

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091308** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.09.11

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

(22) Дата подачи заявки
2018.11.26

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ BRUCELLA ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БРУЦЕЛЛЕЗА**

(31) 17382798.1

(32) 2017.11.24

(33) EP

(86) PCT/EP2018/082539

(87) WO 2019/101993 2019.05.31

(71) Заявитель:
**КОНСЕХО СУПЕРИОР
ДЕ ИНВЕСТИГАСИОНЕС
СЪЕНТИФИКАС (КСИС);
УНИВЕРСИДАД ПУБЛИКА ДЕ
НАВАРРА (ES)**

(72) Изобретатель:

**Грильо Дольсет Мария Хесус, Сан
Роман Аберастури Беатрис, Паласиос
Чавес Лейре, Мена Буэно Сара,
Сабальса Барангва Ана (ES)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящая заявка относится к модифицированному штамму Brucella, его применению в качестве лекарственного средства и его применению в качестве лекарственного средства для лечения и/или профилактики бруцеллеза. Штамм Brucella был модифицирован путем инактивации гена wzm. Кроме того, настоящая заявка относится к фармацевтической композиции, которая содержит модифицированный штамм Brucella, к ее применению в качестве лекарственного средства и ее применению в качестве лекарственного средства для лечения и/или профилактики бруцеллеза. Настоящая заявка также относится к набору, который содержит модифицированный штамм Brucella и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, и к его применению для лечения и/или профилактики бруцеллеза.

A1

202091308

202091308

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563666EA/022

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ *Brucella* ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БРУЦЕЛЛЕЗА

Область техники

Настоящее изобретение может быть включено в область новых терапевтических средств для лечения и/или профилактики бруцеллеза. Конкретно, настоящая заявка относится к новому вакцинному штамму рода *Brucella*. Штамм может быть использован в качестве лекарственного средства, в частности, для лечения и/или профилактики бруцеллеза.

Уровень техники

Бруцеллез представляет собой зооноз. У животных бруцеллезная инфекция вызывает выкидыши, бесплодие, снижение продуктивности и ограничения, связанные с торговлей животными и продуктами животного происхождения. Кроме того, бактерии передаются от инфицированных животных людям, вызывая тем самым изнурительное и часто инвалидизирующее заболевание, против которого нет вакцины, и для лечения которого требуются высокие дозы антибиотиков в течение длительных периодов с частыми рецидивами.

Таким образом, бруцеллез является серьезной проблемой общественного здравоохранения. Было показано, что распространенность бруцеллеза у людей напрямую связана с распространенностью бруцеллеза у животных. Таким образом, и при отсутствии вакцин для применения у людей для предотвращения заболевания требуется контроль над инфекцией у животных. В большинстве социально-экономических условий единственным возможным способом борьбы с бруцеллезом являются программы на основе вакцинации сельскохозяйственных животных, либо программы массовой вакцинации, либо программы вакцинации, диагностики и забоя инфицированных животных.

Эталонными вакцинами против бруцеллеза животных являются гладкие (S) штаммы *Brucella abortus* S19 для крупного рогатого скота и *Brucella melitensis* Rev1 для овец и коз (OIE Terrestrial Manual, 2016 - chapters 2.4.3. and 2.7.2). Обе являются живыми аттенуированными вакцинами, без адъювантов, с низкой стоимостью производства и приобретения, и высокоэффективны против инфекции полевыми штаммами у жвачных (основной источник инфекции для людей). Однако технический недостаток заключается в том, что они генерируют иммунный ответ после вакцинации, неотличимый от того, который индуцируется после вирулентной инфекции полевыми штаммами, создавая проблему для дифференциации между инфицированными и вакцинированными животными (DIVA). Чтобы решить эту проблему, были предприняты многочисленные научные усилия. Одна из стратегий заключалась в разработке шероховатых (R) штаммов *Brucella*, которые из-за отсутствия O-полисахарида (O-PS) липополисахарида (LPS) - известного фактора вирулентности *Brucella* и основного антигена, используемого в тестах серологической диагностики инфекции, привели к получению ослабленных штаммов,

пригодных для использования в качестве живых вакцин, которые существенно не интерферируют в серологических диагностических тестах. В этом контексте в 90-х годах путем субкультивирования был разработан спонтанный мутант с фенотипом R, известный как *B. abortus* RB51 (Schurig et al., 1991. *Veterinary Microbiology*, 28: 171-188). Штамм RB51 использовался в некоторых странах против бруцеллеза крупного рогатого скота с противоречивыми результатами. Как RB51, так и коллекция мутантов R, полученных из *B. melitensis*, генетически достаточно охарактеризованных в различных путях синтеза LPS (Godfroid et al., 2000. *Res Microbiol*, 151: 655-668; González et al., 2008. *PLoS One*, 3 (7): e2760), уменьшают проблемы с интерференцией в серологической диагностике вирулентной инфекции, из-за отсутствия антигена O-PS. Однако было показано, что вакцины R неидеальны, потому что защита, которую они обеспечивают от вирулентных инфекций, намного ниже, чем у контрольных вакцин *B. abortus* S19 и *B. melitensis* Rev1 (González et al., 2008. *PLoS One*, 3 (7): e2760; Barrio et al., 2009. *Vaccine*, 27: 1741-1749).

С другой стороны, для решения проблемы DIVA было предложено бактериальное мечение ксеногенным Зеленым Флуоресцентным Белком (GFP) (Chacón-Díaz et al., 2011). *Vaccine*. 29 (3): 577-82).

Кроме того, современные вакцины также имеют другие проблемы, такие как индукция выкидыша и присутствие в молоке взрослых животных, ранее вакцинированных (OIE Terrestrial Manual, 2016 - chapters 2.4.3. и 2.7.2), возникновение инфекции у человека и, в случае *B. melitensis* Rev1, резистентность к стрептомицину (антибиотик выбора). Следовательно, в настоящее время существует потребность в эффективной вакцине против бруцеллеза и/или в терапевтическом средстве, которые не обладают всеми вышеупомянутыми недостатками.

Задачей настоящего изобретения является создание улучшенного штамма *Brucella* для лечения и/или профилактики бруцеллеза.

Чертежи

Фигура 1: Диаграмма, показывающая стратегию метода делеции с помощью двойной рекомбинации в рамке, используемой для получения штаммов *Brucella* Δ wzm и сиблинга (немутантный).

Фигура 2: Генетическая оценка мутантов и штаммов *Brucella* Δ wzm, комплементированных плазмидами pSRK-wzm или pBBR-wzm. Наличие (319 п.н.) или отсутствие (без амплификации) полного гена wzm оценивали с помощью ПЦР с F9 и R5 (Таблица 1). MW: маркер молекулярной массы; 1: Rev1 сиблинг; 2: Rev1 Δ wzm; 3: Rev1 Δ wzm-pSRK-wzm; Pc1: плазида для комплементации pSRK-wzm; Pm: плазида для мутации pJQKm- Δ wzm; C-: отрицательный контроль ПЦР; 4: 16M сиблинг; 5: 16Mwwm; 6: 16M Δ wzm-pBBR-wzm; Pc2: pBBR-wzm; 7: 2308 сиблинг; 8: 2308 Δ wzm; 9: 2308 Δ wzm-pBBR-wzm; 10: S19 сиблинг; 11: S19 Δ wzm; 12: S19 Δ wzm-pBBR-wzm.

