

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201600347** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.09.30

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.05.24

**(54) ГИБРИДНЫЙ БЕЛОК, ДНК, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ, ПРОДУЦЕНТ,
ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ТУБЕРКУЛЕЗА (ВАРИАНТЫ)**

(31) **2015119607**

(32) **2015.05.25**

(33) **RU**

(71)(72) Заявитель и изобретатель:

**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ; ОРЛОВ АНТОН
ИОСИФОВИЧ; ФЕДОРОВА
ЕКАТЕРИНА АЛЕКСЕЕВНА;
ЧЕРНЯЕВА ЕКАТЕРИНА
НИКОЛАЕВНА (RU)**

(74) Представитель:
Федорова Е.А. (RU)

(57) Группа изобретений относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использована для осуществления профилактики и лечения туберкулеза. Предложены гибридные белки, включающие иммуногенные фрагменты белков Ag85B, Tb10.4 M.tuberculosis, FliC S.Typhimurium, соединенные гибкими мостиками, кодирующие полинуклеотиды, генетические конструкции для экспрессии полинуклеотидов, продуценты и варианты вакцины для профилактики и лечения туберкулеза на основе описанного гибридного белка, потребитель разработанной вакцины - человек, либо животное. Предложенная вакцина имеет эффективность, превышающую такую БЦЖ. Изобретения, заявленные для получения данной вакцины, обеспечивают ее безопасность и простоту при производстве и применении.

A2

201600347

201600347

A2

Гибридный белок, ДНК, генетическая конструкция, продуцент, вакцина на основе гибридного белка для профилактики и лечения туберкулеза (варианты)

Группа изобретений относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использована для осуществления профилактики и лечения туберкулеза.

Туберкулез является инфекционным заболеванием, вызывающим наибольшее количество случаев с летальным исходом. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), туберкулезом ежегодно заболевает около 8 млн. человек, и около 3 млн. заболевших погибает. Лечение туберкулеза осложняется тем, что широко распространены высокорезистентные штаммы микобактерий, вызывающие туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). В связи с этим перспективным подходом в борьбе с данным заболеванием является профилактика. По инициативе ВОЗ с 2006 г. объявлена глобальная программа борьбы с туберкулезом «The Global Plan to Stop TB», согласно которой одно из ведущих мест занимает разработка вакцин нового поколения против туберкулеза. Согласно последнему докладу ВОЗ по туберкулезу, 2014 г., новая вакцина, которая поможет предотвратить передачу ТБ среди подростков и взрослых в развивающихся странах, будет самым экономически эффективным инструментом в смягчении эпидемии [http://www.who.int/immunization/research/forums_and_initiatives/07_Evans_GVIRF_TB_Vaccine_Progress.pdf].

На сегодняшний день единственной зарегистрированной и применяемой вакциной является BCG (БЦЖ), полученная из аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis* и впервые введенная человеку в 1921 г. С 2006 года несколько стран прекратили использование БЦЖ для массовой вакцинации после вспышки БЦЖ-инфекции в Финляндии. США и Нидерланды никогда не использовали БЦЖ массово. Сомнительная эффективность вакцинации BCG и побочные эффекты обуславливают острую потребность в разработке эффективных и безопасных средств вакцинации против *Mycobacterium tuberculosis*.

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

является создание обладающей вышеперечисленными свойствами вакцины против туберкулеза, которая также будет иметь низкую стоимость.

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

Для создания настоящего изобретения были выбраны иммунодоминантные секретируемые антигены *M.tuberculosis* – белок Ag85B комплекса белков 85 и белок TB10.4 (culture-filtrate protein-7). Данные белки высококонсервативны среди различных штаммов микобактерий, а также способны вызывать иммунный ответ, что позволяет полагать, что возможно получение кросс-реактивного иммунного ответа [WO 96/15241, дата приоритета 14.11.94 US]. Важно, что указанные белки не имеют гомологии с известными белками других организмов, что обеспечивает специфичность их действия. Также показано, что белок TB10.4 обладает адъювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий [EA 012037 B1, дата приоритета 20041116].

Известны следующие решения на основе вышеперечисленных белков *M.tuberculosis*.

Известна бактерия, в одном из вариантов реализации изобретения – микобактерия, содержащая плазмидные ДНК, кодирующие в одном из вариантов изобретения Ag85b и TB10.4 [WO2008150969A9, дата приоритета 31.05.2007]. Однако введение живой микобактерии, пусть и аттенуированной, несет в себе риски. Использование вакцины на основе белка является более безопасной альтернативой.

Известна вакцина HyVAC IV/Aeras, которая содержит белки Ag85B и TB10.4, а также сложный адъювант IC31, содержащий синтетический антимикробный пептид KLKL5KLK, действие которого направлено на усиление взаимодействия антиген-презентирующих клеток с антигеном, и лиганд TLR9 ODN1a, обладающий иммуностимулирующим действием. Данная вакцина проходит IIa фазу клинических испытаний

[http://www.who.int/immunization/research/forums_and_initiatives/07_Evans_GVIRF_TB_Vaccine_Progress.pdf]. Однако производство действующего агента вакцины, представленного четырьмя компонентами, полноразмерными белками и пептидами, получаемыми с использованием совершенно разных механизмов, является технически сложным. Более того, при использовании химически синтезированных молекул, в том числе и белковых,

следует понимать, что их часть может быть представлена энантиомерами, что может приводить к непредсказуемым результатам в организме при применении. Понятие энантиомерии играет важную роль в фармацевтике, поскольку разные энантиомеры лекарственных веществ, как правило, имеют различную биологическую активность. Использование живых систем для получения пептидных молекул позволяет получить молекулы природной структуры, гомогенную смесь.

Известна нуклеиновая кислота, кодирующая белки Ag85A, Ag85B и TB10.4 *Mycobacterium tuberculosis* под контролем промотора, а также аденовирусный вектор, несущий такую нуклеиновую кислоту, в результате в организме введения синтезируется слитый белок, а также известна противотуберкулезная вакцина на основе такого аденовирусного вектора, которая может дополнительно содержать адъювант [US 8609402 B2, дата приоритета 20041116].

Известен аденовирусный вектор для лечения активной формы туберкулеза, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую белки Ag85A, Ag85B и TB10.4, в одном из вариантов изобретения в организме введения с него синтезируется гибридный белок, также может дополнительно вводиться адъювант [WO 2012/038367 A1, дата приоритета 20100920].

Однако использование аденовируса для доставки иммуногена также несет в себе риски. Вирусные векторы имеют ряд недостатков, в их числе то, что они дорогостоящи и могут вызывать воспалительную реакцию, что исключает повторное введение вектора. Также вирусные векторы обладают способностью реплицироваться, что снижает степень контроля над экспрессией целевого белка, что, в свою очередь, не всегда желательно и применимо.

Вирусные векторы и модифицированные патогены имеют и риски наследования, что может препятствовать их использованию у человека [R.R. Redfield et al., New Engl. J. Med. 316, 673 (1987); L. Mascola et al., Arch. Intern. Med. 149, 1569 (1989)].

Использование рекомбинантного гибридного белка позволит уменьшить количество компонентов вакцины, соответственно, упростить и удешевить ее производство, соответственно, и ее стоимость, при сообщении вакцине безопасности.

Известен способ получения гибридной конструкции TB10.4-Hsp16.3, по которому гены, кодирующие данные белки, клонируют по разным сайтам рестрикции в плазмиде, полученной плазмидой трансформируют клетки *E.coli* [WO201288739A1, дата приоритета 29.12.2010].

Известна гибридная конструкция, содержащая хотя бы один домен белка *Mycobacterium*, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, например, Ag85B, и домен выхода из фаголизосомы, например, из *Listeria* [WO9910496_A1, дата приоритета 22.08.1997].

Известна гибридная конструкция TB10.4-Ag85B-антиген, вызванный голоданием микобактерий (вырабатывается, как минимум, в 6,5 раз больше после того, как подвергнуть микобактерию голоданию) [WO2006136162_A2, дата приоритета 23.06.2005].

Однако возможно добиться дополнительного увеличения иммуногенности вакцины с использованием адъюванта.

Известен гибридный полипептид, одним из вариантов изобретения является белок на основе белка семейства ESAT-6 и белка MPT59 (Ag85B), либо одного Т-клеточного эпитопа MPT59, а также композиция, дополнительно содержащая адъювант из DDA, Quil A, poly I:C, неполного адъюванта Фрейнда, IFN-γ, IL-2, IL-12, MPL и MDP [US7867502_B1, дата приоритета 13.07.1999].

Известна вакцина, содержащая гибридный белок, содержащий аминокислотные последовательности, кодирующие гибридные белки Ag85B-TB10.4, дополнительно может применяться адъювант [WO 2005/061534 A2, дата приоритета 23.12.2003].

