода от 16 до 24 часов. КОЕ (колонии, которые
25 появляются на чашках с агаром) подсчитывают на следующий день. Фактическую концентрацию исходного вакцинного препарата в КОЕ/мл определяют путем умножения среднего значения подсчитанных КОЕ на коэффициенты разведения.

Пример 2. Описание фенотипических характеристик ShigETEC

2.1. ShigEТЕС экспрессирует шероховатый липополисахарид

Полная потеря О-антигена в результате делеции *rfbF* была продемонстрирована по отсутствию в окрашенном серебром геле О-антигенной «лестницы», характерной для препаратов ЛПС из штаммов шигеллы дикого типа.

- 5 Отсутствие агглютинации вакцинных штаммов с сывороткой, типизирующей *Shigella flexneri*, подтвердило отсутствие экспрессии О-антигена.

2.2. ShigEТЕС является неинвазивным и невирулентным

Инвазия эпителиальных клеток человека является неотъемлемой характеристикой шигеллы и требует функции системы секреции типа III. Ожидается, что удаление *ipaB* и *ipaC* приведет к потере инвазивной способности ShigEТЕС. Это было подтверждено в анализе инвазии *in vitro* с использованием клеток HeLa (эпителиальных клеток человека). В то время как родительский штамм дикого типа был способен внедриться в клетки, ShigEТЕС полностью потерял свою инвазивную способность (Фиг. 2). Шероховатый мутант с одной мутацией, у которого отсутствует только *rfbF*, продемонстрировал инвазивность, схожую с инвазивностью штамма дикого типа. С другой стороны, обнаружено, что мутант с одной мутацией $\Delta ipaBC$ является полностью неинвазивным, таким же как ShigEТЕС. Эти данные ясно демонстрируют, что среди многочисленных мутаций в ShigEТЕС делеция *rfbF* не участвует в обеспечении неинвазивного фенотипа в этом анализе.

Тест Серени является золотым стандартом модели для оценки вирулентности штаммов шигеллы *in vivo*, широко применяемой для подтверждения ослабления перед клиническими испытаниями на добровольцах-людях (Serény, B. Acta Microbiol Acad Sci Hung 1955, 2, 293-296). Тест выполняют путем инокуляции в глаз морских свинок бактериальной суспензии с вирулентными штаммами шигеллы, вызывающими тяжелый кератоконъюнктивит. Чтобы проверить вирулентность ShigEТЕС в этой модели, проводили инокуляцию в глаз морских свинок ShigEТЕС или его родительского штамма дикого типа (*S. flexneri* 2a 2457T). Родительский штамм дикого типа вызвал кератоконъюнктивит с оценками степени тяжести, пропорциональными размеру инокулята, в то время как вакцинный штамм был полностью невирулентным даже при самом большом размере бактериального инокулята.

Таким образом, анализы *in vitro* и *in vivo* доказали неинвазивность и невирулентность ShigEТЕС. Это полностью соответствует ожиданиям из-за важной роли *IpaB* и *IpaC* в функции T3SS и инвазивности.

Методы. Инвазивность вакцинного штамма ShigEТЕС, а также изогенных мутантов с одной мутацией ($\Delta rfbF$ или $\Delta ipaBC$) оценивали *in vitro* с использованием эпителиальных клеток. Инвазивность сравнивали с таковой родительского штамма дикого типа 2457T. Клетки HeLa (ATCC, CCL-2) выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), с 10 % сывороткой эмбрионов крупного рогатого скота (FCS) в 24-луночных планшетах до полной конfluence. Клетки инфицировали штаммом дикого типа или вакцинным штаммом при множественности заражения (MOI) 80 в течение 1 ч при температуре 37 °С. После инкубации планшеты дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и уничтожали не проникшие в клетки бактерии с помощью гентамицина в концентрации 50 мкг/мл (30 мин при 37 °С/5 % CO₂). Клетки промывали 3 раза PBS и проводили лизис с помощью 1 % Тритона X-100. Количественную оценку бактерий проводили путем посева на чашки с триптическим соевым агаром (TSA). Процентную долю инвазивных (внутриклеточных) бактерий рассчитывали относительно количества бактерий в инокуляте, определяя путем посева на TSA.

В тесте Серени самкам морских свинок (в возрасте 4–5 месяцев, Charles River) инокулировали в левый глаз ShigEТЕС и в правый глаз его родительский штамм дикого типа (*S. flexneri* 2457T) с дозами бактерий 10⁶–10⁹ колониеобразующих единиц (КОЕ)/глаз (супендированными в 50 мкл PBS). Были проведены два идентичных независимых эксперимента с 4 животными каждый (всего 2 животных на дозу). Животных наблюдали в течение 6 дней после заражения и оценивали степень тяжести симптомов (слизисто-гнойный конъюнктивит и кератит) по шкале от 0 до 4.

Пример 3. ShigEТЕС экспрессирует антигены детоксицированного токсина EТЕС

30

Экспрессия гибридного белка LTB и ST(N12S) была продемонстрирована и количественно определена с помощью ИФА на основе связывания GM1 (т. е. рецептора LTB) с использованием лизатов культур ShigEТЕС, собранных на разных фазах роста. Гибридный токсин экспрессировался на всех фазах роста с

более высокой экспрессией при повышении концентрации бактерий (Фиг. 3а). Специфичность детектирования была показана с использованием лизатов из мутанта $\Delta rfbF\Delta ipaBC$, который не имел антигенного элемента химерного токсина (Фиг. 3а).

5 Полная детоксикация мутанта ST(N12S) была продемонстрирована по отсутствию индукции цГМФ в эпителиальных клетках человека T84 после воздействия супернатантов культур *E. coli*, экспрессирующих рекомбинантные ST дикого типа или ST(N12S) (Фиг. 3б).

Методы. Обнаружение экспрессии гибридного белка LTB-ST(N12S):
10 Цельноклеточные лизаты ShigEТЕС получали из культур, выращенных до значения $OD_{600\text{ нм}}$ 0,5, 2 или в течение ночи (O/N). Экспрессию гибридного белка LTB-ST(N12S) определяли с помощью связывания с GM1. На планшетах для ИФА иммобилизовали по 10 мкг GM1 (Sigma-Aldrich) на лунку при 4 °C O/N. Планшеты блокировали 2 % бычьим сывороточным альбумином (BSA, Fisher Scientific) в
15 течение 1 ч при комнатной температуре (RT). Рекомбинантный LTB (Sigma-Aldrich) использовали в серийных разведениях в качестве положительного контроля. Лизат шероховатого неинвазивного мутанта шигеллы ($\Delta rfbF\Delta ipaBC$), не содержавшего конструкцию LTB-ST(N12S), использовали в качестве отрицательного контроля. Лизаты и контроли инкубировали на планшетах и
20 проводили обнаружение связанного LTB с помощью конъюгированного с HRP кроличьего поликлонального антитела к субъединице В холерного токсина (СТВ) (Fisher Scientific) и субстрата ABTS (Fisher Scientific).

**Пример 4. Вакцинация ShigEТЕС обеспечивает серотип-независимую
25 защиту от заражения шигеллами**

Из-за отсутствия соответствующих моделей диареи у мелких лабораторных животных эффективность вакцин против шигелл обычно оценивают в модели шигеллеза в легких мыши (Van de Verg et al. Infect Immun 1995, 63, 1947–1954).
30 Вакцинный потенциал ShigEТЕС был протестирован в этой модели при интраназальной иммунизации мышей три раза с двухнедельными интервалами. Через четыре недели после последней иммунизации животные были интраназально инфицированы летальными дозами штаммов шигеллы дикого типа — *S. flexneri* 6 или *S. sonnei* (минимальные летальные дозы были

определены в пилотных исследованиях, данные не показаны). Вакцинация ShigETEC приводила к 100 % защите от обоих этих штаммов с гетерологичными серотипами (Фиг. 4).