Фигура 3: мутанты *Brucella* Δ wzm (верхние панели) показали фенотип по окрашиванию кристаллическим фиолетовым-оксалатом, в отличие от штаммов сиблингов (нижние панели).

Фигура 4: Мутанты *Brucella*Δwzm имеют R-LPS с интактным ядром и синтезируют свободный O-PS, который накапливается внутри бактерий. Комплементация этих штаммов *B. melitensis* и *B. abortus* Δwzm с плазмидами pSRK-wzm или pBBR-wzm восстанавливает фенотип S-LPS. Репрезентативные изображения окрашивания (А) LPS серебром Rev1Δwzm, 16MΔwzm, 2308Δwzm и S19Δwzm. (В) Вестерн-блот с сыворотками, распознающими эпитопы O-PS М в Rev1Δwzm, С в 16MΔwzm или А в 2308Δwzm и S19Δwzm; 1: Rev1 сиблинг; 2: Rev1Δwzm; 3: Rev1Δwzm-pSRK-wzm; 4: 16M сиблинг; 5: 16Mwzm; 6: 2308 сиблинг; 7: 2308Δwzm; 8: 2308Δwzm-pBBR-wzm; 9: S19 сиблинг; 10: S19Δwzm; 11: S19Δwzm-pBBR-wzm. (С) Иммунофлуоресцентная и эпифлуоресцентная микроскопия 16MΔwzm::gfp-pBBR-wzm, 16MΔwzm::gfp и 16M сиблинг с использованием первичного моноклонального антитела против С-эпитопа O-PS и вторичного антитела, меченного техасским красным.

Фигура 5: Rev1Δwzm более восприимчив к стрептомицину, чем Rev1. Экспоненциально растущие бактерии доводили до $\approx 2 \times 10^3$ КОЕ/мл в стерильном PBS и 100 мкл в трех экземплярах высевали в ВAB и ВAB с добавлением 2,5 г/мл стрептомицина (ВAB-Str2,5). В качестве контроля использовали штамм-сиблинг Rev1 (Rev1). После 5 дней инкубации при 37°C рассчитывали количество КОЕ/мл. Данные представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение (n=3). Результаты являются репрезентативными для трех независимых экспериментов. Статистические сравнения значений были выполнены с помощью тестов ANOVA и PLSD.

Фигура 6: 16MΔwzm более восприимчив высыханию, чем 16M, но не Rev1Δwzm по отношению к Rev1. Суспензии, содержащие $\approx 10^9$ КОЕ/мл 16MΔwzm, 16M, Rev1Δwzm или Rev1, оставляли сушиться в 12-луночных полистирольных планшетах и затем выдерживали при комнатной температуре в условиях темноты. Количество жизнеспособных клеток определяли количественно после регидратации высушенного осадка в PBS, и процент выживших бактерий определяли шесть дней спустя. Точки на графике представляют среднее значение \pm стандартное отклонение (n=3). Статистические сравнения средних значений были выполнены с помощью тестов ANOVA и PLSD.

Фигура 7: Rev1Δwzm более восприимчив к полимиксину В, чем 16MΔwzm, и родительские и штаммы-сиблинги Rev1 и 16M, которые использовали в качестве модели восприимчивости к катионным пептидам врожденной иммунной системы. Культуры с $2-3 \times 10^3$ КОЕ/мл в PBS инкубировали (1 час, 37 °C) с различными концентрациями полимиксина В, приготовленного в PSA, и затем определяли количество жизнеспособных клеток путем посева в ВAB и инкубации планшетов (5 дней, 37 °C). Точки на графике представляют собой среднее \pm стандартное отклонение (n=3) КОЕ/мл при каждой концентрации полимиксина В. Статистические сравнения средних значений были выполнены с помощью тестов ANOVA и PLSD: *p < 0,0001.

Фигура 8: Rev1Δwzm и 16MΔwzm более чувствительны, чем родительские штаммы Rev1 и 16M к обычным сывороткам овец и крупного рогатого скота, в основном из-за влияния комплемента сыворотки. Бактериальные культуры, содержащие $\approx 10^4$ КОЕ/мл в

PBS, смешивали с нормальной или декомплементированной (инактивированной нагреванием 56 °C, 1 час) сывороткой овец (А) или коров (В). После инкубации (18 ч, 37 °C) каждую суспензию высеивали на ВАВ и планшеты инкубировали (5 дней, 37 °C), чтобы определить количество КОЕ/мл и процент выживания бактерий. Мутант *B. melitens* с минимальным кором (С+), использовали в качестве контроля чувствительности к нормальной сыворотке. Результаты выражены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n=3) процента выживаемости. Статистические сравнения значений были выполнены с помощью тестов ANOVA и PLSD.

Фигура 9: *Rev1Δwzm* более аттенуирован у мышей BALB/c, чем другие мутанты *BrucellaΔwzm*, и индуцировал пик транзиторной спленомегалии, обычно связанной с эффективной иммуногенной активностью. Панели представляют бактериальную нагрузку в селезенке и массу селезенки у мышей BALB/c, внутрибрюшинно инокулированных (А-В) *Rev1Δwzm* и *Rev1Δwzm :: gfp* против родительского штамма *Rev1*; (С-Д) *16MΔwzm* и *16MΔwzm :: gfp* против родительского штамма *16M*; (Е-Ф) *2308Δwzm* против родительского штамма *2308*; и (G-H) *S19Δwzm* против штамма *S19*. Мутанты *Δwzm* вводили в дозах 10⁸ КОЕ/мышь, а штаммы S-LPS - в 10⁶ КОЕ/мышь. Результаты выражены как среднее ± стандартное отклонение (n=5) log КОЕ/селезенка или грамм массы/селезенка в каждый выбранный момент времени. Аналогичные результаты были получены с соответствующими мечеными штаммами *Brucella::Tn7-gfp*, что указывает на то, что мечение *gfp* не влияет на биологические свойства *Brucella*.

Фигура 10: *Rev1Δwzm* и *16MΔwzm* (правая панель) не вызывают макроскопических поражений плаценты, в отличие от *Rev1* или *16M* родительских или штаммов-двойников (левая панель). Стрелки указывают на макроскопические повреждения в отдельных плацентах, в отличие от здоровой плаценты в *Rev1Δwzm* или *16MΔwzm*.

Фигура 11: Серологический ответ против *Brucella* LPS у овец, вакцинированных *Rev1Δwzm::gfp* или *16MΔwzm::gfp*. Ягнят в возрасте 3-4 месяцев вакцинировали подкожно 1-2×10¹⁰ КОЕ с *Rev1Δwzm::gfp* (n=14) или *16MΔwzm::gfp* (n=8). Группы ягнят, не вакцинированных (n=13) или вакцинированных 1-2×10⁹ КОЕ *Rev1::gfp* (n=12), использовали в качестве контроля. Безвредность оценивали в течение первого месяца после вакцинации путем клинического осмотра (температура тела ректально и пальпация места инокуляции) и пальпации яичек. Образцы сыворотки периодически отбирали для серологического анализа с помощью (А) пробы роз-бенгал (sRBT), (В) связывания комплемента (CFT), (С) реакции диффузии в геле против антигена R-LPS (GDT-R/LPS) и (D) тестов ИФА против GFP (только для ягнят, вакцинированных *16MΔwzm::gfp*).