Известна фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок, содержащий аминокислотные последовательности Rv0288 (TB10.4) и хотя бы один агент из фрагмента в том числе Ag85B, дополнительно может применяться адъювант [US 6991797 B2, дата приоритета 02.07.1993].

Известна иммуногенная композиция, содержащая микобактериальные антигены в форме отдельных полипептидов, либо в форме одного или более слитых белков, либо совместно отдельных полипептидов и слитых белков, слитый белок содержит антигены *M. tuberculosis* Ag85B, TB10.4 и ESAT6, также дополнительно может применяться адъювант [WO 2014/009438 A2, дата приоритета 10.07.2012].

Известна иммуногенная композиция, содержащая гибридный белок, который дополнительно содержит Ag85B, TB10.4, а также содержащая адъювант [US 8101193 B2, US 7968105 B2, US 8293250 B2, US 8703151 B2, дата приоритета 23.06.2005].

Известен гибридный белок, в одном из вариантов гипотетически содержащий белок Rpf (*Mycobacterium* Resuscitation Promoting Factor) в качестве адъюванта и белки Ag85B, TB10.4 [WO 2014/009433 A1, дата приоритета 10.07.2012]. Однако, данная конструкция не охарактеризована структурно, последовательность приведена лишь для гибридного белка, содержащего белки RpfB - Dhyb, Ag85B, TB10.4 и ESAT6, RpfB-Dhyb-

Ag85B-TB10.4-ESAT6 из 849 а.о.. Последний белок достаточно велик, что затрудняет принятие им конформации, при которой возможно одновременное функционирование всех требуемых компонентов белка, что может привести к трудностям при реализации заявленных функций.

Использование адъюванта позволяет усилить иммуногенность вакцин, однако важно подобрать адъювант, который позволит индуцировать наиболее специфичный по отношению к патогену иммунный ответ, в данном случае способный стимулировать Т-клеточный иммунный ответ, наряду с В-клеточным, а также который будет способствовать формированию местного иммунитета. Авторы настоящего изобретения сочли флагеллин наиболее оптимальным вариантом для данных целей.

Флагеллин – белок бактериальных жгутиков, присутствующих у многих бактерий, в том числе патогенных. Флагеллин - лиганд TLR5 (Toll-like receptor 5). Взаимодействие флагеллина с TLR-5 стимулирует созревание макрофагов и дендритных клеток – антиген-презентирующих клеток, что приводит к выработке иммунного ответа [Mc Dermott P.F..High-affinity interaction between Gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. Infect. Immun. - 2000. – V. 68. – p.:5525–5529; Means T.K. et al. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. J.Immunol. - 2003. – V.170. – p.:5165–5175]. Флагеллины индуцируют формирование сывороточных и секреторных антител, Th1- и Th2- ответ как на сами флагеллины, так и на совместно введенные антигены.

Известна вакцинная композиция, содержащая один или более из источников белков DosR и, в одном из вариантов, адъювант, в одном из вариантов - из бактериальных флагеллинов [WO 2006/104389 A1, дата приоритета 31.03.2005].

Известна композиция для вакцинации, содержащая полипептид, включающий антигенные части в одном из вариантов осуществления белков Ag85B и TB10.4, также содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд CD40, либо пептид, который обладает способностью связываться с лигандом CD40 и активировать рецептор CD40, экспрессированный на антитело-продуцирующих В-лимфоцитах, которая в одном из вариантов изобретения также содержит флагеллин [WO 2010/034974 A2, дата приоритета 24.09.2008]. Данное изобретение авторы настоящего изобретения считают прототипом. Недостатком прототипа изобретения является многокомпонентность, три разных компонента в составе одной вакцины. Более того, гибридный белок не охарактеризован структурно, лишь обозначены его компоненты. Также предлагается использовать полноразмерный флагеллин, причем не указана его принадлежность к тому или иному

организму, а также не указан тип флагеллина, например, для флагеллина *Salmonella* - FliC или FljB.

Флагеллин, в зависимости от происхождения из того или иного микроорганизма, различается и состоит из 259–1250 аминокислотных остатков, что, безусловно, влияет на его свойства.

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

Таким образом, указание микроорганизма, флагеллин которого используется, а также типа используемого флагеллина (например, для *Salmonella*) является существенным.

Более того, известные флагеллиновые адъюванты проявляют значительные побочные эффекты, и, в частности, собственную антигенную активность и системные провоспалительные свойства при введении *in vivo*.

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

В связи с вышесказанным реализация изобретения, описанного в публикации WO 2010/034974 A2, ставится под вопрос.

Авторами настоящего изобретения предложено неожиданное оригинальное решение, которое лишено данных недостатков.

Технический результат от использования изобретения заключается в упрощении, удешевлении и сокращении сроков производства противотуберкулезного иммуногена - активного агента для вакцины, и, соответственно, вакцины против туберкулеза, - за счет производства лишь одного компонента, гибридного белка, взамен производства множества отдельных компонентов вакцинной смеси (аналоги), при сохранении требуемой активности выбранных для включения в состав гибридного белка белков за счет длины и созданной структуры белка, в которой иммуногенные эпитопы соединены гибкими мостиками.

Технический результат от использования изобретения заключается в увеличении эффективности и предсказуемости результата использования противотуберкулезного иммуногена - активного агента для вакцины, и, соответственно, вакцины против туберкулеза, за счет использования одного компонента, сочетающего в себе и функции специфического микобактериального антигена, и адьюванта, опосредующего оптимальный для подавления развития туберкулезной инфекции иммунитет, правильную конформацию которого, опосредующую полноценное функционирование всех его компонентов, легко обеспечить также благодаря отсутствию иных молекул, требующих иных условий для сохранения активности.

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

Введение иммуногена, соответственно, вакцины, предпочтительно – внутримышечное. Также возможно использование для иммунизации поверхности слизистой, поскольку иммунитет, индуцированный в одной области слизистой, может индуцировать развитие иммунитета на дистальной области слизистой [McGhee, J. R. et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine 1992, 10:75-88]. Формирование местного иммунитета важно для предотвращения

инфицирования микобактериями. Содержание в составе гибридного белка фрагментов флагеллина также способствует данному процессу, так, известно, что в респираторном тракте флагеллин индуцирует синтез IgA и вызывает Th2-ассоциированный ответ [Soloff AC, Barratt-Boyes SM. Enemy at the gates: dendritic cells and immunity to mucosal pathogens. Cell Res. 2010 Aug;20(8):872-85. doi: 10.1038/cr.2010.94. Epub 2010 Jul 6]. Иммунизация поверхности слизистой также значительно облегчает доставку иммуногена.

Сущность изобретения

Предложена группа изобретений: гибридный белок, включающий иммуногенные фрагменты белков Ag85B, Tb10.4 *Mycobacterium tuberculosis*, флагеллина FliC *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, компоненты конструкции соединены гибкими мостиками, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1, либо SEQ ID NO.:2, либо SEQ ID NO.:3, либо SEQ ID NO.:4; полинуклеотид, кодирующий такой гибридный белок, кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках продуцента гибридного белка; генетическая конструкция для экспрессии в клетках продуцента такого полинуклеотида, включающая, помимо полинуклеотида, элементы, позволяющие реализовать указанное назначение; продуцент описанного гибридного белка, представленный прокариотическим, либо эукариотическим организмом; вакцина для профилактики и лечения туберкулеза, содержащая описанный гибридный белок в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор, потребитель вакцины – человек, либо животное. Предложенная вакцина имеет эффективность, превышающую таковую БЦЖ. Изобретения, заявленные для получения данной вакцины, обеспечивают ее безопасность и простоту при производстве и применении.

Подробное описание изобретения.

Предложена группа изобретений: гибридный белок, ДНК, генетическая конструкция, продуцент, вакцина на основе гибридного белка для профилактики и лечения туберкулеза (варианты).

Предложены гибридные белки, каждый включает иммуногенные фрагменты белков Ag85B, Tb10.4 *Mycobacterium tuberculosis* и FliC *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, соединенные гибкими мостиками; белки охарактеризованы последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2, SEQ ID NO.:3, SEQ ID NO.:4.

Предложены полинуклеотиды, кодирующие описанные гибридные белки, кодонно оптимизированные для экспрессии в клетках продуцента гибридного белка. При известности аминокислотной последовательности белка специалист в данной области

сможет получить нуклеотидную последовательность. Кодонную оптимизацию проводят самостоятельно, используя информацию о частоте встречаемости кодонов у продуцента, например, в базе данных [например, Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):292], либо с использованием специализированных программ, например, представленной на сайте <http://www.encorbio.com/protocols/Codon.htm>.