Методы. Для измерения эффективности вакцины ShigETEC группы из пяти
5 6-недельных самок мышей линии BALB/c (Charles River) вакцинировали 3 раза в
две недели интраназально (и/н) штаммом ShigETEC (бактериальная суспензия с
 10^8 КОЕ в 50 мкл PBS/животное). Через четыре недели после последней
вакцинации мышам вводили минимальные летальные дозы *Shigella sonnei* #598
(9×10^6 КОЕ) или *Shigella flexneri* 6 #542 ($1,2 \times 10^7$ КОЕ). Используемые
10 минимальные летальные дозы определяли титрованием в пилотных
экспериментах. Выживаемость контролировали в течение 14 дней после
заражения.

Пример 5. Вакцинация ShigETEC индуцирует системные и 15 мукозальные антительные ответы против шигеллы и токсинов ETEC

Антительный ответ на вакцинацию ShigETEC оценивали у мышей после 1-,
2- или 3-кратной интраназальной иммунизации. Для оценки системных
антительных ответов против шигеллы и антигенов ETEC — LTB и ST — измеряли
20 сывороточные уровни антитела IgG с помощью ИФА. Уровни IgG к лизату
ShigETEC поддавались обнаружению уже после первой вакцинации и повышались
с увеличением количества вакцинаций (Фиг. 5а, левая панель). Антитела к LTB и
ST поддавались обнаружению только после двух вакцинаций и с большой
вариабельностью между отдельными животными (Фиг. 5а, средняя и правая
25 панели). Уровни антител IgG к ST были ожидаемо низкими, однако были явно
индуцированы после 3 иммунизаций: у 44 % животных уровни выросли в 4 раза и
у 83 % животных уровни выросли в 2 раза относительно индивидуальных
значений пред иммунизацией.

Бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) собирали у животных после
30 трехкратной интраназальной иммунизации и через 2 недели после последующего
заражения гетерологичными штаммами шигелл. Также было проведено
обнаружение мукозальных антительных ответов: антител IgA к шигелле, LTB и ST.
В БАЛ имелись поддающиеся обнаружению уровни антител IgA к ShigETEC и LTB,
что указывает на специфичный адаптивный ответ (Фиг. 5b).

- Методы.** Для мониторинга индуцированных ShigEТЕС системных ответов IgG и мукозальных ответов IgA мышей вакцинировали 3 раза и/н 10^8 КОЕ вакцинного штамма и брали сыворотку через две недели после первой и второй вакцинации и через четыре недели после последней иммунизации.
- 5 Бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) выполняли через 14 дней после заражения. Уровни специфичных антител IgG и IgA измеряли в сыворотках или БАЛ соответственно, используя лизат ShigEТЕС (полученный из культур ShigEТЕС 1×10^7 КОЕ/лунку, инкубированных в течение ночи) или рекомбинантный LTB (Sigma-Aldrich, 100 нг/лунку), иммобилизованный на планшетах для ИФА.
- 10 Биотинилированный ST (синтезированный компанией PepScan) наносили при 100 нг/лунку на планшеты с предварительно иммобилизованным на них стрептавидином (Fisher Scientific). IgG обнаруживали с помощью пероксидазы, конъюгированной с F(ab')₂-фрагментом AffiniPure козьего антитела к мышинному IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch), а IgA обнаруживали с помощью
- 15 пероксидазы, конъюгированной с козьим антителом к мышинному IgA (Sigma-Aldrich), и субстрата ABTS (Fisher Scientific).

Пример 6. Вакцинация ShigEТЕС индуцирует нейтрализацию антител к токсину EТЕС

- 20
- Чтобы обеспечить защиту от EТЕС, вакцина должна вызывать образование антител к LT и ST, способных нейтрализовать токсин. После 3-кратной интраназальной иммунизации ShigEТЕС наблюдалась индукция образования IgG к LTB и ST в сыворотке. Способность индуцированных вакциной антител
- 25 блокировать связывание LT с его рецептором GM1 проверяли в бесклеточном анализе на основе ИФА. Наблюдалось ингибирование, зависящее от концентрации сыворотки и LT (Фиг. 6a). Антитела в сыворотке также были способны ингибировать индуцируемое LT высвобождение цАМФ из
- 30 эпителиальных клеток толстой кишки человека T84 (Фиг. 6b). Чтобы доказать, что гибридный белок LTB-ST(N12S), экспрессируемый ShigEТЕС (Фиг. 3a), потенциально способен повышать уровни нейтрализующих антител к ST, провели парентеральную вакцинацию рекомбинантными гибридными белками LTB-ST(N12S) или LTB-ST (с ST дикого типа), которые индуцировали высокие уровни IgG к ST в сыворотке. Эти сывороточные антитела могли полностью

нейтрализовать индуцируемое ST высвобождение цГМФ в эпителиальных клетках толстой кишки человека T84 (Фиг. 6с). Антитела, выработанные к LTB-ST(N12S), были способны нейтрализовать ST дикого типа таким же образом, как антитела, выработанные к LTB-ST дикого типа; это подтверждает, что антитела, выработанные к мутантному ST, могут функционально нейтрализовать ST дикого типа из ETEC. Эти данные подтверждают, что гибридный белок LTB-ST(N12S), экспрессируемый с плазмиды инвазии штамма ShigEТЕC, может индуцировать антительный ответ, способный эффективно нейтрализовать как LT, так и ST из EТЕC.

5
10 **Методы.** Анализ нейтрализации LT на основе ИФА: сыворотку от мышей, вакцинированных три раза штаммом ShigEТЕC и/н, инкубировали в 2-, 10- и 50-кратном разведении с 10, 25, 50 или 100 нг LT. Количество LT, который оставался свободным от связывания с антителами, измеряли на планшетах для ИФА с иммобилизованным GM1, как описано выше, используя для обнаружения
15 антитела к холерному токсину бета.

Клеточный анализ нейтрализации LT и ST: эпителиальные клетки толстой кишки человека T84 (ATCC) высевали в 24-луночные планшеты в 1 мл DMEM/F12 (5 % FCS, пенициллин/стрептомицин (P/S)) и выращивали до полной конfluence. За один день до эксперимента провели смену среды. Клетки
20 промыли 3 раза средой (DMEM/F12 без FCS, P/S) и предварительно инкубировали со средой, содержащей 1 мМ 3-3-изобутил-1-метилксантин (IBMX, Sigma-Aldrich). По 5 нг рекомбинантного LT или синтетического ST (PepScan) предварительно инкубировали с сывороткой от мышей, вакцинированных носителем или ShigEТЕC (объединенные пулы от особей с высокими титрами LTB после 3-кратной и/н
25 иммунизации или объединенные пулы от особей с высокими титрами ST после 3-кратной интраперитонеальной (и/п) вакцинации 200 мкг рекомбинантного белка LTB-ST(N12S)). После предварительной инкубации токсина и сыворотки смесь переносили к клеткам T84 и инкубировали при 37 °C (5 % CO₂) в течение 3 ч. Супернатанты удаляли и лизировали клетки 0,1 М HCl/1 % Triton X-100 при
30 комнатной температуре. Клеточные лизаты центрифугировали и оценивали супернатанты на наличие LT-индуцированного цАМФ или ST-индуцированного цГМФ с использованием наборов для прямого определения цАМФ или цГМФ методом ИФА (Enzo Life Sciences) соответственно, следуя инструкциям производителя.

Экспрессия мутантных форм ST в *Escherichia coli*

Получение конструкций: конструкцию рЕТ24а(+)-pre-pro-ST получали путем амплификации гена pre-pro-ST из штамма ETEC H10407 с использованием праймеров NdeI-ST-prev (5'-CCCCGATATACATATGAAAAAATC-3' (SEQ ID NO: 22)) и ST-BamHI-pfw (5'-TCGCGGATCCTTAATAGCACCCGGTAC-3' (SEQ ID NO: 23)) и вставки его в экспрессионный вектор рЕТ24а (+) между сайтами рестрикции BamHI и NdeI. рЕТ24а(+)-pre-pro-ST(N12S) получали посредством сайт-направленного мутагенеза вектора рЕТ24а(+)-ST, используя праймеры ST-Mut-P-fw (5'-AAGCAGGagaACAACACAATTTCAC-3' (SEQ ID NO: 24) и ST-Mut-P-rev (5'-GTACCGGGTGCTATTAAGGATC-3' (SEQ ID NO: 25)). Последовательности ST в векторах подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру. Обоими векторами, а также пустым вектором рЕТ24а (+) далее трансформировали клетки для экспрессии DE3-Tuner. Экспрессия пептидов ST и ST(N12S): ночные культуры клеток DE3-Tuner с векторами рЕТ24а(+), рЕТ24а (+)-pre-pro-ST или рЕТ24а(+)-pre-pro-ST(N12S) разбавляли и выращивали до OD_{600 нм} 1 при 37 ° С при 200 об/мин в среде RPMI, содержащей 1 % казаминовых кислот и 25 мкг/мл канамицина. Затем индуцировали экспрессию пептидов с использованием 1 мМ IPTG при 37 °С в течение 4 часов при 250 об/мин. Клетки центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин, культуральный супернатант собирали и фильтровали с использованием стерильного целлюлозно-ацетатного фильтра с порами 0,2 мкм.