Фигура 12: Эксперимент уничтожения бактерий. Термообработанные (называемые на Фигуре обработанными сывороткой) и необработанные иммунные сыворотки ягнят, вакцинированных *Rev1Δwzm*, инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 10% CO₂ с вирулентными инфекциями *B. melitensis* H38 и *B. abortus* 2308. Результаты выражали в виде стандартизированного процента количества бактерий относительно исходного количества в инокуляте. Иммунные сыворотки от ягнят, обработанных *Rev1Δwzm*, были

способны уничтожать либо *B. melitensis* H38, *B. abortus* 2308, либо *B. ovis* PA.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящая заявка относится к модифицированному штамму *Brucella*, его применению в качестве лекарственного средства и его применению в качестве лекарственного средства для лечения и/или профилактики бруцеллеза. Штамм *Brucella* был модифицирован путем инактивации гена *wzm*. Кроме того, настоящая заявка относится к фармацевтической композиции, которая содержит модифицированный штамм *Brucella*, ее применению в качестве лекарственного средства и ее применению в качестве лекарственного средства для лечения и/или профилактики бруцеллеза. Настоящая заявка также относится к набору, который содержит модифицированный штамм *Brucella* и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, и его применению для лечения и/или профилактики бруцеллеза.

Подробное описание изобретения

Определения

Термины «лечение» и «терапия», используемые в настоящей заявке, относятся к набору гигиенических, фармакологических, хирургических и/или физических средств, используемых с целью излечения и/или облегчения заболевания и/или симптомов с целью исправления проблем со здоровьем. Термины «лечение» и «терапия» включают профилактические и лечебные методы, поскольку оба они направлены на поддержание и/или восстановление здоровья человека или животного. Независимо от происхождения симптомов, заболевания и инвалидности, введение подходящего лекарственного средства для облегчения и/или лечения проблемы со здоровьем должно интерпретироваться как форма лечения или терапии в контексте данной заявки.

Термин «профилактика», используемый в настоящей заявке, относится к набору гигиенических, фармакологических, хирургических и/или физических средств, используемых для предотвращения возникновения и/или развития заболевания и/или симптомов. Термин «профилактика» охватывает профилактические методы, поскольку они используются для поддержания здоровья животного или человека.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству вещества, которое оказывает терапевтическое действие и которое способно лечить и/или предотвращать бруцеллез.

Термин «бруцеллез» относится к инфекционному заболеванию, вызываемому бактериями рода *Brucella*. Бруцеллез может встречаться у людей или животных.

Термины «индивидуум», «пациент» или «субъект» используются взаимозаменяемо в настоящей заявке и никоим образом не предназначены для ограничения. «Индивидуум», «пациент» или «субъект» могут быть любого возраста, пола и физического состояния. Термин «животное», используемый в настоящей заявке, относится к любому многоклеточному эукариотическому гетеротрофу, который не является человеком.

Термин «вакцина», используемый в настоящей заявке, относится как к «терапевтическим вакцинам», которые предназначены для лечения существующего

заболевания и/или инфекции путем усиления естественного иммунного ответа организма, так и к «профилактическим вакцинам», которые предназначены для предотвращения развития заболевания и/или инфекции у здорового человека или животного.

Термин «модифицированный» относится к любому предмету, который был изменен по сравнению с его первоначальной формой. В настоящей заявке термин «модифицированный» относится к любому изменению, которое зависит от вмешательства человека.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый разбавитель» означает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, совместимые с фармацевтическим введением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и, без ограничения объема настоящего изобретения, включают: дополнительные буферные агенты; консерванты; соразтворители; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); биodeградируемые полимеры, такие как сложные полиэфиры; солеобразующие противоионы, такие как натрий, многоатомные сахарные спирты; аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота и треонин; органические сахара или сахарные спирты, такие как лактит, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибит, миоинизитоза, миоинизит, галактоза, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозит), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; и гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS). Предпочтительно, pH PBS составляет 6,85.

Термин «фармацевтически приемлемый адъювант» относится к любым веществам, которые усиливают иммунный ответ организма на антиген. Неограничивающими примерами фармацевтически приемлемых адъювантов являются: квасцы, неполный адъювант Фрейнда, MF59, синтетические аналоги дцРНК, такие как поли (I:C), бактериальный LPS, бактериальный флагеллин, имидазолхинолины, олигодезоксинуклеотиды, содержащие специфические мотивы CpG, фрагменты клеток бактерий, такие как мурамилдипептид и Quil-A®.

Модифицированный штамм *B. melitensis* Rev1

В первом аспекте настоящая заявка относится к модифицированному штамму

Brucella melitensis Rev1, в котором ген *wzm* инактивирован.

Brucella melitensis Rev1 представляет собой штамм, который спонтанно ослабляется и получается из вирулентного штамма *B. melitensis* 6056 путем последовательных спонтанных мутаций, связанных с зависимостью от стрептомицина (Str) и последующей реверсии этой зависимости (Herzberg and Elberg 1953). *Journal of Bacteriology* 66: 585-599; Herzberg and Elberg 1953. *Journal of Bacteriology* 66: 600-605). Штамм Rev1 используется во всем мире с 50-х годов как единственная эффективная вакцина для профилактики бруцеллеза у мелких жвачных животных, и во всем мире считается стандартной вакциной для борьбы с бруцеллезом овец и коз (OIE Terrestrial Manual, 2016 - chapters 2.4.3. and 2.7.2). Оригинальные партии посевного материала Rev1 доступны в Справочной лаборатории по бруцеллезу OIE AFSSA (94706 Maisons-Alfort, Франция) или в Европейской фармакопее (BP 907, 67029 Strasbourg Cedex 1, Франция). Кроме того, штамм Rev1 коммерчески доступен и может быть куплен у различных поставщиков. Например, штамм можно купить у CZV Veterinaria в Испании под названием «CZV Rev1».

Ген *wzm* кодирует часть двухкомпонентной ABC-транспортерной системы, необходимой для экспорта O-PS в периплазму, где O-PS затем собирается на коровом компоненте для генерации S-LPS. Ген *wzm* может иметь следующую последовательность (SEQ ID NO: 1):

```
ATGATATCGTATATGGCTAATGTCTGGAAGGTACGCCACTTCTGGTGGCACCT
TTCAATGTCTGATTTACGTGGGCGCTTCAGGCGGTCCTCCTTGGGAATATTATGGGC
AGTTATACAGCCACTAGCGCTCACGCTGCTACTGTCTTTTCGTGTTTTCTAAATTGTTG
AATCAAAGTATATCTGCATATGCCCCCTATATTCTATCTGGGATTATTATCTGGGAAT
ACATATCATTTACAGTGGTTGGTGGCTCAACAGCGCTTGTGCAAGCCGATGCATATA
TAAAGCAAACCAGAAATCCTCTTGCAATTTACACGCTTAGGAACACTGTTTCTGGCT
TGGTCGTATTATCCGTAGCAAGTATCTCCCTATTCGGGTGGGTACTTATCATGTTTCC
TGAAAACCTTCTCGCTTTCATGGTTAGCAATACCAACTTTGCTACCCATCCTTGCTTTG
ATAGTTTGGCCGCTTGCCACAATCGTCGGCTACATCGGCGCAAGATTTTCGAGATCTG
CCGAATGCTCTGGCGCTCGTGTTACAGGCAGCTTGGTTTGTTCGCCGGTCTATTTTA
AAGAATCGATGTTTCAGGCAGGGTGGATTGAATGCATTCGTTGATTATAACCSTATTT
ACCACGTGATGCAGATTCTAAGAGCCCCTGTCSTTTATGGGGAATGGCCTACGGCTA
CCAATTACATTTGGTGCTTAGGTGTGAGCCTCCTCCTAACCTGCGTGGCAGTAGCTG
TGGGGATGCGTGCGGAGAAGAGAGCCATTTTTTACSTATGA
```