Предложены генетические конструкции для экспрессии в клетках продуцента описанных полинуклеотидов; каждая конструкция включает, помимо полинуклеотида, элементы, позволяющие реализовать указанное назначение. Под генетической конструкцией подразумевается рекомбинантный вектор, который может быть представлен, в зависимости от совместимости с продуцентом, вирусным, плазмидным, фосмидным, космидным или иным возможным вектором. К примеру, при выборе в качестве продуцента клеток *E. coli*, ген может быть в составе бактериофага, например, на основе фага λ , либо плазмиды, например, на основе pBR, либо pUC, и подобное. При использовании в качестве продуцента организма *Bacillus subtilis* ген может быть, например, в составе плазмиды на основе pUB. При использовании в качестве продуцента дрожжей генетическая конструкция может быть представлена, например, плазмидой на основе YEp, либо YRp, либо YCp, либо YIp.

Генетическая конструкция, обеспечивающая синтез белка в клетках продуцента, должна содержать элементы для поддержания и амплификации, преимущественно в больших количествах, и эффективного функционирования согласно назначению, а также для селекции трансформанта.

Под элементами для поддержания и амплификации подразумевается ориджин репликации. Подходящий ориджин репликации для, например, плазмидного вектора представлен, например, pM1 (der.), ColE1 (der.) и F1, pUC и F1, SV40, но не ограничивается ими. Также может содержаться элемент для интеграции конструкции в геном продуцента. Например, 3' AOX1 или 18S pPHK для дрожжей.

Под элементами для эффективного функционирования, для экспрессии закодированного белка, подразумеваются сигналы инициации транскрипции, промотор, сигналы инициации трансляции, старт-кодон и стоп-кодон(ы), терминирующие транскрипцию последовательности, регуляторные последовательности.

При использовании в качестве продуцента организма *Escherichia coli* промотор может быть представлен, например, промотором оперона лактозы, оперона триптофана; дрожжей - например, промотором гена кислой фосфатазы, гена алкогольдегидрогеназы,

гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гена метаболизма галактозы; грибов – например, промотором гена целлобиогидролазы, либо α -амилазы, либо глюкоамилазы, либо глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, либо гена *abp1*; растений – например, промотором CaMV 19S RNA или CaMV 35S RNA, либо промотором гена нопалинсинтетазы. При использовании в качестве продуцента клеток млекопитающего, например, промотор может быть представлен природным промотором (например, CaM kinase II, CMV, nestin, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, p-globin, GFAP, GAP43, тирозингидроксилаза, субъединица I каинатного рецептора и субъединица В глутаматного рецептора и другие), либо синтетическим. Пример терминирующей последовательности для клеток млекопитающих - таковая бычьего гормона роста (BGH), клеток растений - гена нопалин синтетазы (NOS T).

Сигналы инициации трансляции - последовательность Шайна — Дальгарно [Karp L. D., Lorsch J. R. The molecular mechanics of eukaryotic translation // Annual Review of Biochemistry 73/2004, 657—704] у прокариот и последовательность Козак у эукариот [Kozak M. (1986) "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes", Cell 44, 283-292]. При использовании клеток млекопитающих последовательность Козака непосредственно перед стартовым кодоном ATG позволяет увеличить экспрессию [Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. EMBO J. 1997;16(9):2482–2492].

Под элементами для селекции трансформанта подразумевают, как правило, ген, обуславливающий устойчивость к антибиотику, либо ген, завершающий ауксотрофию. При использовании бактерии в качестве продуцента селективный маркер может быть представлен, например, геном устойчивости к ампициллину, либо канамицину, либо тетрациклину; дрожжей - например, геном LEU2, либо TRP1, либо URA3; грибов - например, геном устойчивости к биалафосу, либо гигромицину, либо ауреобасидину, либо блеомицину; растений - например, геном устойчивости к канамицину, либо биалафосу; клеток млекопитающих - например, геном устойчивости к неомицину.

Регуляторные последовательности – нуклеотидные последовательности, способные повлиять на экспрессию гена на уровне транскрипции и/или трансляции, а также на механизмы, обеспечивающие существование и поддержание функционирования генетической конструкции. Возможные регуляторные последовательности по отношению к промотору – это энхансер, для увеличения уровня экспрессии через улучшение

взаимодействия РНК-полимеразы и ДНК, инсулятор, для модулирования функций энхансера, сайленсеры, либо их фрагменты, для снижения уровня транскрипции, например, для тканеспецифической экспрессии, 5' нетранслируемая область до промотора, включая интрон. Генетическая конструкция по настоящему изобретению в одном из вариантов дополнительно содержит от одной из вышеприведенных регуляторных последовательностей, в зависимости от варианта вектора, основанного на выборе промотора и желаемых параметрах экспрессии таргетного гена.

Для получения секретируемых гибридных белков, охарактеризованных SEQ ID NO.:1-4, на N-конец последовательности помещают сигнальный пептид, подходящий для используемого продуцента. Примеры таких секреторных последовательностей описаны в литературе [например, для *E.coli* – в патенте РФ №2198179, дата приоритета 15.09.1999, для дрожжей – в патенте РФ №2143495, дата приоритета 08.07.1994, патенте США №4546082, дата приоритета 17.06.1982, европейских заявках на изобретение №116201, 123294, 123544, 163529, 123289, заявке на изобретение Дании 3614/83, дата приоритета 08.08.1983, для растений - в статьях Kapila J, Rycke RD, Van Montagu M, Aengenon G (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci* 122: 101-108, Stiefel, V., Ruiz-Avila, L., Raz, R., Valles, M.P., Ghez, J., Pages, M., Martinez-Izquierdo, J.A., Ludevid, M.D., Langdale, J.A., Nelson, T., and Puigdomènech, P. (1990). Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation. *Plant Cell* 2, 785-793].

Могут содержаться и иные элементы, требуемые для функционирования экспрессионной системы.

Предложены продуценты описанных гибридных белков, на основе прокариотического, либо эукариотического организма. Прокариотический продуцент представлен, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, эукариотический продуцент - грибами, клетками растений, млекопитающих.

Примеры приведены для наглядности реализации изобретений (генетическая конструкция, продуцент), но реализация ими не ограничивается. На сегодняшний момент в научной литературе (например, учебники по молекулярной биологии, биотехнологии, статьи, например, доступная по адресу <http://www.labome.ru/method/Recombinant-Protein-Expression-Vector-Host-Systems.html>, специализированные сайты в интернете с базами данных, например, векторов) описано множество экспрессионных систем, а также методик их создания и работы с ними, в связи с чем специалисту понятно, что представленное описание группы изобретений позволяет их осуществить.

Предложены варианты вакцины для профилактики и лечения туберкулеза, каждый вариант содержит один из описанных гибридных белков в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор. Фармацевтически приемлемые носители или буферные растворы известны из уровня техники и включают те, которые описаны в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences. В качестве потребителя вакцины может выступать как человек, так и животное, в том числе из домашних или сельскохозяйственных животных.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованных изобретений. Полученные результаты исследований проиллюстрированы следующими примерами.

Пример 1. Моделирование гибридных белков (SEQ ID NO.:1- SEQ ID NO.:4) для противотуберкулезной вакцины.

Для моделирования белков были произведены следующие действия:

1. Поиск иммуногенных эпитопов белков Ag85B, Tb10.4, FliC с помощью программы CPREDS (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html>)
2. Построение модели целого белка для определения ориентации доменов
3. Построение моделей для каждого домена (с использованием образцов 3D структур и *ab initio*)
4. Докинг моделей с использованием модели целого белка.

Для получения наиболее реалистичных результатов в автоматическом режиме использовали алгоритм I-Tasser для моделирования белков.

Смоделированные гибридные белки состоят из 546 а.о., представлены их аминокислотные последовательности – SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:4. Анализ аминокислотных последовательностей данных белков с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) показал, что гибридные белки имеют молекулярную массу 57,2 кДа, pI 4.79.

Пример 2. Получение высокоочищенных гибридных белков с использованием прокариотического организма

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные (1731 п.н.), одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках *E.coli* в ручном режиме и добавив фланкирующие ген сайты рестрикции NdeI/XhoI. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Полученные гены клонировали в бактериальном экспрессионном векторе pET28a(+) по рестрикционным сайтам NdeI и XhoI по инструкции к вектору.

Для создания штамма-продуцента использовали клетки *E.coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), содержащие в геноме λ De3 лизоген и мутацию rne131. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. lon- и ompT-мутации по генам протеаз позволяют получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах.

Подготавливали клетки *E. coli* штамма BL21 с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в течение ночи в 5 мл L-бульона, содержащего 1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый. Разводили культуру свежим L-бульоном в 50-100 раз и выращивали на качалке при +37°C до оптической плотности 0,2-0,3 при длине волны 590 нм. При достижении оптической плотности более 0,3 культуру разводили свежим L-бульоном до оптической плотности 0,1 и растили 30 мин. Переносили 100 мл культуры в стерильную центрифужную пробирку и осаждали клетки при +4°C на 5000g в течение 10 мин. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедуру отмывки повторяли трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировали в малом объеме деионизованной воды и центрифугировали 30 сек. при 5000 об/мин. на микроцентрифуге.

Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Для этого 1 мкл десятикратно разведенной лигазной смеси добавляли к 12 мкл компетентных клеток, перемешивали и проводили электропорацию на электропораторе Eporator (Eppendorf, Германия) в стерильных кюветах для электропорации (Eppendorf, Германия), объемом 100 мкл, щель 1 мм, при электрическом импульсе напряженностью 1,7 кВ длительностью 5 мсек.

После трансформации клетки инкубировали в SOC-среде (2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза) в течение 40 мин. при +37°C. 10–100 мкл клеточной суспензии высевали на селективную LB-среду (Gibco BRL, США), содержащую канамицин (100 мкг/мл), для отбора клонов, содержащих плазмиды (штаммов-продуцентов).

Выросшие колонии *E. coli* проверяли на наличие плазмид со вставкой таргетного гена. Клон клеток, содержащих искомую плазмидную ДНК, считали штаммом-

продуцентом гибридного белка. Таким образом были получены четыре штамма-продуцента гибридных белков, охарактеризованных SEQ ID NO.:1 - SEQ ID NO.:4.

Для культивирования полученных штаммов-продуцентов использовали стандартную агаризованную LB-среду, содержащую канамицин в концентрации 100 мкг/мл и глюкозу в концентрации 1% для блокирования неспецифической экспрессии.

Индукцию экспрессии проводили при достижении культурой клеток оптической плотности 0.6-0.8 оптических единиц при длине волны 600 нм. В качестве индуктора использовали 0.2% лактозу (Studier, 2005).

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудьера (Studier, 2005) использовали среду RYP-5052, состоящую из 1% пептона (Gibco, США), 0.5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ Na_2HPO_4 , 50 мМ K_2HPO_4 , 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0.5% глицерола, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы.

В среду RYP-5052, содержащую канамицин в концентрации 100 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. Ферментацию проводили при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об. мин. в течение 20 часов до отсутствия существенного изменения OD_{600} за 1 час. Отбирали аликвоту клеток на анализ экспрессии гена, кодирующего гибридный белок, методом электрофореза в ПААГ, а оставшуюся биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.

Осажденные клетки лизировали с помощью 3 циклов соникации по 30 сек с перерывом в 2 мин на льду. Затем проводили разрушение тельц включения путем инкубации с лизирующим буфером, содержащим 500мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 6М гуанидин гидрохлорид, 500 мМ хлористый натрий, в течение часа. К клеткам, собранным центрифугированием из 50 мл культуры, добавляли по 8 мл лизирующего буфера.

Колонку, содержащую Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивали буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). Разрушенные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 30 мМ имидазол). Элюировали белок с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 200мМ имидазол). Собирали фракции по 1 мл, анализировали электрофоретически в 12% ПААГ-ДДС-Na,

фракции с целевым белком объединяли, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорд.

Получили препараты белков (SEQ ID NO.:1-4) чистотой около 97-98%, по данным SDS-PAGE, концентрация гибридного белка в каждом препарате составила 1-2 мг/мл.

Пример 3. Получение высокоочищенных гибридных белков с использованием эукариотического организма

3.1. Получение высокоочищенных гибридных белков с использованием клеток грибов.

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные (1731 п.н.), одновременно проведя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках дрожжей *Pichia pastoris* в ручном режиме и добавив фланкирующие ген области для получения секретируемого белка, по инструкции к вектору для клонирования. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Полученные гены клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pHIL-S1, по инструкции к вектору.

Подготавливали клетки дрожжей к трансформации. Провели культивирование и заморозку клеток *Pichia pastoris* штамма SMD1163, дефектного по нескольким протеазам дрожжей, что обеспечивает стабильность секретируемого белка. Клетки высевали в стерильных условиях на агар в среде YPD (1%- дрожжевой экстракт, 2%- пептон, 2%- глюкоза, 1 мМ дитиотрейтол), культивировали при 30°C, затем пересевали в суспензию и культивировали в течение 16 ч. Часть клеток ресуспендировали в YPD среде с добавлением 15% глицерина и замораживали при -86°C. Для получения компетентных клеток предварительно выращивали колонии клеток в чашке с агаром в YPD среде при 30°C в течение двух дней. Затем содержимое одной колонии выращивали в 10 мл YPD среды при 30°C в течение 16 ч. Разбавляли суспензию в YPD до ОП₆₀₀ 0.2 и конечного объема 10 мл и выращивали культуру до ОП₆₀₀ 0-8 в течение 4 часов. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 500 g, выливали супернатант, ресуспендировали в 10 мл раствора I из набора для трансформации EasyComp Transformation Kit, вновь центрифугировали и ресуспендировали осадок в растворе I. Аликвоты компетентных клеток по 50-200 мкл разливали в стерильные пробирки объемом 1.5 мл, которые хранили при температуре -90°C до использования.

Для трансформации использовали набор EasyComp Transformation Kit, входящий в состав *Pichia Easy Select Kit* (Invitrogen), реакцию проводили по инструкции к набору. Полученную суспензию клеток рассеивали в стерильную чашку на агаровый гель,

приготовленный на среде YPD с добавлением 1М сорбитола и антибиотика ампициллина в конечной концентрации 100 мкг/мл. Через 3 суток получили несколько десятков колоний на чашку. Клетки из выросших колоний переносили на чашку с MMD (minimal medium dextrose)-агаром и культивировали чашку 2 дня при 30°C.

Клетки выросших на селективной среде колоний переносили в колбы и культивировали в 5 мл среды MGY на качалке (250 об/мин.) в течение 1 суток до ОП₆₀₀ 5. После этого клетки осаждали центрифугированием при 3000 g 10 мин. Контроль экспрессии целевого гена осуществляли методом SDS-PAGE.

После осаждения клеток питательную среду фильтровали (диаметр пор 45 мкм), затем добавляли Трис-HCl pH 6.0 до конечной концентрации 20 mM. Среду культивирования, содержащую гибридный белок, концентрировали в 5-10 раз, используя концентраторы для белков с молекулярной массой более 10 кДа фирмы "Millipore".

После концентрирования препарат гибридного белка нагревали на водяной бане до кипения ($t=100^{\circ}\text{C}$) и кипятили 2 минуты, после чего центрифугировали при 4°C, 15000×g 15 минут.

Проводили ионообменную хроматографию на КМ-сефарозе. Колонку с КМ-сефарозой уравнивали буфером, содержащим 20 mM Трис-HCl pH 6.0. Препарат гибридного белка наносили со скоростью 60 мл/час. Колонку промывали 20 mM Трис-HCl pH 6.0; 20 mM Трис-HCl pH 6.0, 200 mM NaCl. Элюцию проводили 20 mM Трис-HCl pH 6.0, 1 M NaCl и собирали фракции по 1 мл.

Препарат полученного гибридного белка разбавляли в 2 раза, добавляли фосфат pH 8.0 до концентрации 50 mM и наносили на колонку. После промывки колонки буфером нанесения балластные белки удаляли промывкой раствором 20 mM имидазола в том же буфере. Белок элюировали раствором, содержащим 200 mM имидазола.

В результате были получены препараты гибридных белков с чистотой выше 95%.

Было отобрано четыре штамма-продуцента четырех таргетных гибридных белков, для которых выявлено наличие на электрофореграммах полос, соответствующих по молекулярной массе целевым белкам. Для полученных штаммов характерен высокий уровень экспрессии таргетных белков.

3.2. Получение высокоочищенных гибридных белков (SEQ ID NO.:1-4) с использованием клеток млекопитающих.

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные (1731 п.н.), одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии

в клетках CHO в ручном режиме и добавив сайты для клонирования в вектор pEGFP-N1. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Полученные гены клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pEGFP-N1, по инструкции к вектору. Экспрессируемые гибридные белки были слиты с белком eGFP, оптимизированным для более яркой флуоресценции и высокой экспрессии в клетках млекопитающих.

Линию клеток CHO-K1 культивировали на среде DMEM, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 35 мг/л L-пролина, а также коммерческий антибиотик Мусокилл-АВ (РАА Laboratories) в рабочей концентрации. Пересев клеток производили 1 раз в 5 дней при концентрации клеток 10^5 клеток на 1 см^2 , с разведением 1:20. Клетки культивировали при температуре 37°C , в атмосфере 5%-ного CO_2 и высокой влажности.

Данную культуру клеток трансфецировали полученной плазмидой, кодирующей гибридный белок, для каждого гибридного белка.