Проверка экспрессии пептида ST и детоксикация пептида ST(N12S): эпителиальные клетки толстой кишки человека T84 (ATCC) высевали в 24-луночные планшеты в 1 мл DMEM/F12 (5 % FCS, пенициллин/стрептомицин (P/S)) и выращивали до полной конfluence. За один день до эксперимента провели смену среды. Клетки промывали 3 раза средой (DMEM/F12 без FCS, P/S) и предварительно инкубировали со средой, содержащей 1 мМ IBMX. Делали разведения синтетического ST (PepScan) с содержанием 100 нг, 25 нг и 5 нг в DMEM/F12 и инкубировали над клетками T84 при 37 °С/5 % CO₂ в течение 1 ч. Кроме того, провели испытание отфильтрованных культуральных супернатантов из культуры клеток *E. coli* после экспрессии пептида ST или ST(N12S) при 200 мкл/лунку. После инкубации супернатанты удаляли и лизировали клетки в 0,1 М HCl/1 % Triton X-100. Клеточные лизаты центрифугировали и супернатанты оценивали на предмет индукции цГМФ с помощью прямого ИФА для детекции цГМФ (Enzo Life Sciences), следуя инструкциям производителя.

Пример 7. Переносимость ShigEТЕС

Для оценки безопасности и переносимости высоких доз вакцинного штамма ShigEТЕС было проведено плацебо-контролируемое двойное слепое клиническое исследование 1-й фазы с участием 84 здоровых взрослых (18–45 лет). Основным критерием эффективности была оценка местных и системных реакций с акцентом на желудочно-кишечные симптомы, связанные с инфекцией шигеллы. Отдельно оценивали краткосрочную безопасность (дни с 1-го по 6-й после иммунизации) и общую безопасность (с 7-го дня по 60-й день после иммунизации). Было обнаружено, что однократные дозы 1×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} и 2×10^{11} КОЕ, а также многократные дозы (вводимые 2, 3 и 4 раза с 3-дневными интервалами) 5×10^{10} КОЕ, как правило, безопасны и хорошо переносятся. Пероральный прием вакцины ShigEТЕС в высоких дозах не вызвал новых выявленных проблем с безопасностью, и не было значимых изменений в ранее выявленном профиле безопасности, связанных с ожидаемыми симптомами и/или нежелательными реакциями. Всего было отмечено 25 нежелательных явлений. В исследовании было зарегистрировано 14 случаев реактогенности и 11 других нежелательных явлений, все из которых были классифицированы как легкие или умеренные. Все они разрешились к концу исследования. Ни у одного из участников не было никаких отклонений результатов лабораторных анализов от нормы, связанных с вакциной, в целом в исследовании не сообщалось о каких-либо серьезных нежелательных явлениях (СНЯ) и отсутствовало ухудшение какого-либо медицинского состояния, присутствовавшего при скрининге, в течение 60 дней после последней дозы вакцины.

Специфическое описание явлений реактогенности: в общей сложности четырнадцать явлений были признаны связанными с вакциной и оценены как проявления реактогенности. Тринадцать случаев были зарегистрированы как легкие, один — как умеренный, и все явления вернулись к исходному состоянию/разрешились. На стадии 1 (введение однократной дозы) самая высокая доза 2×10^{11} КОЕ была ассоциирована с легкими и преходящими желудочно-кишечными симптомами у 2 из 8 реципиентов вакцины. У одного участника наблюдались диарея и тошнота, а у второго была рвота. Ни у одного из реципиентов вакцины не было признаков шигеллеза. На стадии 2 (многократное

введение максимально переносимой дозы: 5×10^{10} КОЕ) вакцина хорошо переносилась при всех трех режимах многодозовой терапии (2-, 3-, 4 раза).

В группе с двумя дозами один из 8 реципиентов вакцины сообщил о тошноте в день вакцинации. В трехдозовой группе было зарегистрировано в сумме пять
5 явлений реактогенности, все в день вакцинации. У одного участника было зарегистрировано четыре явления (тошнота и рвота, по два раза каждое). Другой участник сообщил о рвоте один раз.

В группе с четырьмя дозами только у одного участника наблюдались явления реактогенности: рвота в дни вакцинации в случае всех четырех доз и
10 диарея через один день после последней вакцинации. Как на стадии 1, так и на стадии 2 все явления реактогенности разрешались в течение одного дня. Нежелательных явлений реактогенности в группах плацебо не наблюдалось.

Специфическое описание явлений, не связанных с реактогенностью:
произошло одиннадцать явлений, не связанных с реактогенностью. Было
15 зарегистрировано шесть нежелательных явлений, не связанных с реактогенностью, на стадии I и пять на стадии II. Девять из них были оценены как легкие, два как умеренные и ни одного как тяжелые. Все явления были признаны не связанными с вакциной, и все они вернулись к исходному состоянию/разрешились к концу исследования.

20 Серьезных нежелательных явлений или тяжелых нежелательных явлений в ходе исследования не наблюдалось. Кроме того, не сообщалось об ухудшении анамнеза.

Методы. В этом исследовании безопасности и иммуногенности 1-й фазы использовали двойной слепой плацебо-контролируемый дизайн и проводили
25 исследование в две стадии. На стадии 1 в общей сложности 48 субъектов (2 реципиента вакцины на каждого реципиента плацебо) были последовательно включены в 4 различные группы с повышающимися дозами (по 12 субъектов на группу) для получения одной пероральной дозы вакцины ShigETEC, начиная с дозы в первой группе 1×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) вакцины или
30 плацебо. В каждую дозовую группу до включения в эту группу остальных субъектов были набраны по два сигнальных субъекта (один для получения вакцины и один для получения плацебо). При условии, что в течение 6 дней последующего наблюдения за сигнальными субъектами не было выявлено соответствия никаким правилам остановки исследования (согласно оценке, проведенной комитетом по

научно-исследовательской деятельности (SRC)), осуществляли набор в эту группу остальной части субъектов и введение им вакцины. При условии, что в течение 6 дней последующего наблюдения за всей этой группой не было выявлено соответствия никаким правилам остановки исследования (согласно оценке, проведенной SRC), проводили набор в следующую группу, и так до тех пор, пока все 4 группы не были набраны и прошли оценку течение 6 дней. Стадию 1 проводили в условиях стационара в одном заведении вплоть до Дня 6. Субъекты в каждой группе были выписаны для амбулаторного последующего наблюдения через 6 дней после введения дозы (7 дней в больнице), если у них не наблюдалось симптомов шигеллезоподобного заболевания. Любому субъекту с симптоматическим заболеванием должны были провести лечение с соответствующим курсом антибиотика на момент выписки. Все субъекты предоставляли образцы стула (по возможности один раз в день), которые тестировали на присутствие вакцины ShigEPEC, до тех пор, пока результаты по меньшей мере 2 последовательных образцов не были отрицательными. Если выделение микроорганизма сохранялось в течение 14 дней, то субъекту должны были провести лечение антибиотиками независимо от какой-либо симптоматики. Все субъекты наблюдались в течение 60 дней после иммунизации для сбора информации о нежелательных явлениях и образцов крови.