Ген *wzm* может быть инактивирован посредством любой формы генетической модификации, известной в данной области. Инактивация может включать частичную или полную делецию гена из генома хозяина. Инактивация может включать единственную бессмысловую мутацию, которая делает экспрессированный белок нефункциональным. Инактивация может включать мутацию и/или делецию промотора, сайта связывания рибосомы или других регуляторов транскрипции, которые участвуют в транскрипции гена *wzm*. Инактивация может включать вставку последовательности, которая вызывает сдвиг рамки и/или приводит к тому, что полученный образующийся белок не функционирует.

Любая из вышеупомянутых делеций, вставок или мутаций может быть выполнена с использованием аллельного обмена (Hmelo et al., 2015. *Nature Protocols*, 10 (11): 1820-41) или с использованием системы CRISPR/Cas9 (Wang et al., 2016. *ACS Synthetic Biology*, 5 (7): 721-32). В предпочтительном варианте осуществления ген *wzt* не инактивирован.

В предпочтительном варианте осуществления инактивация гена *wzm* обусловлена частичной делецией гена. Предпочтительно, частичная делеция включает делецию по меньшей мере 50, 60 или 70% SEQ ID NO: 1. Более предпочтительно, частичная делеция включает делецию по меньшей мере 80% SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте осуществления инактивация гена *wzm* не достигается путем введения транспозона в кодирующую последовательность гена.

В примерах настоящего изобретения нуклеотиды 80-721 SEQ ID NO: 1 были удалены в *V. melitensis* Rev1 и 16M с использованием плазмиды аллельного обмена pJQKm Δ wzm, которая генерирует соответствующие мутанты Δ wzm (Фигура 1). Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления инактивация гена *wzm* достигается посредством делеции нуклеотидов 80-721 SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный штамм *V. melitensis* Rev1 был дополнительно модифицирован для инактивации *znuA*, *norD*, *bip*, *tcpB*, *cgs*, *ricA*, *bvrR*, *bvrS*, одного или более генов, кодирующих систему секреции *virB* типа IV, выбранную из группы, состоящей из *V. melitensis* 16M ORF: ВМЕП0025, ВМЕП0026, ВМЕП0027, ВМЕП0028, ВМЕП0029, ВМЕП0030, ВМЕП0031, ВМЕП0032, ВМЕП0033, ВМЕП0034 и ВМЕП0035, и/или одного или более генов, участвующих в формировании, модификации и/или сборке LPS и/или в метаболических путях, включая, но не ограничиваясь *pppDK*, *wbdR*, *gmd*, *manA*, *manB*, *manC*, *per*, *pgm*, *wbkA*, *wbkB*, *wbkC*, *wbkD*, *wbkF*, *wadC* и *wzt* (хромосомные области *wbk*, *wbo* и *wad*).

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный штамм *V. melitensis* Rev1 был дополнительно модифицирован таким образом, что активность аутологичной N-формилтрансферазы была подавлена, и гетерологичный ген, кодирующий N-ацилтрансферазу, отличную от фермента N-формилтрансферазы, функционально экспрессируется. Например, *wbkC* может быть инактивирован, и гетерологичный *wbdR* может быть введен и экспрессирован в штамме (см. WO 2017/108515 A1).

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный штамм *V. melitensis* Rev1 был дополнительно модифицирован для экспрессии флуоресцентного белка, предпочтительно GFP. Экспрессия флуоресцентного белка в модифицированном штамме может быть использована для дальнейшей дифференциации индивидуумов или животных с инокулированным Rev1 и инфицированных индивидуумов или животных (Chacón-Díaz et al., 2011. *Vaccine*. 29 (3): 577-82; EP2 508 201 A1). Вкратце, этот подход может быть описан следующим образом: когда индивидуум или животное вакцинируют дополнительно модифицированным штаммом, антитела будут продуцироваться против модифицированного штамма, а также против флуоресцентного белка. Антитела, полученные против флуоресцентного белка, можно использовать в серологическом тесте,

чтобы проверить, был ли человек или животное инфицировано природным штаммом *Brusella* или другим модифицированным штаммом по настоящему изобретению. Таким образом, набор, который содержит модифицированный штамм *B. melitensis* Rev1, который был дополнительно модифицирован для экспрессии флуоресцентного белка, может дополнительно содержать антитела, которые связываются с флуоресцентным белком, и/или флуоресцентный белок. Предпочтительно флуоресцентный белок представляет собой GFP.

В предпочтительном варианте осуществления штамм был лиофилизирован. Лиофилизация может быть использована для увеличения стабильности и срока годности штамма.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит модифицированный штамм в соответствии с любым из ранее раскрытых вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и/или фармацевтически приемлемый адъювант.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит модифицированный штамм *B. melitensis* Rev1, который был дополнительно модифицирован для экспрессии флуоресцентного белка.

Фармацевтическая композиция, как описано в настоящем описании, также может содержать другие вещества. Эти вещества включают, но не ограничиваются ими, криопротекторы, лиопротекторы, поверхностно-активные вещества, наполнители, антиоксиданты и стабилизаторы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть лиофилизирована.

Термин «криопротектор», используемый в настоящем описании, включает агенты, которые обеспечивают устойчивость штамма к стрессам, вызванным замерзанием, благодаря преимущественному исключению с поверхности штамма. Криопротекторы могут также обеспечивать защиту при первичной и вторичной сушке и длительном хранении продукта. Неограничивающие примеры криопротекторов включают сахара, такие как сахароза, глюкоза, трегалоза, маннит, манноза и лактоза; полимеры, такие как декстран, гидроксипропилкрахмал и полиэтиленгликоль; поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, PS-20 или PS-80); и аминокислоты, такие как глицин, аргинин, лейцин и серин. Обычно используют криопротектор, проявляющий низкую токсичность в биологических системах.

В одном варианте осуществления лиопротектор добавляют в фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе. Используемый в настоящем описании термин «лиопротектор» включает агенты, которые обеспечивают стабильность штамму во время процесса сублимационной сушки или дегидратации (первичный и вторичный циклы сублимационной сушки), обеспечивая аморфную стеклообразную матрицу и связываясь с поверхностью штамма через водородные связи, заменяя молекулы воды, которые удаляются в процессе сушки. Это помогает минимизировать деградацию продукта во время цикла лиофилизации и улучшить долговременную стабильность продукта. Неограничивающие примеры лиопротекторов включают сахара, такие как сахароза или

трегалоза; аминокислоту, такую как глутамат натрия, некристаллический глицин или гистидин; метиламин, такой как бетаин; лиотропную соль, такую как сульфат магния; полиол, такой как трехатомные спирты или спирты с высоким содержанием сахара, например глицерин, эритрит, глицерин, арабит, ксилит, сорбит и маннит; пропиленгликоль; полиэтиленгликоль; плуроники; и их комбинации. Количество лиопротектора, добавляемого в фармацевтическую композицию, обычно представляет собой количество, которое не приводит к недопустимому количеству деградации штамма, когда фармацевтическая композиция лиофилизирована.