Клетки в количестве 70-80% от монослоя ($8 \cdot 10^4$ клеток на 1 см^2) промывали культуральной средой, не содержащей сыворотки. Подготавливали трансфекционную смесь: 3-4 мкг линейаризованной плазмидной ДНК смешивали с 375 мкл культуральной среды, не содержащей сыворотки. В отдельной пробирке с таким же количеством аналогичной среды смешивали коммерческий трансфецирующий реагент Lipofectamine 2000, количество которого определяли соотношением 3 мкл реактива на 1 мкг плазмидной ДНК. После этого полученные растворы объединяли и инкубировали при комнатной температуре в течение 30-40 минут.

Полученную трансфекционную смесь наслаивали на промытые клетки. По прошествии 4-6 часов после начала трансфекции трансфекционную смесь заменяли на культуральную среду DMEM с сывороткой.

Уровень экспрессии целевого гена оценивали по интенсивности флуоресценции на вторые сутки после трансфекции (36-48 часов) при помощи проточной цитофлуориметрии. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансфецированные клетки линии CHO-K1.

Для проведения цитофлуориметрического анализа клетки промывали фосфатно-солевым буфером, трипсинизировали и снимали с чашек Петри. Затем дважды отмывали от трипсина и тщательно ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Полученную суспензию (10^6 клеток в 1 мл буфера) переносили в 5 мл круглодонные пробирки.

Напряжение каналов проточного цитофлуориметра подбиралось таким образом, чтобы аутофлуоресценция нетрансфицированных клеток не учитывалась при проведении измерений. Для этого напряжение в каналах FL1 (в котором и детектируется флуоресценция eGFP) и FL2 (который использовали в качестве контрольного пустого канала) изменяли так, чтобы в процессе измерений подавляющее большинство клеток, не содержащих ген eGFP, оказалось в области, не превышающей значение «10» на логарифмической шкале, отложенной для каналов FL1 и FL2.

После проведения калибровки все образцы измерялись при постоянных значениях напряжений по каналам FL1 и FL2. Так, если в клетках детектировали флуоресценцию eGFP, на логарифмической шкале по каналу FL1 фиксировалось появление клеток в области, превышающей значение «10», и все количественные значения уровня экспрессии гена измерялись именно в этой области.

После проведения трансфекции полученные пулы культивировали согласно описанному выше протоколу.

Для того, чтобы избавиться от клеток, не содержащих трансген, производилась селекция полученных пулов трансфицированных клеток при помощи коммерческого антибиотика неомицина, вводимого в концентрации 800 мкг/мл. Отбирали стабильные клеточные линии, каждая получена из одной трансфицированной клетки и, таким образом, характеризующиеся однородным генотипом, что позволяет отобрать наиболее эффективный клон.

Индивидуальные клеточные клоны были получены из тотальных клеточных популяций методом лимитирующих разведений после 50 и 75 суток культивирования.

Культивируемые пулы снимали с планшетов и разводили в 10 мл культуральной среды. После этого концентрация клеток подсчитывалась при помощи камеры Горяева, и производили дополнительные разведения таким образом, чтобы концентрация клеток составляла 2-3 клетки на миллилитр среды. Полученную суспензию переносили в 24-луночные планшеты по 1 мл на лунку.

После 2 недель культивирования на среде DMEM, содержащей антибиотик неомицин в концентрации 800 мкг/мкл, производили цитофлуориметрический анализ выживших клонов. Дальнейшее поддержание полученных линий и анализ уровня экспрессии EGFP производили согласно методике, описанной для пулов трансфицированных клеток.

Основным количественным показателем экспрессионной активности гибридного гена в данном случае служила медиана распределения клеток по интенсивностям флуоресценции.

Достаточно высокий уровень экспрессии EGFP наблюдали у 2 клонов с введенной конструкцией, содержащей ген, соответствующий SEQ ID NO.:1, 1 клон с введенной конструкцией, содержащей ген, соответствующий SEQ ID NO.:2, 2 клонов с введенной конструкцией, содержащей ген, соответствующий SEQ ID NO.:3 и 2 клонов с введенной конструкцией, содержащей ген, соответствующий SEQ ID NO.:4.

После двух с половиной месяцев культивирования экспрессионная активность клонов, содержащих конструкцию с геном интереса, составила в среднем около 70% от исходной. Продуцируемый белок очищали с помощью анионообменной хроматографии на Q-сефарозе при pH 7,0. Выход целевого белка для полученных продуцентов составил 13-16 мг/л.

Возможно получение гибридных белков согласно изобретению в секретируемом виде.

На N-конце аминокислотной последовательности каждого гибридного белка поместили сигнальную последовательность ТРА (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein [*Homo sapiens*], NCBI Reference Sequence: NP_000921.1). Перевели аминокислотные последовательности белков в нуклеотидные, кодонно оптимизировав последние для экспрессии в клетках млекопитающих (CHO) с помощью программы на сайте <http://www.encorbio.com/protocols/Codon.htm> и добавив сайты для клонирования в вектор pcDNA3.1(+). Синтезировали рассчитанные гены химически. Клонировали синтезированный ген в вектор pcDNA3.1(+) по инструкции к вектору.

Трансфекцию клеток млекопитающих созданными плазмидами проводили методом кальций-фосфатного осаждения.

Для проведения трансформации клеток млекопитающих (CHO) плазмидными ДНК клетки высевали в 12-и луночные планшеты (Costar, США) с плотностью посева 5×10^4 кл/см². На следующий день для синхронизации клеточных делений культуральную среду заменяли. Через три часа к клеткам добавляли плазмидную ДНК, осажденную фосфатом кальция. Для приготовления осадка 250 мкл раствора, содержащего 50 мкг ДНК в 250 мМ CaCl₂, медленно смешивали с 250 мкл раствора (1,64% NaCl, 1,13% HEPES pH 7,12 и 0,04% Na₂HPO₄). После 24 часов инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO₂ среду заменяли на аналогичную, содержащую 100 мкг/мл неомицина для селекции клонов, содержащих

плазмиды со вставкой таргетного гена и, следовательно, экспрессирующих гибридные белки, селекцию проводили в течение 20 суток, в лунках, содержащих живые клетки, меняли среду (при этом предыдущую культуральную среду не выливали, а использовали для определения количества секретируемых белков методом ИФА), а еще через сутки клетки снимали с подложки и проводили анализ на экспрессию трансформированных генов. Анализ эффективности трансфекции проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL Beckman Coulter (Beckman Coulter, США).

Уровень гибридных белков в культуральной среде полученных стабильных трансфектом линии CHO оценивали с использованием стандартного твердофазного ИФА.

В результате клонирований были получены стабильные трансфектоты CHO, которые накапливали для криоконсервирования и наработки опытной партии гибридных белков. Продуктивность созданных трансфектом CHO, экспрессирующих гибридные белки, составила 400-520 мкг/10⁷ клеток/день.

Культивирование клеток-продуцентов осуществляли с использованием биореактора BIOSTAT® Bplus и автоклавированной среды IMDM с добавлением 45 г DFBS (0,5%) и 25,8 г (100 мМ) сульфата цинка семиводного (ZnSO₄ x 7H₂O) на 9 л среды. Задавали рабочий режим: температура 37°C, pH 6,9-7,2, концентрация кислорода 50% насыщения воздуха. После достижения заданного режима производили засев биореактора, для чего в асептических условиях в него вводили посевной материал. Время культивирования составляло 3 суток.

По окончании культивирования культуральную жидкость фильтровали через стерильную капсулу «Sartopure» («Sartorius», Германия), с диаметром пор 1,2 мкм, со скоростью 1 л/мин. Затем осветленную жидкость концентрировали на системе Viva Flow 200 («Sartorius», Германия) с использованием фильтра. Концентрирование проводили до достижения общего объема - 200 мл.

Хроматографическую очистку проводили в два этапа, с использованием стерильных растворов. На первом этапе использовали систему BioLogic DuoFlow Pathfinder (Bio-Rad) с автоматическим коллектором фракций BioFract и полупрепаративную хроматографическую колонку YMC TriArt, 250x4,6 мм, сорбент C18. Перед началом работы колонку уравнивали с помощью 200 мл буфера (1 кг воды для инъекций и 1 г кислоты трифторуксусной) в ручном режиме через насос хроматографа на скорости 2 мл/мин.

Подготовленный материал в объеме 200 мл вносили в хроматограф через насос хроматографа на скорости 0,5 мл/мин. Элюцию производили буфером (2 кг ацетонитрила,

2 г кислоты трифторуксусной) со скоростью 0,5 мл в минуту. Собирали фракцию в максимуме поглощения при 260 нм. Объем фракции составил примерно 500 мл.

Второй этап очистки выполняли с использованием гель-хроматографической колонки BioSil SEC 125-5, 300x7,8 мм. Предварительно колонку уравнивали 0,02 М PBS-буфером. Полученный материал вносили в хроматограф через насос хроматографа на скорости 0,5 мл/мин. Элюцию производили буфером (0,6 М раствор NaCl) с градиентом концентрации от 0,1 до 0,6 М. Собирали фракцию, имеющую поглощение при λ 280 нм не менее 3,4 оптических единиц. Фракцию собирали во флаконы. Объем получаемого раствора для каждого препарата белка составил примерно 1 л с концентрацией гибридного белка 1,8-2,5 мг на 1 мл.