По результатам проведенного DSMB (комитетом по мониторингу данных по безопасности) обзора данных по безопасности стадии 1 было заявлено, что исследование может перейти к стадии 2, и была определена оптимальная доза вакцины (OVD) для ShigEPEC; стадия 2 исследования началась как амбулаторное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование. На этой стадии в общей сложности 36 субъектов (2 реципиента вакцины на каждого реципиента плацебо) были включены в 3 разные группы (по 12 субъектов на группу). На основании данных стадии 1 и рекомендаций DSMB для стадии 2 была выбрана доза вакцины 5×10^{10} КОЕ (2, 3 или 4 дозы). Как отмечалось для стадии 1, переход от одного режима дозирования к другому зависел от удовлетворительной оценки безопасности предыдущего режима дозирования, проводимой с использованием тех же параметров безопасности, которые применяли на стадии 1. Выбор интервала между дозами делали на основании результатов анализа продолжительности выделения микроорганизмов у субъектов на стадии 1, чтобы вводить дозы в конце или ближе к концу цикла выделения микроорганизмов.

Требования к параметрам безопасности были соблюдены, что подтвердил DSMB, путем анализа данных по безопасности и выделению микроорганизмов при каждой из доз иммунизации на стадии 1 были определены оптимальные доза и график введения ShigETEC, и для стадии 2 был выбран интервал между дозами 3 дня (например, введение доз в дни 1, 4, 7 и 10 в случае четырех доз). Стадию 2 проводили в амбулаторных условиях.

Нежелательные явления определялись в соответствии с руководством ICH-GCP. Система оценки основана на Общих терминологических критериях для нежелательных явлений (CTCAE) вер. 5.0, опубликованных 27 ноября 2017 года.

Что касается оценки ранней реактогенности/переносимости, конкретный список признаков и симптомов оценивали у участника через 2 часа после иммунизации и ежедневно во время пребывания в стационаре на стадии 1 в течение 6 дней после иммунизации. На стадии 2 этот список признаков и симптомов оценивали у каждого участника через 2 часа после иммунизации перед выпиской из клиники, а затем оценку проводили сами участники, используя дневник-памятку, в течение 6 дней после последней дозы вакцины. Список признаков и симптомов, подлежащих оценке, включал: тошноту/рвоту, диарею, боль в животе, потерю аппетита, головную боль, усталость, миалгию, заболевание или нежелательное явление с клиническими проявлениями (как определено в соответствии с применимыми правилами).

Окно отчетности по безопасности определяли как период, начинающийся в день иммунизации и продолжающийся вплоть до истечения 60 дней после последней дозы вакцины/плацебо, полученной участником.

В отсутствие нерешившихся нежелательных явлений (НЯ) для стадии 1 этот период составлял 60 дней после иммунизации, поскольку каждому участнику была введена только одна доза. Аналогичным образом, для стадии 2 этот период варьировался в зависимости от группы и интервала между введениями доз. Как минимум, этот интервал длился от 92 дней до 110 дней.

Все нежелательные явления разрешились в течение заданного периода последующего наблюдения. Случаев выбывания из исследования из-за нежелательных явлений не было.

Краткосрочная безопасность определялась как специфические явления, связанные с острыми желудочно-кишечными и системными симптомами заболевания в дни с 1 по 6 после иммунизации (-й), включая тошноту, рвоту,

диарею, боль в животе, лихорадку, боль в мышцах/суставах, усталость/недомогание, головную боль, потерю аппетита.

5 Реактогенность определяли как количество и долю ожидаемых признаков и симптомов краткосрочного периода безопасности вместе с соответствующими степенями токсичности. Явления реактогенности на стадии 1 регистрировались персоналом исследовательского центра во время стационарной фазы исследования. Явления реактогенности на стадии 2 регистрировались в дневнике-памятке участниками по месту жительства (амбулаторно) и проверялись на День 10 персоналом исследования для записи в базу данных. Непредвиденные 10 явления во время изучения краткосрочной безопасности регистрируются как нежелательные явления (НЯ).

Пример 8. Иммуногенность высоких доз ShigEТЕС у добровольных участников

15 Иммуный ответ вакцинированных оценивали по образцам сыворотки, полученным в разных временных точках после последней иммунизации (день 6, день 10 и день 28). Иммунореактивность измеряли методом ИФА в отношении лизированного вакцинного штамма, а также LТВ, чтобы оценить ответ на антигены шигеллы, а также на гетерологично экспрессируемый гибридный токсоидный 20 белок ЕТЕС соответственно. Значимым считалось более чем 4-кратное увеличение показателя в любой временной точке для постиммунной сыворотки по сравнению с соответствующими преиммунными образцами сыворотки. Количество сероконвертированных лиц (в скобках указана процентная доля) в 25 различных когортах вакцинации приведено в сводном виде в таблице 1.

Частоты сероконверсии и количества антител демонстрировали тенденцию к увеличению пропорционально дозе вакцины (на стадии 1), а также количеству полученных доз вакцины (на стадии 2) (таблица 1, Фиг. 8). Для когорт с 1×10^9 и 1×10^{10} КОЕ не наблюдалось увеличения СГТ (среднее геометрическое титра) на 30 уровне группы; увеличение СГТ отмечено только для двух более высоких доз (5×10^{10} и 2×10^{11} КОЕ) при однократном применении вакцины (Фиг. 8А). При многократном введении вакцины (в дозе 5×10^{10} каждая) было обнаружено увеличение СГТ, пропорциональное количеству иммунизаций (Фиг. 5В).

При однократной иммунизации иммунный ответ на LTB был обнаружен только при самой высокой дозе вакцинации (2×10^{11}). В случае многократной вакцинации дозами 5×10^{10} КОЕ каждая не удалось обнаружить значимый ответ (т. е. 4-кратное увеличение относительно исходного уровня) на LTB при введении до 3 иммунизаций. Однако в когорте, получающей 4 дозы вакцины, у 50 % вакцинированных (4 из 8) наблюдалась сероконверсия в ответ на этот антиген. Это говорит о том, что для получения антительного ответа на гетерологичный (-е) антиген (-ы) требуется высокая доза вакцинного штамма, предпочтительно вводимая несколько раз.

10

Таблица 1. Количество (процентная доля) вакцинированных в разных когортах, которые показали > 4-кратную сероконверсию при анализе с лизатом ShigETEC

	Группа	Доза	Кол-во доз	Кол-во (%) субъектов с по меньшей мере 4-кратным повышением
	плацебо	-	от 1 до 4	0/28 (0 %)
Стадия 1	1A	1×10^9	1	0/8 (0 %)
	1B	1×10^{10}	1	1/8 (12,5 %)
	1C	5×10^{10}	1	7/8 (87,5 %)
	1D	2×10^{11}	1	7/8 (87,5 %)
Стадия 2	2A	5×10^{10}	2	6/8 (75 %)
	2B	5×10^{10}	3	7/8 (87,5 %)
	2C	5×10^{10}	4	8/8 (100 %)

15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Препарат вакцины против шигелл, содержащий 10^8 – 10^{12} КОЕ живого генетически ослабленного штамма *Shigella flexneri*, который содержит хромосомную делецию *setBA* и является неинвазивным, что определено с помощью теста Серени и анализа инвазии *in vitro* с использованием клеток HeLa, причем указанный штамм содержит эндогенную плазмиду инвазии, в которую методами генной инженерии включена гетерологичная экспрессионная конструкция, экспрессирующая патоген-специфичный антиген.

10

2. Препарат вакцины по п. 1, отличающийся тем, что штамм *Shigella flexneri* представляет собой штамм *Shigella flexneri 2a* или штамм *Shigella flexneri 2b*.

3. Препарат вакцины по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанная эндогенная плаزمиды инвазии кодирует систему секреции типа III (Т3SS), инактивированную посредством генетической модификации плазмиды инвазии, предпочтительно при этом указанная генетическая модификация включает делецию или инактивацию одного или более генов, экспрессирующих компоненты Т3SS.

20

4. Препарат вакцины по любому из пп. 1–3, отличающийся тем, что указанный патоген-специфичный антиген выбран из группы, состоящей из бактериального антигена, вирусного антигена, грибкового антигена и паразитарного антигена.