В некоторых вариантах осуществления наполнитель входит в состав фармацевтической композиции. Используемый в настоящем описании термин «наполнитель» включает агенты, которые обеспечивают структуру лиофилизованного продукта без непосредственного взаимодействия с фармацевтическим продуктом. В дополнение к получению фармацевтически идеального лекарства наполнители могут также придавать полезные качества в отношении изменения температуры разрушения, обеспечения защиты от замерзания-оттаивания и повышения стабильности штамма в течение длительного хранения. Неограничивающие примеры наполнителей включают маннит, глицин, лактозу и сахарозу. Наполнители могут быть кристаллическими (такими как глицин, маннит или хлорид натрия) или аморфными (такими как декстран, гидроксипропилкрахмал) и обычно используются в составах в количестве от 0,5% до 10%.

Другие фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, такие как описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), также могут быть включены в фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, при условии, что они не оказывают вредного влияния на желательные характеристики фармацевтической композиции. Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, совместимые с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают: дополнительные буферные агенты; консерванты; соразтворители; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); биodeградируемые полимеры, такие как сложные полиэфиры; солеобразующие противоионы, такие как натрий, многоатомные сахарные спирты; аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота и треонин; органические сахара или сахарные спирты, такие как лактит, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибит, миоинизитоза, миоинизит, галактоза, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозит), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион,

тиоктовая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; и гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит адьювант. Предпочтительно адьювант выбирают из списка, состоящего из квасцов, неполного адьюванта Фрейнда, MF59®, синтетических аналогов дцРНК, таких как поли (I:C), бактериальный LPS, бактериальный флагеллин, имидазолхинолины, олигодезоксинуклеотиды, содержащие специфические мотивы CpG, фрагменты бактериальной клеточной стенки, такие как мурамил дипептид и Quil-A®.

Фармацевтическая композиция может быть получена для перорального, подъязычного, буккального, внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрибрюшинного, конъюнктивального, ректального, чрескожного, топического и/или осуществляемого ингаляцией введения. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой раствор, который подходит для внутривенного, внутримышечного, конъюнктивального, чрескожного, внутрибрюшинного и/или подкожного введения. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой раствор, который подходит для подъязычного, буккального и/или ингаляционного пути введения. В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой аэрозоль, который подходит для осуществляемого ингаляцией введения. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть приготовлена для подкожного и/или внутрибрюшинного введения.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать обычные эксципиенты и носители, которые известны в данной области. Для твердых фармацевтических композиций можно использовать обычные нетоксичные твердые носители, которые включают, например, маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлозу, глюкозу, сахарозу, карбонат магния фармацевтической категории и тому подобное. Для раствора для инъекций фармацевтическая композиция может дополнительно содержать криопротекторы, лиопротекторы, поверхностно-активные вещества, наполнители, антиоксиданты, стабилизирующие агенты и фармацевтически приемлемые носители. Для аэрозольного введения фармацевтические композиции обычно поставляются в тонкоизмельченной форме вместе с поверхностно-активным веществом и пропеллентом. Поверхностно-активное вещество, конечно, должно быть нетоксичным и, как правило, растворимым в пропелленте. Представителями таких агентов являются сложные эфиры или неполные сложные эфиры жирных кислот, содержащих от 6 до 22 атомов углерода, таких как сложные эфиры капроновой, октановой, лауриновой, пальмитиновой, стеариновой, линолевой, линоленовой, «olesteric» и олеиновой кислот с алифатическим многоатомным спиртом или его циклическим ангидридом., Могут быть использованы смешанные сложные эфиры, такие как смешанные или природные

глицериды. При желании также может быть включен носитель, такой как, например, лецитин для интраназальной доставки. Для суппозиториев традиционные связующие вещества и носители могут включать, например, полиалкиленгликоли или триглицериды.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой вакцину, способную индуцировать иммунный ответ. Дизайн фармацевтических композиций для вакцин хорошо известен и описан, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Co., Easton, PA, и в Plotkin and Orenstein's book entitled Vaccines, 4th Ed., Saunders, Philadelphia, PA (2004).

Медицинские применения модифицированного штамма Rev1

В третьем аспекте штамм или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно использовать в качестве лекарственного средства. В четвертом аспекте модифицированный штамм или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно использовать для лечения и/или профилактики бруцеллеза.

В предпочтительном варианте осуществления инфекционный агент, вызывающий бруцеллез, выбран из группы, состоящей из *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. ceti* и *B. pinnipedialis*. Предпочтительно инфекционный агент, вызывающий бруцеллез, выбран из группы, состоящей из *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. ovis*.

В предпочтительном варианте осуществления штамм или фармацевтическая композиция используется для лечения и/или профилактики бруцеллеза у людей, крупного рогатого скота, коз, овец, свиней и/или собак. Предпочтительно штамм или фармацевтическую композицию используют для лечения и/или профилактики бруцеллеза у коз и/или овец.

В предпочтительном варианте осуществления индивидууму или животному инокулируют по меньшей мере 10^4 КОЕ (колониеобразующих единиц) штамма. Предпочтительно, индивидууму или животному инокулируют по меньшей мере 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} КОЕ штамма. Более предпочтительно, индивидууму или животному инокулируют по меньшей мере 10^9 КОЕ штамма. В альтернативном варианте осуществления индивидууму или животному инокулируют от 10^4 до 10^{12} КОЕ штамма.

В предпочтительном варианте осуществления штамм или фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутрикочно, внутривенно, внутрибрюшинно, через слизистые оболочки и/или конъюнктивально. Предпочтительно штамм или фармацевтическую композицию вводят подкожно. В альтернативном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят посредством конъюнктивального введения.

В предпочтительном варианте осуществления штамм или фармацевтическая композиция используются для предотвращения бруцеллеза. В этом варианте осуществления штамм или фармацевтическую композицию вводят в качестве профилактической вакцины. Предпочтительно штамм или фармацевтическую композицию вводят индивидууму или животному, которые могут подвергнуться риску заражения бактериями рода *Brucella*.

В одном варианте осуществления модифицированный штамм или фармацевтическая композиция используются для лечения бруцеллеза. В предпочтительном варианте осуществления лечение бруцеллеза также включает введение лекарственного средства. Также предусмотрены варианты осуществления, в которых лекарственное средство вводят в то же время или в другое время, что и модифицированный штамм или фармацевтическую композицию. Лекарственное средство может быть выбрано из группы, состоящей из кортикостероидов, пенициллинов, цефалоспоринов, макролидов, хлорамфеникола, тетрациклинов, аминогликозидов, триметоприма, рифампина, хинолонов и сульфаметоксазола.