Гибридные белки согласно изобретению возможно получить с использованием также других клеток млекопитающих, например, HEK293, COS.

3.3. Получение высокоочищенных гибридных белков (SEQ ID NO.:1-4) с использованием растений.

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные (1731 п.н.), одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках *Nicotiana benthamiana* в ручном режиме и добавив фланкирующие ген области по инструкции к вектору для клонирования. Синтезировали рассчитанные гены химически и клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pTRV1. Возможно использовать и вирусный вектор (например, описанный в статье Комарова Т.В., Скулачев М.В., Зверева А.С., Шварц А.М., Дорохов Ю.Л., Атабеков И.Г. (2006) Новый вирус-вектор для эффективной продукции целевых белков в растениях. Биохимия, 71(8), 1043-1049).

Полученный вектор вводили в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, который использовали для инфильтрации листьев *N. benthamiana*. Полученный штамм *Agrobacterium tumefaciens*, несущий гибридные гены, культивировали в течение 12 ч при 30°C в шейкере. Клетки (1,5 мл) осаждали центрифугированием (4000g, 5 мин), осадок ресуспендировали в буфере (1,5 мл: 10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH 5.5)), ОП₆₀₀ доводили до 0,2. Наносили суспензию агробактерий шприцом без иглы на листья растущих растений *N. benthamiana*. Наблюдали максимальный уровень синтеза белков на 7-11 сутки после инфильтрации.

Экспрессию гибридных белков в клетках листьев растений-продуцентов анализировали с использованием электрофореза в ПААГ с ДДС Na. Фрагмент листа

растирали в буфере (10 mM KCl, 50 mM Трис pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10 mM β-меркаптотанол, 0.4 M сахароза, 10% глицерин) на 10 день после заражения. Полученный экстракт подвергали центрифугированию (14000g, 10 мин), осадок и супернатант анализировали с использованием SDS-ПААГ. На электрофореграмме выявлены белки, соответствующие по молекулярному весу гибридным белкам согласно изобретению, в мембранной фракции клеток. В контроле, растениях, которые не подвергались трансформации, соответствующие белки не выявлены. Выход белков составлял около 10-12% фракции нерастворимых белков.

Исходя из полученных результатов, заявляемые гибридные белки возможно получить с использованием и прокариотических, и эукариотических клеточных систем, высокоочищенный препарат каждого белка можно получить с использованием различных типов очистки белка. Приведенные условия выделения и очистки подбирались экспериментальным путем и могут варьировать в известных среднему специалисту в этой области значениях.

Пример 3. Демонстрация профилактического эффекта вакцины на основе гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1, либо SEQ ID NO.:2, либо SEQ ID NO.:3, либо SEQ ID NO.:4

Эксперимент выполнен на белых мышах неинбредных линий (Питомник лабораторных животных «Рапполово»). Животные, весом 19-22 г, содержались в стандартных условиях, при температуре окружающей среды +27±2°C с постоянной влажностью воздуха 55%, при 12-часовом световом дне, получали сухой стандартизованный корм и воду без ограничения.

Для моделирования туберкулеза использован стандартный тест-штамм *M. tuberculosis Erdman*. Микобактериальная суспензия для заражения мышей приготовлена *ex tempore* из трехнедельного штамма, культивируемого на среде Левенштейна-Йенсена. Заражающая доза – 10⁶ КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора, путь введения - в латеральную хвостовую вену.

Группы животных (число мышей в группе):

Интактные (6) – К-

Контроль заражения (4) – К+

Вакцинация БЦЖ (14) - 1

Вакцинация гибридным белком, охарактеризованным SEQ ID NO.:1 (11), в/м - 2

Вакцинация гибридным белком, охарактеризованным SEQ ID NO.:1, и/н (12) – 3.

Осуществляли однократную иммунизацию БЦЖ и двукратную иммунизацию вакциной на основе гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1, с интервалом в две недели. Использовали дозу 50 мкг белка на мышь, вводили в объеме 100 мкл внутримышечно или 10 мкл – интраназально, по 5 мкл в каждую ноздрю. Для доведения требуемого объема использовали физиологический раствор. Заражение осуществляли через две недели после последней вакцинации.

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

Определяли показатели тяжести течения туберкулезной инфекции.

Индекс поражения легких (ИПЛ) устанавливали по совокупности экссудативных и продуктивных изменений в условных единицах - баллах [Александрова А.Е., Ариэль Б.М. Оценка тяжести туберкулезного процесса в легких мышей // Пробл. туб. 1993. - №3. - С. 52-53].

Экссудативные изменения:

- легкие воздушны – 0
- единичные безвоздушные очаги – 0,25
- легкие безвоздушны на 1/2 - 0,5
- легкие безвоздушны на 2/3 – 0,75
- легкие безвоздушны на всем протяжении – 1,0

Продуктивные очаги:

- единичные субмилиарные очаги - 0,5
- многочисленные (не более 20) - 1,0
- многочисленные субмилиарные (более 20) - 1,5
- единичные милиарные - 1,75
- многочисленные сливающиеся субмилиарные и единичные милиарные - 2,0
- многочисленные милиарные (не более 10) - 2,25
- многочисленные милиарные, сливающиеся - 2,75
- появление мелких казеозных некротических фокусов - 3,0
- обширный казеоз - 4,0
- сплошное поражение легких - 5,0

Определяли бактериологические показатели. Проводили дозированный посев гомогената ткани легких на плотную яичную среду Левенштейна-Йенсена методом серийных разведений (3 и 4 разведение). Определяли массивность роста микобактерий и

рассчитывали индекс защиты органа. Массивность роста микобактерий выражали в десятичном $\log$ (lg) от числа КОЕ на массу легких. Расчет индекса защиты органа осуществляли по разнице между lg КОЕ иммунизированных мышей и lg КОЕ мышей группы контроля заражения. При оценке результатов положительным эффектом по задержке роста микобактерий считается индекс защиты $\geq 0,5$ lg.

Результаты приведены на Фиг. 1-4. Так, по индексу поражения легких (ИПЛ) (Фиг. 1) лидирующую позицию заняла вакцина на основе гибридного белка, введенная внутримышечно, группа 2, данный показатель оказался минимальными среди сравниваемых групп, на втором месте оказалась вакцина на основе гибридного белка, введенная интраназально, группа 3, на третьем - БЦЖ, группа 1. Однако именно вакцина на основе гибридного белка, введенная интраназально, группа 3, показала наилучший результат по показателю десятичного логарифма числа жизнеспособных бактерий в легких (Фиг. 2) и индекса защиты, как по сравнению с невакцинированными животными (Фиг. 3), так и по сравнению с БЦЖ (Фиг. 4). Индекс защиты вакцины на основе гибридного белка и при внутримышечном, и при интраназальном введении оказался выше $\geq 0,5$ lg, что говорит о наличии положительного эффекта по задержке роста микобактерий данной вакциной. Индекс защиты по сравнению с БЦЖ (Фиг. 4) вакцины на основе гибридного белка при интраназальном введении, группа 3, составил 0,35.

Таким образом, продемонстрирована высокая эффективность противотуберкулезной вакцины на основе гибридного белка на основе антигенов Ag85B и TB10.4 *M.tuberculosis*, а также рекомбинантного адьюванта - флагеллина FliC *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, которая оказалась больше, чем таковая БЦЖ, в профилактической модели, на лабораторных животных, и при внутримышечном, и при интраназальном введении. Возможны и иные парентеральные, либо иные мукозальные способы введения данной вакцины. Различия между группами животных достоверны.

Также продемонстрирована безопасность предлагаемой вакцины: животные соответствующих групп (групп 2 и 3) выжили и были выведены из эксперимента принудительно, в процессе испытаний побочные эффекты не наблюдали.

Аналогичные исследования с использованием вакцины на основе белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:2, либо SEQ ID NO.:3, либо SEQ ID NO.:4, продемонстрировали схожие результаты.

Пример 4. Демонстрация терапевтического эффекта вакцины на основе гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1, либо SEQ ID NO.:2, либо SEQ ID NO.:3, либо SEQ ID NO.:4

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

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

Осуществляли введение иммуногена через 6 дней после заражения. Использовали дозу 50 мкг гибридного белка на мышь, вводили в объеме 100 мкл внутримышечно или 10 мкл – интраназально, по 5 мкл в каждую ноздрю. Для доведения требуемого объема использовали физиологический раствор.