25

5. Вакцина по любому из пп. 1–4, отличающаяся тем, что патоген-специфичный антиген состоит из гибрида субъединицы В термолабильного токсина (LTB) и мутированного термостабильного токсина (STm) энтеротоксигенной *Escherichia coli* (ETEC).

30

6. Вакцина по п. 5, где

а) LTB содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 3; и

b) STm содержит или состоит из любой из SEQ ID NO: 1, 4, 5, 6, 7, 8 или 9.

5 7. Вакцина по любому из пп. 1–6, отличающаяся тем, что указанная гетерологичная экспрессионная конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере два или по меньшей мере три из указанных антигенов.

10 8. Вакцина по любому из пп. 1–7, отличающаяся тем, что эндогенная плаزمиды инвазии содержит генетическую модификацию для включения существенного для шигелл гена, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из *infA*, *ppa*, *accD*, *acpS*, *dapE*, *era*, *frr*, *ftsI*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsZ*, *Igt*, *IpxC*, *msbA*, *murA*, *murl*, *nadE*, *parC*, *proS*, *pyrB*, *rpsB*, *trmA*, *rho* и *rhoL*, предпочтительно при этом существенный ген шигелл вставлен в единый блок с гетерологичной экспрессионной конструкцией, экспрессирующей патоген-специфичный антиген.

15 9. Вакцина по любому из пп. 1–8, отличающаяся тем, что штамм *Shigella flexneri* имеет шероховатый фенотип благодаря хромосомной делеции одного или более эндогенных генов, уменьшающей количество О-антигенов ЛПС по сравнению с таким же штаммом без хромосомной делеции, предпочтительно при этом эндогенные гены выбраны из группы, состоящей из генов кластера генов *rfb/wbb*, генов кластера генов *rfa/waa*, *wzx*, *wzy/rfc* и *rfaH*.

25 10. Вакцина по любому из пп. 1–9, отличающаяся тем, что штамм *Shigella flexneri* характеризуется генотипом *Shigella flexneri* 2457TΔ*rfbFDipaBCΔinfAΔsetBA::infA-3x[LTB-ST(N12S)]*.

30 11. Вакцина по любому из пп. 1–10, отличающаяся тем, что штамм *Shigella flexneri* представлен в фармацевтическом препарате, включающем пероральный или мукозальный состав, предпочтительно в форме жидкости, порошка или таблетки.

12. Вакцина по любому из пп. 1–11 для применения в лечении субъекта для индуцирования иммунного ответа против инфекции, вызываемой шигеллами,

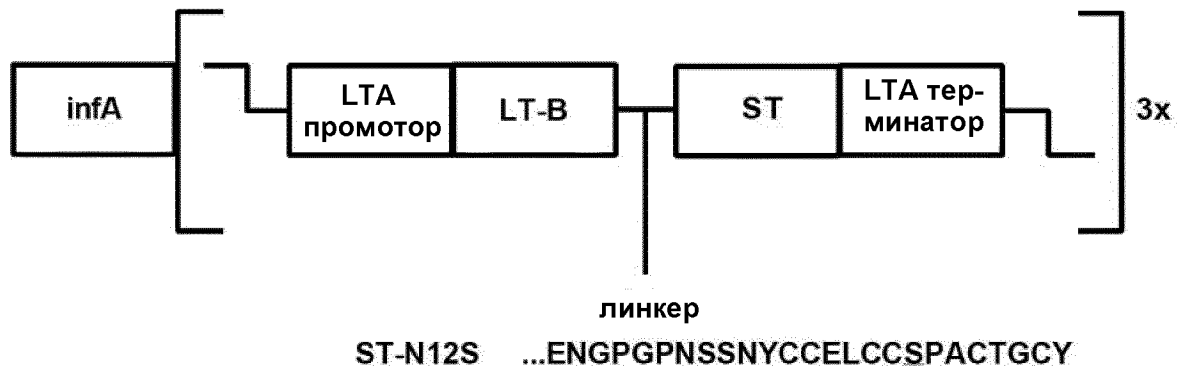
предпочтительно любым одним или более из штаммов *S. flexneri*, *S. sonnei*,
S. dysenteriae и *S. boydii*.

5 13. Вакцина по любому из пп. 1–11 для применения в лечении субъекта для
индукции иммунного ответа против патогена, для которого специфичен указанный
патоген-специфичный антиген.

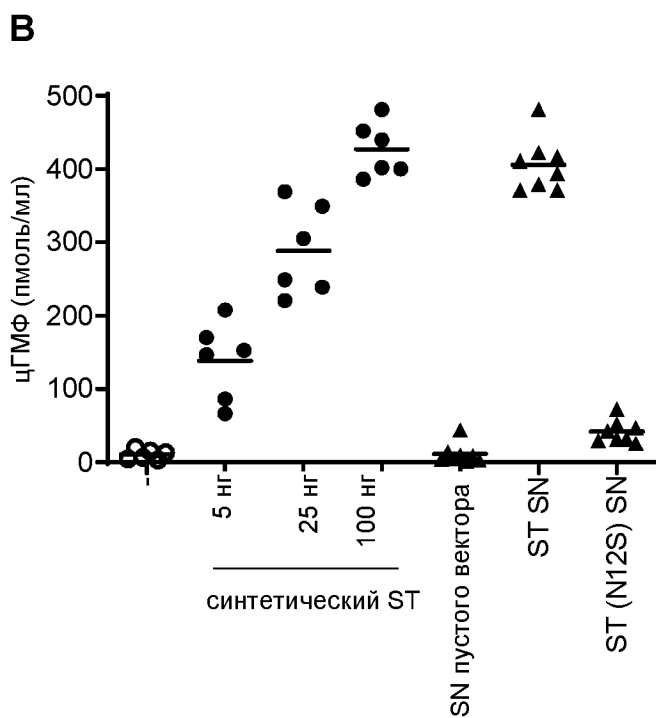
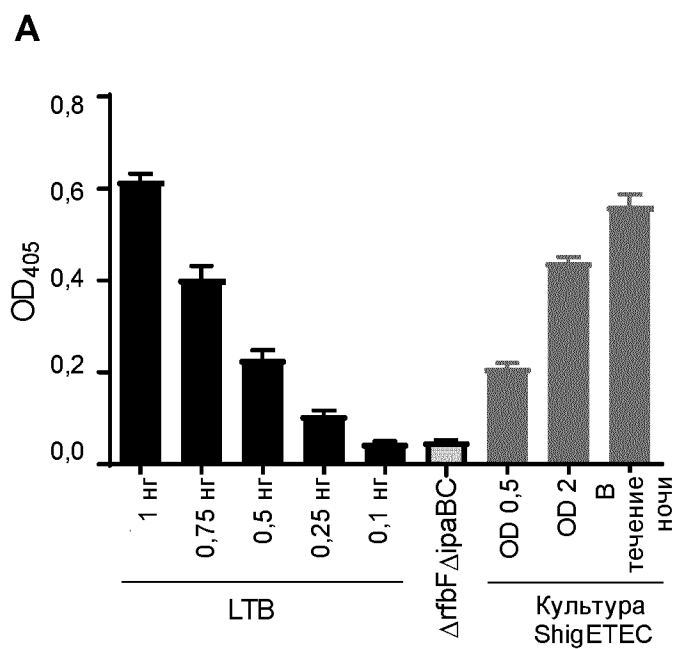
10 14. Вакцина для применения по п. 12 или 13, причем указанное лечение
индуцирует сывороточный, мукозальный и/или фекальный иммунный ответ,
предпочтительно индуцируя специфичные антитела IgA, IgG и/или IgM.

15. Вакцина для применения по любому из пп. 12–14, где вакцину вводят
перорально, интраназально или сублингвальным или внутрижелудочным путем.