Набор, содержащий модифицированный штамм Rev1

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему (i) модифицированный штамм *B. melitensis* Rev1, в котором ген *wzm* инактивирован, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Модифицированный штамм может соответствовать любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. Кроме того, фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель может представлять собой любой из вышеупомянутых фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, описанных в настоящей заявке. В предпочтительном варианте осуществления набор содержит инструкции о том, как комбинировать штамм с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный штамм представляет собой лиофилизат. Лيوфилизат может содержаться в отдельном от фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя контейнере. Кроме того, набор может содержать инструкции о том, как комбинировать лиофилизированный штамм с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

В предпочтительном варианте осуществления набор может дополнительно содержать адъювант. Предпочтительно адъювант выбирают из списка, состоящего из квасцов, неполного адъюванта Фрейнда, MF59®, синтетических аналогов дцРНК, таких как поли (I:C), бактериального LPS, бактериального флагеллина, имидазолхинолинов, олигодезоксинуклеотидов, содержащих специфические мотивы CpG, фрагментов бактериальной клеточной стенки, таких как мурамилдипептид и Quil-A®.

В предпочтительном варианте осуществления инструкции, включенные в набор, могут также описывать введение штамма индивидууму или животному. Схема введения может включать дозировку, которую следует использовать, частоту введения и/или способ введения, который следует использовать.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к применению любого из описанных наборов для лечения и/или профилактики бруцеллеза. Применение набора может соответствовать любому медицинскому применению и способам введения, описанным в настоящей заявке.

Модифицированный штамм *B. melitensis* 16M

В седьмом аспекте настоящая заявка относится к модифицированный штамм *V. melitensis* 16M, в котором ген *wzm* инактивирован.

«*V. melitensis* 16M» хорошо охарактеризован и доступен в Американской коллекции типовых культур (ATCC 23456).

Ген *wzm* может быть инактивирован посредством любой формы генетической модификации, известной в данной области. Инактивация может включать частичную или полную делецию гена из генома хозяина. Инактивация может включать единственную несмысловую мутацию, которая делает экспрессированный белок нефункциональным. Инактивация может включать мутацию и/или делецию промотора, сайта связывания рибосомы или других регуляторов транскрипции, которые участвуют в транскрипции гена *wzm*. Инактивация может включать вставку последовательности, которая вызывает сдвиг рамки и/или приводит к тому, что полученный образующийся белок не функционирует. Любая из вышеупомянутых делеций, вставок или мутаций может быть выполнена с использованием аллельного обмена (Hmelo et al., 2015. *Nature Protocols*, 10 (11): 1820-41) или с использованием системы CRISPR/Cas9 (Wang et al., 2016. *ACS Synthetic Biology*, 5 (7): 721-32). В предпочтительном варианте осуществления ген *wzt* не инактивирован.

В предпочтительном варианте осуществления инактивация гена *wzm* обусловлена частичной делецией гена. Предпочтительно частичная делеция включает делецию по меньшей мере 50, 60 или 70% SEQ ID NO: 1. Более предпочтительно, частичная делеция включает удаление по меньшей мере 80% SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте осуществления инактивация гена *wzm* не достигается путем введения транспозона в кодирующую последовательность гена.

В предпочтительном варианте осуществления инактивация гена *wzm* достигается посредством делеции нуклеотидов 80-721 SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный штамм *V. melitensis* 16M был дополнительно модифицирован для инактивации *znuA*, *norD*, *bip*, *tcpB*, *cgs*, *ricA*, *bvrR*, *bvrS*, одного или более генов, кодирующих систему секреции *virB* типа IV, выбранную из группы, состоящей из *V. melitensis* 16M ORF: ВМЕП0025, ВМЕП0026, ВМЕП0027, ВМЕП0028, ВМЕП0029, ВМЕП0030, ВМЕП0031, ВМЕП0032, ВМЕП0033, ВМЕП0034 и ВМЕП0035, и/или одного или более генов, участвующих в формировании, модификации и/или сборке LPS и/или в метаболических путях, включая, но не ограничиваясь этим, *ppdK*, *wbdR*, *gmd*, *manA*, *manB*, *manC*, *per*, *pgm*, *wbkA*, *wbkB*, *wbkC*, *wbkD*, *wbkF*, *wadC* и *wzt* (хромосомные области *wbk*, WBO и WAD).

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный штамм *V. melitensis* 16M был дополнительно модифицирован таким образом, что активность аутологичной N-формилтрансферазы была подавлена, и гетерологичный ген, кодирующий N-ацилтрансферазу, отличную от фермента N-формилтрансферазы, функционально экспрессируется. Например, *wbkC* может быть инактивирован, и гетерологичный *wbdR* может быть введен и экспрессирован в штамме (см. WO 2017/108515 A1).

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный штамм *V.*

melitensis 16М был дополнительно модифицирован для экспрессии флуоресцентного белка, предпочтительно GFP. Экспрессия флуоресцентного белка в модифицированном штамме может быть использована для дальнейшего различения индивидуумов или животных с инокулированным 16М от инфицированных индивидуумов или животных (Chacón-Díaz et al., 2011. Vaccine. 29 (3): 577-82; EP 2 508 201 A1). Таким образом, набор, который содержит модифицированный штамм *V. melitensis* 16М, который был дополнительно модифицирован для экспрессии флуоресцентного белка, может дополнительно содержать антитела, которые связываются с флуоресцентным белком, и/или флуоресцентный белок. Предпочтительно флуоресцентный белок представляет собой GFP.

В предпочтительном варианте осуществления штамм был лиофилизирован. Лиофилизация может быть использована для увеличения стабильности и срока годности штамма.

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит модифицированный штамм в соответствии с любым из ранее раскрытых вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и/или фармацевтически приемлемый адъювант.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит модифицированный штамм *V. melitensis* 16М, который был дополнительно модифицирован для экспрессии флуоресцентного белка.

Фармацевтическая композиция, как описано в настоящем описании, также может содержать другие вещества. Эти вещества включают, но не ограничиваются ими, криопротекторы, лиопротекторы, поверхностно-активные вещества, наполнители, антиоксиданты и стабилизаторы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть лиофилизована.

В одном варианте осуществления лиопротектор добавляют в фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления наполнитель входит в состав фармацевтической композиции. Другие фармацевтически приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы, такие как те, которые описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), также могут быть включены в фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, при условии, что они не оказывают вредного влияния на желательные характеристики фармацевтической композиции.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит адъювант. Предпочтительно адъювант выбирают из списка, состоящего из квасцов, неполного адъюванта Фрейнда, MF59®, синтетических аналогов дцРНК, таких как поли (I:C), бактериального LPS, бактериального флагеллина, имидазолхинолинов, олигодезоксинуклеотидов, содержащих специфические мотивы CpG, фрагментов бактериальной клеточной стенки, таких как мурамилдипептид и Quil-A®.