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

Группы животных (n – число мышей в группе):

Интактные (8) – К-

Контроль заражения (5) – К+

Изониазид 10 мг/кг (15) - 1

Терапевтическая вакцинация гибридным белком, охарактеризованным SEQ ID NO.:2, 5 раз в неделю, в/м (15) - 2

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

У животных, получавших наряду с этиотропной терапией вакцину на основе гибридного белка, отмечено значительное уменьшение коэффициента массы легких и ИПЛ, а также выражено снижение высеваемости микобактерий из селезенки. Аналогичные исследования с использованием вакцины на основе белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:2, либо SEQ ID NO.:3, либо SEQ ID NO.:4, продемонстрировали схожие результаты.

Таким образом, использование вакцины на основе гибридного белка вместе с этиотропной терапией экспериментального туберкулеза значительно повышает ее эффективность.

Гибридный белок, ДНК, генетическая конструкция, продуцент, вакцина на основе гибридного белка для профилактики и лечения туберкулеза (варианты)

Перечень последовательностей

<110> Духовлинов И.В., Орлов А.И., Федорова Е.А., Черняева Е.Н.

<120> Гибр. белок, ДНК, ген. констр., прод-т, вакц. на осн. гибр. белка для проф. и леч. туб-за (вар-ты)

<150> RU 2015119607

<151> 2015-05-25

<160> 4

<210> 1

<211> 546

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<400> 1

Met	Ala	Gln	Val	Ile	Asn	Thr	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Gln	Asn
1				5					10					15	
Asn	Leu	Asn	Lys	Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Gly	Thr	Ala	Ile	Glu	Arg	Leu
			20					25					30		
Ser	Ser	Gly	Leu	Arg	Ile	Asn	Ser	Ala	Lys	Asp	Asp	Ala	Ala	Gly	Gln
		35					40					45			
Ala	Ile	Ala	Asn	Arg	Phe	Thr	Ala	Asn	Ile	Lys	Gly	Leu	Thr	Gln	Ala
	50					55					60				
Ser	Arg	Asn	Ala	Asn	Asp	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	Gln	Thr	Thr	Glu	Gly
65					70					75				80	
Ala	Leu	Asn	Glu	Ile	Asn	Asn	Asn	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Ala
				85					90					95	
Val	Gln	Ser	Ala	Asn	Ser	Thr	Asn	Ser	Gln	Ser	Asp	Leu	Asp	Ser	Ile
			100					105					110		
Gln	Ala	Glu	Ile	Thr	Gln	Arg	Leu	Asn	Glu	Ile	Asp	Arg	Val	Ser	Gly
		115					120					125			
Gln	Thr	Gln	Phe	Asn	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Asn	Thr	Leu
	130					135					140				
Thr	Ile	Gln	Val	Gly	Ala	Asn	Asp	Gly	Glu	Thr	Ile	Asp	Ile	Asp	Leu
145					150					155				160	
Lys	Gln	Ile	Asn	Ser	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
			165					170					175		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Glu	Asn	Pro	Leu	Gln
		180					185						190		
Lys	Ile	Asp	Ala	Ala	Leu	Ala	Gln	Val	Asp	Thr	Leu	Arg	Ser	Asp	Leu
		195					200					205			
Gly	Ala	Val	Gln	Asn	Arg	Phe	Asn	Ser	Ala	Ile	Thr	Asn	Leu	Gly	Asn
	210					215					220				
Thr	Val	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Ile	Glu	Asp	Ser	Asp
225					230					235				240	
Tyr	Ala	Thr	Glu	Val	Ser	Asn	Met	Ser	Arg	Ala	Gln	Ile	Leu	Gln	Gln
				245					250					255	
Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Ala	Asn	Gln	Val	Pro	Gln	Asn	Val
			260				265						270		
Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Met	Ala	Gly	Ser
		275				280						285			
Ser	Ala	Met	Ile	Leu	Ala	Ala	Tyr	His	Pro	Gln	Gln	Phe	Ile	Tyr	Ala
	290					295					300				
Gly	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Gln	Gly	Met	Gly	Pro	Ser
305					310					315				320	
Leu	Ile	Gly	Leu	Ala	Met	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ala	Ala	Asp
				325					330					335	
Met	Trp	Gly	Pro	Ser	Ser	Asp	Pro	Ala	Trp	Glu	Arg	Asn	Asp	Pro	Thr
			340					345					350		
Gln	Gln	Ile	Pro	Lys	Leu	Val	Ala	Asn	Asn	Thr	Arg	Leu	Trp	Val	Tyr
		355					360					365			
Cys	Gly	Asn	Gly	Thr	Pro	Asn	Glu	Leu	Gly	Gly	Ala	Asn	Ile	Pro	Ala
	370					375					380				
Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Phe	Val	Arg	Ser	Ser	Asn	Leu	Lys	Phe	Gln	Asp

385					390					395				400
Ala	Tyr	Asn	Ala	Ala	Gly	Gly	His	Asn	Ala	Val	Phe	Asn	Phe	Pro
				405					410					415
Asn	Gly	Thr	His	Ser	Trp	Glu	Tyr	Trp	Gly	Ala	Gln	Leu	Asn	Ala
			420					425					430	Met
Lys	Gly	Asp	Leu	Gln	Ser	Ser	Leu	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		435					440					445		
Ser	Ser	Met	Ser	Gln	Ile	Met	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Ala	Met	Leu	Gly
		450				455					460			His
Ala	Gly	Asp	Met	Ala	Gly	Tyr	Ala	Gly	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Gly
465					470					475				480
Glu	Ile	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Gln	Ser	Ala	Trp	Gln	Gly
				485					490					495
Thr	Gly	Ile	Thr	Tyr	Gln	Ala	Trp	Gln	Ala	Gln	Trp	Asn	Gln	Ala
			500					505					510	Met
Glu	Asp	Leu	Val	Arg	Ala	Tyr	His	Ala	Met	Ser	Ser	Thr	His	Glu
		515				520						525		Ala
Asn	Thr	Met	Ala	Met	Met	Ala	Arg	Asp	Thr	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys
		530				535					540			Trp
Gly	Gly													
545														

<210> 2

<211> 546

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<400> 2

Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Ala	Met	Ile	Leu	Ala	Ala	Tyr	His	Pro	Gln	Gln
1				5				10						15	
Phe	Ile	Tyr	Ala	Gly	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Gln	Gly
			20					25					30		
Met	Gly	Pro	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Ala	Met	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Tyr
		35				40						45			
Lys	Ala	Ala	Asp	Met	Trp	Gly	Pro	Ser	Ser	Asp	Pro	Ala	Trp	Glu	Arg
		50				55				60					
Asn	Asp	Pro	Thr	Gln	Gln	Ile	Pro	Lys	Leu	Val	Ala	Asn	Asn	Thr	Arg
65				70					75					80	
Leu	Trp	Val	Tyr	Cys	Gly	Asn	Gly	Thr	Pro	Asn	Glu	Leu	Gly	Gly	Ala
			85					90						95	
Asn	Ile	Pro	Ala	Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Phe	Val	Arg	Ser	Ser	Asn	Leu
			100					105						110	
Lys	Phe	Gln	Asp	Ala	Tyr	Asn	Ala	Gly	Gly	His	Asn	Ala	Val	Phe	
		115					120					125			
Asn	Phe	Pro	Pro	Asn	Gly	Thr	His	Ser	Trp	Glu	Tyr	Trp	Gly	Ala	Gln
		130				135					140				
Leu	Asn	Ala	Met	Lys	Gly	Asp	Leu	Gln	Ser	Ser	Leu	Gly	Ala	Gly	Gly
145					150					155				160	
Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Met	Ser	Gln	Ile	Met	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Ala
				165					170					175	
Met	Leu	Gly	His	Ala	Gly	Asp	Met	Ala	Gly	Tyr	Ala	Gly	Thr	Leu	Gln
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Gln	Ser	Ala
		195					200					205			
Trp	Gln	Gly	Asp	Thr	Gly	Ile	Thr	Tyr	Gln	Ala	Trp	Gln	Ala	Gln	Trp
		210				215					220				
Asn	Gln	Ala	Met	Glu	Asp	Leu	Val	Arg	Ala	Tyr	His	Ala	Met	Ser	Ser
225					230					235				240	
Thr	His	Glu	Ala	Asn	Thr	Met	Ala	Met	Met	Ala	Arg	Asp	Thr	Ala	Glu
				245					250					255	
Ala	Ala	Lys	Trp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Met	Ala	Gln
			260					265					270		
Val	Ile	Asn	Thr	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Gln	Asn	Asn	Leu	Asn
		275					280					285			
Lys	Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Gly	Thr	Ala	Ile	Glu	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly

290	295	300
Leu Arg Ile Asn Ser Ala	Lys Asp Asp Ala Ala	Gly Gln Ala Ile Ala
305	310	315
Asn Arg Phe Thr Ala Asn	Ile Lys Gly Leu Thr	Gln Ala Ser Arg Asn
	325	330
Ala Asn Asp Gly Ile Ser	Ile Ala Gln Thr Thr	Glu Gly Ala Leu Asn
	340	345
Glu Ile Asn Asn Asn Leu	Gln Arg Val Arg Glu	Leu Ala Val Gln Ser
	355	360
Ala Asn Ser Thr Asn Ser	Gln Ser Asp Leu Asp	Ser Ile Gln Ala Glu
	370	375
Ile Thr Gln Arg Leu Asn	Glu Ile Asp Arg Val	Ser Gly Gln Thr Gln
385	390	395
Phe Asn Gly Val Lys Val	Leu Ala Gln Asp Asn	Thr Leu Thr Ile Gln
	405	410
Val Gly Ala Asn Asp Gly	Glu Thr Ile Asp Ile	Asp Leu Lys Gln Ile
	420	425
Asn Ser Gln Thr Leu Gly	Leu Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Ser Gly
	435	440
Gly Gly Ser Ala Ala Thr	Thr Thr Glu Asn Pro	Leu Gln Lys Ile Asp
	450	455
Ala Ala Leu Ala Gln Val	Asp Thr Leu Arg Ser	Asp Leu Gly Ala Val
465	470	475
Gln Asn Arg Phe Asn Ser	Ala Ile Thr Asn Leu	Gly Asn Thr Val Asn
	485	490
Asn Leu Thr Ser Ala Arg	Ser Arg Ile Glu Asp	Ser Asp Tyr Ala Thr
	500	505
Glu Val Ser Asn Met Ser	Arg Ala Gln Ile Leu	Gln Gln Ala Gly Thr
	515	520
Ser Val Leu Ala Gln Ala	Asn Gln Val Pro Gln	Asn Val Leu Ser Leu
	530	535
Leu Arg		540
545		

<210> 3

<211> 546

<212> PPT

<213> Искусственная последовательность

<400> 3

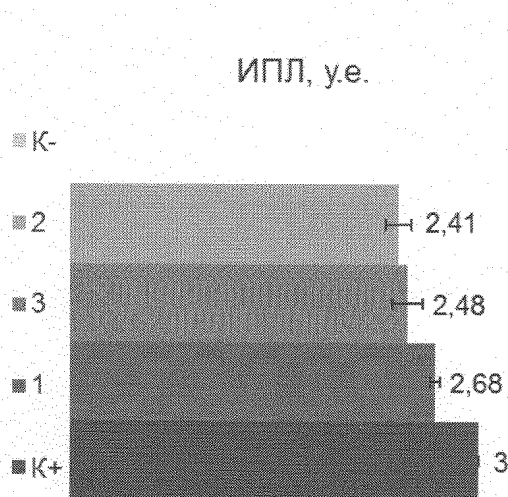
Met Ala Gln Val Ile Asn	Thr Asn Ser Leu Ser	Leu Leu Thr Gln Asn
1	5	10
Asn Leu Asn Lys Ser Gln	Ser Ala Leu Gly Thr	Ala Ile Glu Arg Leu
	20	25
Ser Ser Gly Leu Arg Ile	Asn Ser Ala Lys Asp	Asp Ala Ala Gly Gln
	35	40
Ala Ile Ala Asn Arg Phe	Thr Ala Asn Ile Lys	Gly Leu Thr Gln Ala
	50	55
Ser Arg Asn Ala Asn Asp	Gly Ile Ser Ile Ala	Gln Thr Thr Glu Gly
65	70	75
Ala Leu Asn Glu Ile Asn	Asn Asn Leu Gln Arg	Val Arg Glu Leu Ala
	85	90
Val Gln Ser Ala Asn Ser	Thr Asn Ser Gln Ser	Asp Leu Asp Ser Ile
	100	105
Gln Ala Glu Ile Thr Gln	Arg Leu Asn Glu Ile	Asp Arg Val Ser Gly
	115	120
Gln Thr Gln Phe Asn Gly	Val Lys Val Leu Ala	Gln Asp Asn Thr Leu
	130	135
Thr Ile Gln Val Gly Ala	Asn Asp Gly Glu Thr	Ile Asp Ile Asp Leu
145	150	155
Lys Gln Ile Asn Ser Gln	Thr Leu Gly Leu Gly	Gly Gly Ser Gly Gly
	165	170
Gly Ser Gly Gly Gly Ser	Ala Ala Thr Thr Thr	Glu Asn Pro Leu Gln
	180	185
Lys Ile Asp Ala Ala Leu	Ala Gln Val Asp Thr	Leu Arg Ser Asp Leu

Гибридный белок, ДНК, генетическая конструкция, продуцент, вакцина на основе гибридного белка для профилактики и лечения туберкулеза (варианты)

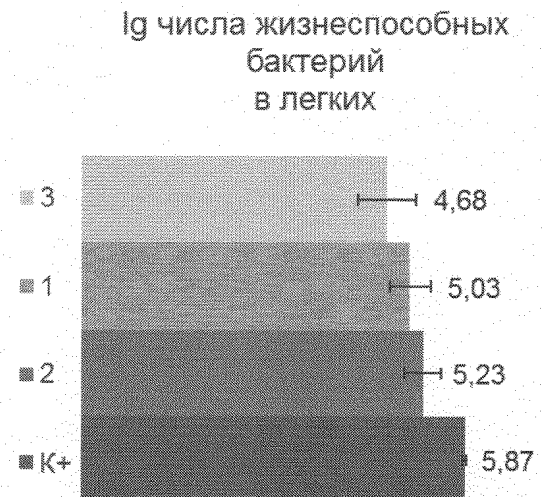
Формула изобретения

1. Гибридный белок, включающий иммуногенные фрагменты белков Ag85B, Tb10.4 *Mycobacterium tuberculosis*, флагеллина FliC *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, компоненты конструкции соединены гибкими мостиками, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1, либо SEQ ID NO.:2, либо SEQ ID NO.:3, либо SEQ ID NO.:4.
2. Полинуклеотид, кодирующий гибридный белок по п.1, кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках продуцента гибридного белка.
3. Генетическая конструкция для экспрессии в клетках продуцента полинуклеотида по п.2, включающая полинуклеотид по п.2 и иные элементы, позволяющие реализовать указанное назначение.
4. Продуцент гибридного белка по п.1.
5. Продуцент по п.4, характеризующийся тем, что представлен прокариотическим организмом.
6. Продуцент по п.4, характеризующийся тем, что представлен эукариотическим организмом.
7. Вакцина для профилактики и лечения туберкулеза, содержащая гибридный белок по п.1 в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор.
8. Вакцина по п.7, характеризующаяся тем, что потребитель – человек, либо животное.

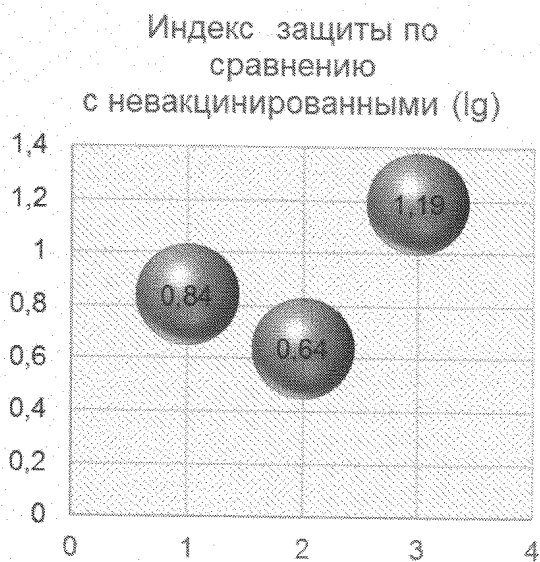
Гибридный белок, ДНК, генетическая конструкция,
 продуцент, вакцина на основе гибридного белка
 для профилактики и лечения туберкулеза (варианты)



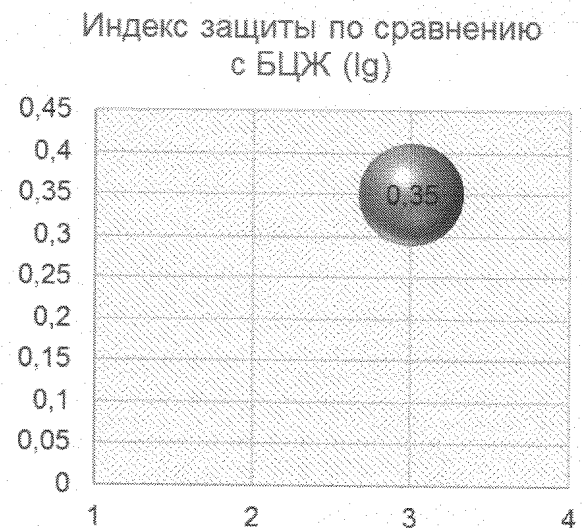
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4