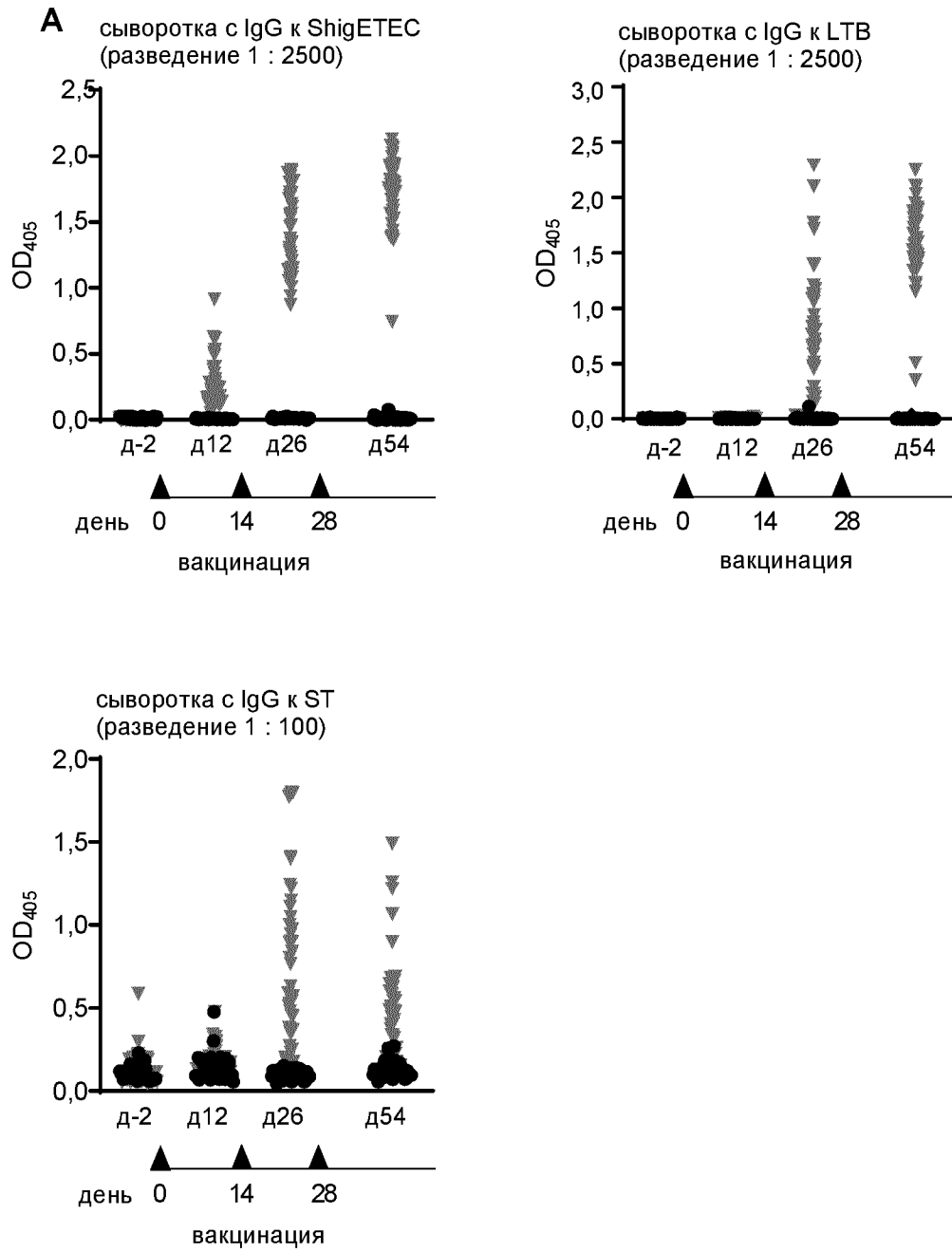
Фиг. 1



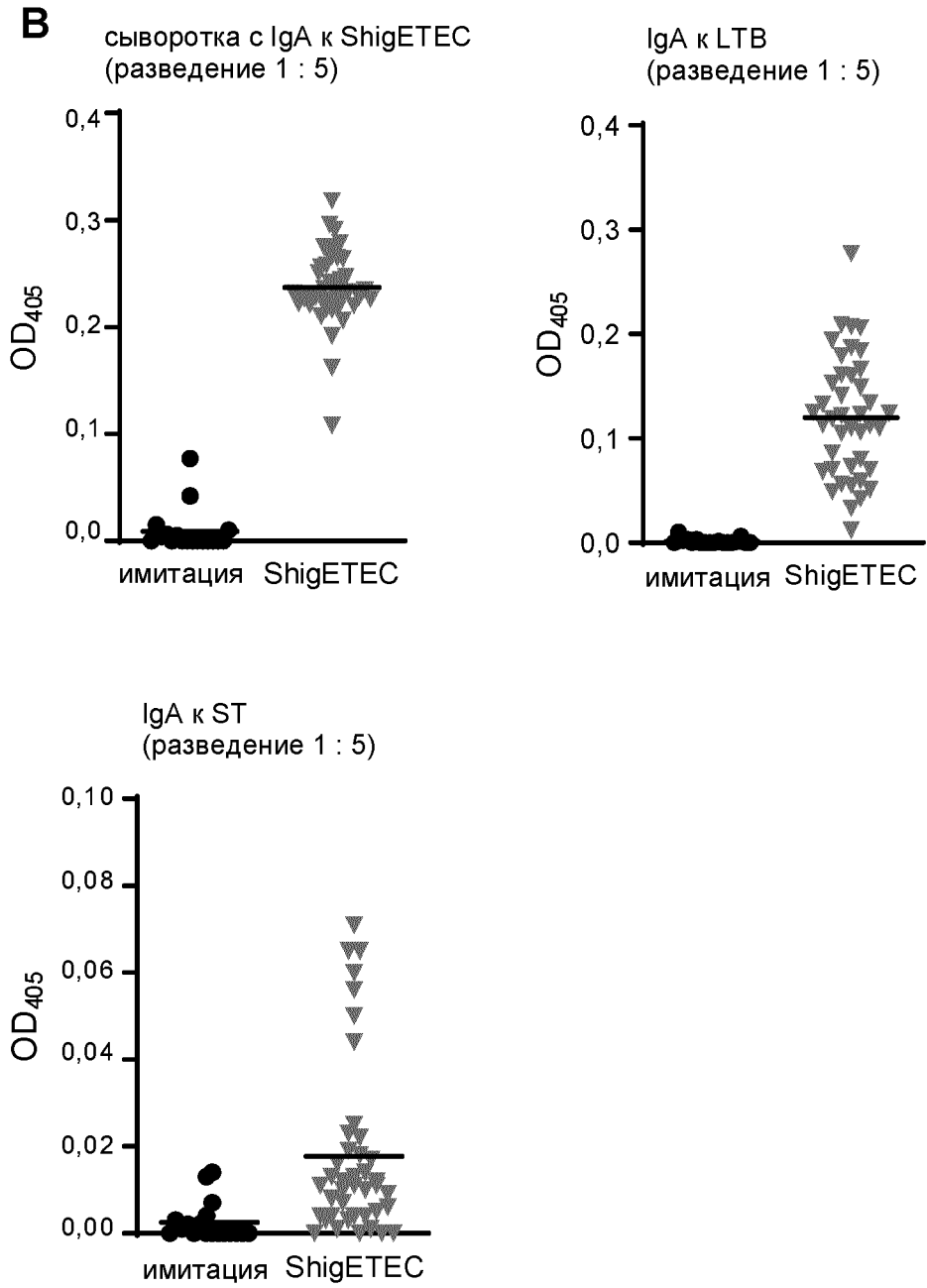
Фиг. 3



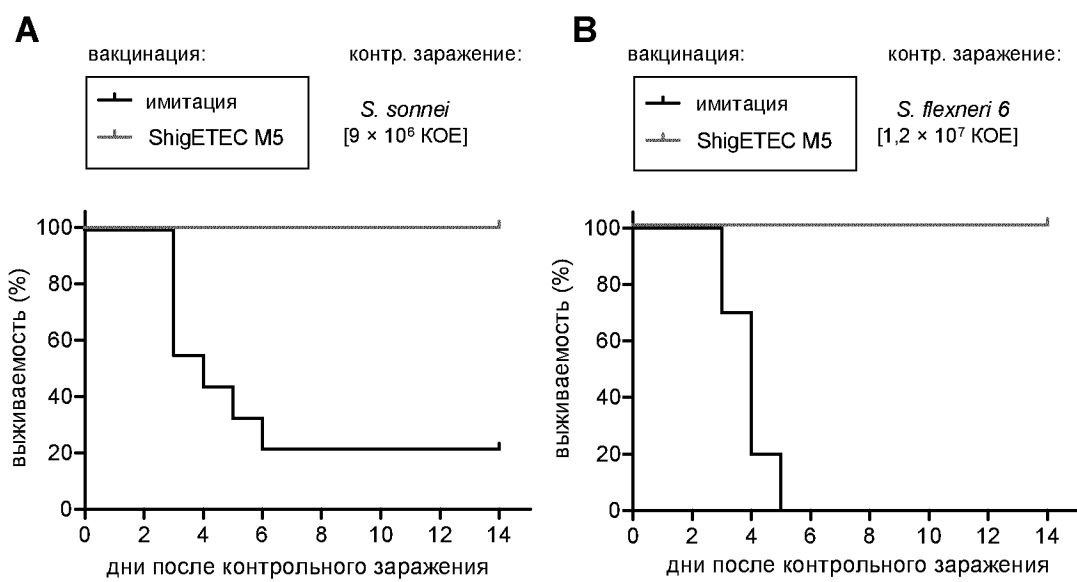
Фиг. 4



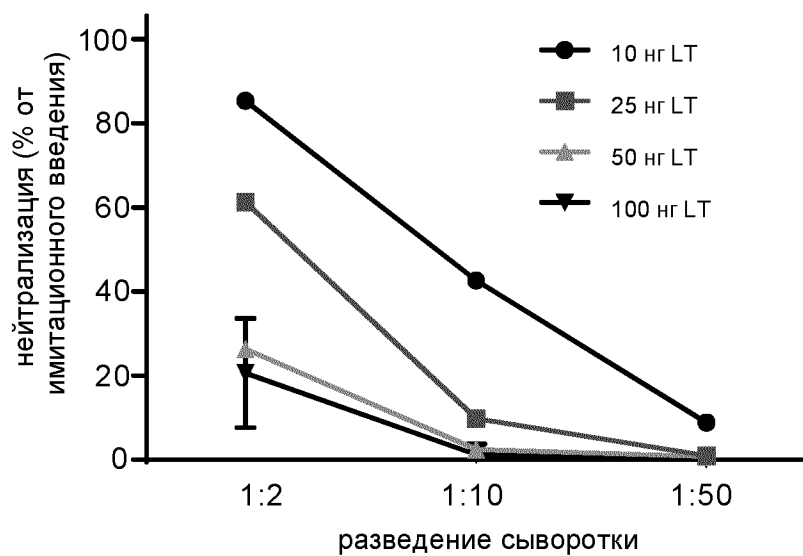
Фиг. 4



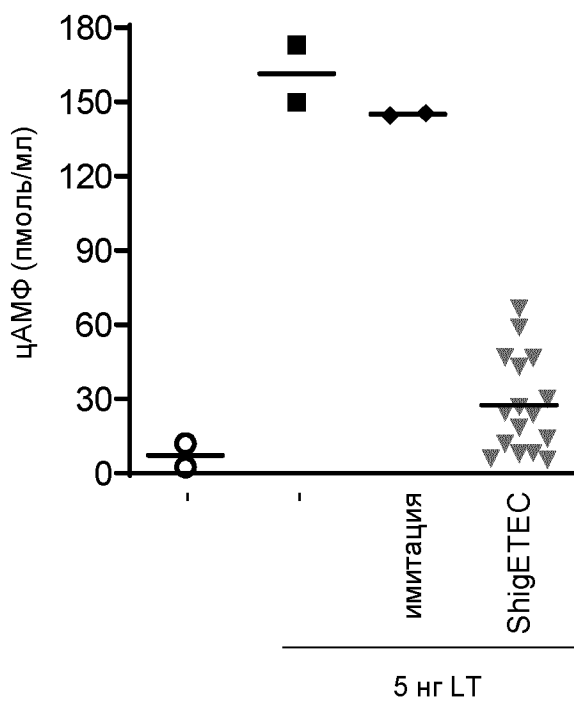
Фиг. 5



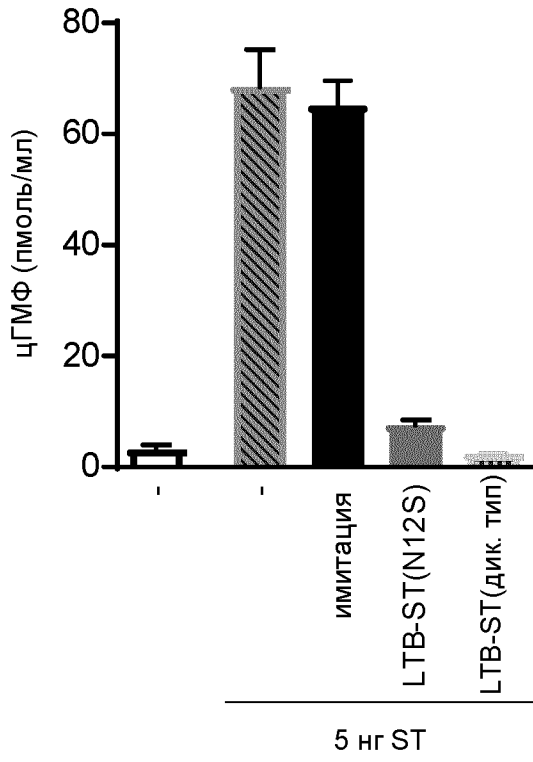
Фиг. 6



A



Фиг. 6

В

Фиг. 7

SEQ ID NO: 1: аминокислотная последовательность STm
NSSNYCCELCCXXACTGCT

где

X в положении 12 является S, N, K или R и/или

X в положении 13 является P, G, L или F,

SEQ ID NO: 2: последовательность ST дикого типа
NSSNYCCELCCNPACTGCT

SEQ ID NO: 3: аминокислотная последовательность LTB
MNKVKCYVLFALPSSLCAYGAPQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV
IITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI
SMEN

SEQ ID NO: 4: NSSNYCCELCC**S**PACTGCT

SEQ ID NO: 5: NSSNYCCELCC**K**PACTGCT

SEQ ID NO: 6: NSSNYCCELCC**R**PACTGCT

SEQ ID NO: 7: NSSNYCCELCC**G**ACTGCT

SEQ ID NO: 8: NSSNYCCELCC**N**LACTGCT

SEQ ID NO: 9: NSSNYCCELCC**F**ACTGCT

Фиг. 7 (продолж.)

SEQ ID NO: 10: LTB-STm (без линкера)

MNKVKCYVLFALPSSLCAYGAPQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV
IITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI
SMENNSSNYCCELCCXXACTGCY

где

X в положении 136 является S, N, K или R и/или

X в положении 137 является P, G, L или F,

предпочтительно при этом SEQ ID NO: 10 не содержит:

NSSNYCCELCCNPACTGCT (SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 11: **LTB ST(N12S)** без линкера:

MNKVKCYVLFALPSSLCAYGAPQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV
IITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI
SMENNSSNYCCELCCSPACTGCT-

SEQ ID NO: 12: **LTB ST(N12S)**, включая линкер GPGP (SEQ ID NO: 20, выделен подчеркиванием):

MNKVKCYVLFALPSSLCAYGAPQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV
IITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI
SMENGPGPNSSNYCCELCCSPACTGCT

SEQ ID NO: 13: нуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 12:

LTB (выделена жирным шрифтом); ST(N12S) (подчеркнута),
последовательность линкера (без выделения)

**Atgaataaagtaaaatggtatggtttatftacggcggtaccatcctctctatgtgcatacggagctcccagctctatt
acagaactatggtcgaatatcgcaacacacaaatatatacgataa atgacaagatactatcatatacggaaatc
gatggcaggcaaaagagaaatggtatcattacatttaagagcggcgcaacatttcagggtcgaagtcccgggc
agtcaacatatagactcccacaaaaaagccattgaaaggatgaaggacacattaagaatcacatatctgaccg
agaccacaaattgataaattatgtgtatggaataataaaaccccccaattcaattgaggcaatcagtatggaacacg
ggccggggcccaattcttctaactactgctgtgaactttgtgtctcctgcctgtacaggatgttactag**

SEQ ID NO: 14: нуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 11:

LTB (выделена жирным шрифтом); ST(N12S) (подчеркнута)

**atgaataaagtaaaatggtatggtttatftacggcggtaccatcctctctatgtgcatacggagctcccagctctatta
cagaactatggtcgaatatcgcaacacacaaatatatacgataa atgacaagatactatcatatacggaaatcg
atggcaggcaaaagagaaatggtatcattacatttaagagcggcgcaacatttcagggtcgaagtcccgggca
gtcaacatatagactcccacaaaaaagccattgaaaggatgaaggacacattaagaatcacatatctgaccga
gaccacaaattgataaattatgtgtatggaataataaaaccccccaattcaattgaggcaatcagtatggaacacaa
ttcttctaactactgctgtgaactttgtgtctcctgcctgtacaggatgttactag**

Фиг. 7 (продолж.)