Фармацевтическая композиция может быть получена для перорального, подъязычного, буккального, внутривенного, внутримышечного, подкожного,

внутрибрюшинного, конъюнктивального, ректального, чрескожного, топического и/или осуществляемого ингаляцией введения. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой раствор, который подходит для внутривенного, внутримышечного, конъюнктивального, чрескожного, внутрибрюшинного и/или подкожного введения. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой раствор, который подходит для подъязычного, буккального и/или ингаляционного пути введения. В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой аэрозоль, который подходит для осуществляемого ингаляцией введения. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть получена для подкожного и/или внутрибрюшинного введения.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать обычные эксципиенты и носители, которые известны в данной области. Для твердых фармацевтических композиций можно использовать обычные нетоксичные твердые носители, которые включают, например, маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлозу, глюкозу, сахарозу, карбонат магния фармацевтической категории и тому подобное. Для раствора для инъекций фармацевтическая композиция может дополнительно содержать криопротекторы, лиопротекторы, поверхностно-активные вещества, наполнители, антиоксиданты, стабилизирующие агенты и фармацевтически приемлемые носители. Для аэрозольного введения фармацевтические композиции обычно поставляются в тонкоизмельченной форме вместе с поверхностно-активным веществом и пропеллентом. Поверхностно-активное вещество, конечно, должно быть нетоксичным и, как правило, растворимым в пропелленте. Представителями таких агентов являются сложные эфиры или неполные сложные эфиры жирных кислот, содержащих от 6 до 22 атомов углерода, таких как сложные эфиры капроновой, октановой, лауриновой, пальмитиновой, стеариновой, линолевой, линоленовой, «olesteric» и олеиновой кислоты с алифатическим многоатомным спиртом или его циклическим ангидридом. Могут быть использованы смешанные сложные эфиры, такие как смешанные или природные глицериды. При желании также может быть включен носитель, такой как, например, лецитин для интраназальной доставки. Для суппозиторий традиционные связующие вещества и носители могут включать, например, полиалкиленгликоли или триглицериды.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой вакцину, способную индуцировать иммунный ответ. Дизайн фармацевтических композиций для вакцин хорошо известен и описан, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Co., Easton, PA, и в Plotkin and Orenstein's book entitled Vaccines, 4th Ed., Saunders, Philadelphia, PA (2004).

Медицинские применения модифицированного штамма 16М

В девятом аспекте штамм или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно использовать в качестве лекарственного средства. В десятом аспекте модифицированный штамм или фармацевтическую композицию по настоящему

изобретению можно использовать для лечения и/или профилактики бруцеллеза.

В предпочтительном варианте осуществления инфекционный агент, вызывающий бруцеллез, выбран из группы, состоящей из *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. ceti* и *B. Pinnipedialis*. Предпочтительно инфекционный агент, вызывающий бруцеллез, выбран из группы, состоящей из *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. ovis*.

В предпочтительном варианте осуществления штамм или фармацевтическая композиция используется для лечения и/или профилактики бруцеллеза у людей, крупного рогатого скота, коз, овец, свиней и/или собак. Предпочтительно штамм или фармацевтическую композицию используют для лечения и/или профилактики бруцеллеза у коз и/или овец.

В предпочтительном варианте осуществления индивидууму или животному инокулируют по меньшей мере 10^4 КОЕ (колониеобразующих единиц) штамма. Предпочтительно, индивидууму или животному инокулируют по меньшей мере 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} или 10^{11} КОЕ штамма. Более предпочтительно, индивидууму или животному инокулируют по меньшей мере 10^9 КОЕ штамма. В альтернативном варианте осуществления индивидууму или животному инокулируют от 10^4 до 10^{12} КОЕ штамма.

В предпочтительном варианте осуществления штамм или фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривожно, внутривенно, внутрибрюшинно, через слизистые оболочки и/или конъюнктивально. Предпочтительно штамм или фармацевтическую композицию вводят подкожно. В альтернативном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят посредством конъюнктивального введения.

В предпочтительном варианте осуществления штамм или фармацевтическая композиция используются для предотвращения бруцеллеза. В этом варианте осуществления штамм или фармацевтическую композицию вводят в качестве профилактической вакцины. Предпочтительно штамм или фармацевтическую композицию вводят индивидууму или животному, которые могут подвергнуться риску заражения бактериями рода *Brucella*.

В предпочтительном варианте осуществления штамм или фармацевтическая композиция используется для лечения бруцеллеза. В этом варианте осуществления штамм или фармацевтическую композицию вводят в качестве терапевтической вакцины. Предпочтительно, штамм или фармацевтическую композицию вводят индивидууму или животному, которое страдает инфекцией от бактерий рода *Brucella*.

Набор, содержащий модифицированный штамм 16М

В одиннадцатом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему (i) модифицированный штамм *B. melitensis* 16М, в котором ген *wzm* инактивирован; и (ii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Модифицированный штамм может соответствовать любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. Кроме того, фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель может представлять собой любой из

вышеупомянутых фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, описанных в настоящей заявке. В предпочтительном варианте осуществления набор содержит инструкции о том, как комбинировать штамм с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный штамм представляет собой лиофилизат. Лиофилизат может содержаться в отдельном от фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя контейнере. Кроме того, набор может содержать инструкции о том, как комбинировать лиофилизированный штамм с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

В предпочтительном варианте осуществления набор может дополнительно содержать адьювант. Предпочтительно адьювант выбирают из списка, состоящего из квасцов, неполного адьюванта Фрейнда, MF59®, синтетических аналогов дцРНК, таких как поли (I:C), бактериальных LPS, бактериального флагеллина, имидазолхинолинов, олигодезоксинуклеотидов, содержащих специфические мотивы CpG, фрагментов бактериальной клеточной стенки, таких как мурамилдипептид и Quil-A®.

В предпочтительном варианте осуществления инструкции, включенные в набор, могут также описывать введение штамма индивидууму или животному. Схема введения может включать дозировку, которую следует использовать, частоту введения и/или способ введения, который следует использовать.

В двенадцатом аспекте настоящее изобретение относится к применению любого из описанных наборов для лечения и/или профилактики бруцеллеза. Применение набора может соответствовать любому медицинскому применению и способам введения, описанным в настоящей заявке.

ПЦР-Мультиплекс диагностический набор

В тринадцатом аспекте настоящее изобретение относится к набору для идентификации штаммов *Brucella*, который включает частичную или полную делецию WZM. В предпочтительном варианте осуществления набор содержит прямой и обратный праймеры, которые отжигаются на областях, фланкирующих *wzm* в геноме вида рода *Brucella*. Предпочтительно, набор содержит SEQ ID NO: 2 в качестве прямого праймера и SEQ ID NO: 3 и/или SEQ ID NO: 4 в качестве обратного праймера(ов). Наборы праймеров могут амплифицировать примерно 1573 п.о. (F1 и R4; AMP NO: 1) или примерно 724 п.о. (F1 и R5; AMP NO: 2) в Rev1 или 16M штамме дикого типа; или фрагмент 931 п.о. (F1 и R4; AMP NO: 3) у мутантов Δwzm (Таблица 1). Поскольку идентичность между BMEI1415 и соответствующими ортологами у других видов *Brucella* составляет по меньшей мере 99,6%, этот набор можно использовать для дифференциации штаммов *Brucella* дикого типа и мутантов *Brucella* Δwzm .

Примеры

Пример 1. Культивирование штаммов *E.coli* и *Brucella*.

Все штаммы хранили в криобирках при -20 °C, собирая бактериальные культуры в обезжиренном молоке с добавлением 3% стерильной лактозы (Applichem Pangeac) или 20-

40% глицерина (по объему).