SEQ ID NO: 15: промотор (249 п. н.), происходящий из *E. coli*:

```
gctgccgtggtcaagtcgcgactaataaaaataatcaggttgccatgattcaatgtacaccttctcacattcgtctccggc
atgaaaacgatgactctttctttatcgctttcactacacattttatcctcgcgatggatgtttataaaaaacatgattgacatcat
gttgcatataggtaaacaaaaacaagtggcggtatctttccggattgtcttctgtatgatataaagtttcctcg
```

SEQ ID NO: 16: терминатор после первого LTB-ST(N12S)

```
tttgcttaaaagcatgtctaatactaggaacctatataacaactactgtacttataactaatgagccttatgctgcattgaaact
aaagcggccgccaagatcttccggatggctcgag
```

SEQ ID NO: 17: терминатор после второго LTB-ST(N12S)

```
tttgcttaaaagcatgtctaatactaggaacctatataacaactactgtacttataactaatgagccttatgctgcattgaaact
aaagcggccgccaagatcttccggatggctcgag
```

SEQ ID NO: 18: терминатор после третьего LTB-ST(N12S)

```
tttgcttaaaagcatgtctaatactaggaacctatataacaactactgtacttataactaatgagccttatgctgcattgaaaa
ggcggtagaggatgcaat
```

Фиг. 7 (продолж.)

SEQ ID NO: 19: *infA*-3x[LTB-ST(N12S)] вставка в плазмиду вирулентности ShigEТЕС, LТА промотор LTB ST(N12S), * сайты вставки

gtcgcaaaacatgctcattcagggttcattcaccacaaataggatgatgagtgaggataagtgagctgctgtagagt
 ttctgggtatgtcagtaa*gggtaccacggtgctgtttccaccacaagaatgaatgtttcggcacatttctcccagagtg
 ttataattgcggtcgcagagttggttacgctcattaccccgctccgataaggaattttcgcgtcaggtaacgcccacggtt
 atctcaccgctccctatacgttgcgcttttggtgctgtagccggtgttttcggagtaatgtgccgaacctgtttgtagc
 tagcgcgcaaatcttactatttacagaactcggcattatctgcccgttcaaattacggtagtgataccccagaggattag
 atgGCCAAAGAAGACAATATTGAAATGCAAGGTACCgTtctGAAACgTtgcCTAATACCATTGTCGCGTAGAGTTAGA
 AAACGGTCAcGTgTtactGcAcAcAtctccgGtAAaATGCGCAAAaACTAcAtccGcAtcctGacggGcGcAAaAGT
 GactGtTgAAcTgAcCCcGtAcGAcctGagCAaAGGcCGcAttGtTctcGtAgTcGctGaltGtTttaccGcctgatggc
 gaagagaaagaacgagtaaaaggcggtttaaccggcctttttatgtgatgatgaagtacttggaaagtataagtc
 ataactgtctcgatgtaggcggccgctgcccgtggtcaagtcgCGactaataaaaaataatcagggtgccatgattcaat
 gtacacctttctcacattcgtctccggcatgaaaacgatgcactctttcttatcgcttctactacacattttatcctcgcatgga
 gttttataaaaaacatgattgacatcatgttgcataataggttaaacaaaacaagtgccgttatcttttccgattgtctctgt
 atgatataaagtttccctcgatgaataaagtaaaatgTtatgTttattacggcgTtaccatcctctctatgtgcatacg
 gagctccccagctctattacagaactatgttcggaatatcgcaacacacaaatataacgataaatgacaagata
 ctatcatatacggaaatcgatggcaggcaaaagagaaatgTtatcattacatttaagagcggcgcaacatttca
 ggtcgaagtcccgggagtcacaatatagactccccaaaaaaagccattgaaaggatgaaggacacattaa
 gaatcacatatctgaccgagacaaaattgataaattatgtgtatggaataataaaccccccaattcaattgCGG
 caatcagTatgGaaaacgggcccggggcccaattcttctaactactgctgtgaactttgttctcctgctgtacaggatg
 ttactagtttgctttaaagcatgtctaagtctaggaacctataaacaactactgtactataactaatgagccttatgctgatt
 tgaactaaagcggccgacgatctccggatggctcagggctccggttcaagtcgCGactaataaaaaataatcagg
 ttgccatgattcaatgtacacctttctcacattcgtctccggcatgaaaacgatgcactctttcttatcgcttctactacacattt
 atcctcgcattgattttataaaaaacatgattgacatcatgttgcataataggttaaacaaaacaagtgccgttatcttttcc
 ggattgtctctgtatgatataaagtttccctcgatgaataaagtaaaatgTtatgTttattacggcgTtaccatcctctc
 tatgtgcatacggagctccccagctctattacagaactatgttcggaatatcgcaacacacaaatataacgataa
 atgacaagatactatcatatacggaaatcgatggcaggcaaaagagaaatgTtatcattacatttaagagcggc
 gcaacatttcaggctgaagtcccgggagtcacaatatagactccccaaaaaaagccattgaaaggatgaag
 gacacattaaagaatcacatatctgaccgagacaaaattgataaattatgtgtatggaataataaaccccccaat
 tcaattgCGGcaatcagTatgGaaaacgggcccggggcccaattcttctaactactgctgtgaactttgttctcctgcc
 tgtacaggatgttactagttgctttaaagcatgtctaataatccgctcagggctgcccgtggttcaagtcgCGactaataa
 aataatcaggttGCCatgattcaatgtacacctttctcacattcgtctccggcatgaaaacgatgcactctttcttatcgctt
 cactacacattttatcctcgcatggaattttataaaaaacatgattgacatcatgttgcataataggttaaacaaaacaagtg
 ccgttatcttttccgattgtctctgtatgatataaagtttccctcgatgaataaagtaaaatgTtatgTttattacggcg
 ttaccatcctctctatgtgcatacggagctccccagctctattacagaactatgttcggaatatcgcaacacacaaa
 tatatacgaataatgacaagatactatcatatacggaaatcgatggcaggcaaaagagaaatgTtatcattacat
 ttaagagcggcgcaacatttcaggctgaagtcccgggagtcacaatatagactccccaaaaaaagccattg
 aaaggatgaaggacacattaagaatcacaatctgaccgagaccaaaattgataaattatgtgtatggaataata
 aaacccccattcaattgCGGcaatcagTatgGaaaacgggcccggggcccaattcttctaactactgctgtgaacttt
 gttgtctcctgctgtacaggatgttactagttgctttaaagcatgtctaataatgctaggaacctataaacaactactgactt
 atactaatgagccttatgctgattgaaaaggcggtagaggatgcaatgtttaaactgttaggctggagctgcttgaag
 ttctatactttctagagaataggaactcggaaataggaactaaggaggatattcatatg*gatgaatgttcaggctatcttta
 tcttgatggtggtcagctgtttgtaaaagaatcgctgtaacaatagaagaactgcaggcagctactggtcccacatcgttt
 gctcagTcaactgTgaagtccgtagcgcgtaaattaatgcttgcataaaacgTtactggagTggatgaag

SEQ ID NO: 20: линкер: GPGP

Фиг. 8