Для приготовления суспензий с известной концентрацией *Brucella* готовили прекультуру из криопробирки путем выращивания бактерий на чашке с кровавым агаром № 2 (Oxoid), либо простым (BAB), либо с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (Gibco) (BAB-S) для *B. ovis*. После инкубации (3-5 дней, при 37°C и в атмосфере с 10% CO₂ для *B. ovis*) этой прекультуры 2-3 колонии из чашек BAB или BAB-S переносили на свежие чашки BAB или BAB-S и инкубировали в течение 2 дней, как и раньше. Выращенные колонии собирали в стерильный PBS pH 6,85 для получения концентрированной суспензии бактерий, которую разбавляли в том же разбавителе до получения суспензии с примерно 0,17 единицами поглощения при оптической плотности 600 нм, отрегулированной спектрофотометрией. В наших условиях эта суспензия содержит примерно 10⁹ КОЕ/мл. Точное количество бактерий всегда определяли ретроспективно путем серийных разведений в PBS, посева (100 мкл в трех экземплярах) и инкубации чашек в течение 3-5 дней при 37 °С. Рассчитывали количество КОЕ/мл.

Для жидкой культуры *Brucella* 4-5 колоний с чашки BAB или BAB-S инокулировали в соевый бульон с триптиказой (TSB, Pronadisa) и инкубировали в течение ночи при 37°C и 150 об/мин.

E. coli культивировали в бульоне Luria Bertani (LB, Pronadisa) или на чашках с агаром LB. Культуры *E. coli* инкубировали при 37 °С.

Соответствующие концентрации антибиотиков были включены в чашки с агаром и культуры для отбора. Все антибиотики были приобретены у Sigma.

Пример 2: Секвенирование гена *wzm*

Геном Rev1 экстрагировали с использованием набора для очистки ДНК PureLink™ Microbiome (Thermo Fisher Scientific). Ген *wzm* был амплифицирован с использованием праймеров F1 gcaaatgaaatggcagatg и R4 atgaaacgtggcgtagtcc (Таблица 1), и продукт ПЦР был очищен с использованием набора для очистки ПЦР QIAquick (Qiagen) и секвенирован методом Сэнгера.

Результирующая последовательность представляет собой AMP NO: 1 (Таблица 1), включая SEQ ID NO: 1, описанную в настоящей заявке. Эта последовательность в Rev1 идентична последовательности гена *wzm* вирулентного штамма *B. melitensis* 16M (Genbank: CP007763.1), а также имеет 99,6% идентичности с таковой *B. abortus* 2308 (Genbank: NC_007618) и вакцины S19 (Genbank : CP000887.1).

В соответствии с секвенированием, одна и та же плазида аллельного обмена может быть использована для частичного удаления *wzm* у видов *B. melitensis* (16M и Rev1) и *B. abortus* (штаммы 2308 и S19).

Таблица 1 Номера ампликонов (AMP NO), использованные в данной работе, и соответствующий размер фрагмента ДНК, полученный секвенированием или с помощью ПЦР с указанными парами праймеров с ДНК из генов *wzm* или Δwzm дикого типа.

AMP NO:	Размер ДНК-ампликона	Пара ПЦР-праймеров *	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')
---------	----------------------	----------------------	---

1	1,573 п.о. (в wt)	F1/ R4	F1: gcaaattgaaatggcagatg (SEQ ID NO: 2) R4: atgaaacgtggcgtagtcc (SEQ ID NO: 3)
2	724 п.о.	F1/ R5	F1: gcaaattgaaatggcagatg (SEQ ID NO: 2) R5: gcgtgtaaattgcaagagga (SEQ ID NO: 4)
3	931 п.о. (в Δwzm)	F1/ R4	F1: gcaaattgaaatggcagatg (SEQ ID NO: 2) R4: atgaaacgtggcgtagtcc (SEQ ID NO: 3)
4	484 п.о.	F1/ R2	F1: gcaaattgaaatggcagatg (SEQ ID NO: 2) R2: agcgcccacgtaaatacag (SEQ ID NO: 5)
5	465 п.о.	F3/ R4	F3: ctgatttacgtggcgcttaacctgcgtggcagtagc (SEQ ID NO: 6) R4: atgaaacgtggcgtagtcc (SEQ ID NO: 3)
6	319 п.о.	F9/ R5	F9: atgatatcgtatatggctaag (SEQ ID NO: 7) R5: gcgtgtaaattgcaagagga (SEQ ID NO: 4)
7	816 п.о.	rrnBP1-F/ Gfp_F- R2	rrnBP1-F: gttgcgcggtcagaaaattatttta (SEQ ID NO: 8) Gfp_F-R2: ttattgtatagttcatccatgccca (SEQ ID NO: 9)

* F: прямой; R: обратный.

Пример 3: Клонирование плазмид аллельного обмена

Все штаммы *Brucella* Δwzm были сконструированы с помощью события двойной рекомбинации с использованием плазмиды аллельного обмена pJQKm- Δwzm (Фигура 1). Праймеры, необходимые для конструирования укороченной формы (Δwzm), были разработаны с использованием Primer3 на основе доступной информации о последовательности штамма *B. melitensis* 16M в Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) и Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

Геном штаммов *Brucella* был выделен и очищен с использованием набора для очистки ДНК PureLink™ Microbiome (Thermo Fisher Scientific). Альтернативно, ДНК экстрагировали путем повторного суспендирования бактерий в сверхчистой воде и кипячения суспензии (100 °C, 20 минут), а затем центрифугирования (4000 об/мин, 10 минут). ДНК извлекали путем сбора супернатанта.

Для клонирования плазмиды аллельного обмена для частичной делеции *wzm* амплифицировали фрагмент размером 484 п.о. (AMP NO: 4, Таблица 1) с использованием ПЦР с праймерами F1 gcaaattgaaatggcagatg and R2 agcgcccacgtaaatacag (AMP NO: 3, Таблица 1). Фрагмент длиной 465 п.о. (AMP NO: 5, Таблица 1) амплифицировали с использованием ПЦР и праймеров F3 ctgatttacgtggcgcttaacctgcgtggcagtagc и R4 atgaaacgtggcgtagtcc (Таблица 1). Два продукта ПЦР были объединены с использованием ПЦР с перекрывающимися праймерами, и полноразмерный продукт был амплифицирован с использованием F1 gcaaattgaaatggcagatg и R4 atgaaacgtggcgtagtcc для получения кассеты Δwzm (Фигура 1). Фрагмент Δwzm имел делецию 82% гена дикого типа *wzm* ($\Delta 80-721$ от общего количества 783 п. о. *wzm* дикого типа). Кассету Δwzm клонировали в плазмиду

pCR2.1 с использованием инструкций производителя (ТОРО® TA Cloning®, Thermo Fisher Scientific).

Вектор-«самоубийства» pJQKm был описан ранее (Scupham and Triplett, 1997. Gene, 202,53-59). PCR2.1 Δ wzm и pJQKm расщепляли, используя BamHI и XbaI, и вставку Δ wzm и вектор pJQKm экстрагировали из геля и очищали. Вставка Δ wzm и вектор pJQKm лигировали с использованием ДНК-лигазы T4, что приводило к получению плазмиды аллельного обмена pJQKm Δ wzm.

Чтобы вставить gfp в геном штаммов *B. melitensis*, использовали систему mini-Tn7 путем адаптации метода, описанного ранее (Choi et al, 2005. Nature Methods, 2 (6): 443-8). Конститутивная экспрессия gfp контролировалась промотором grnBP1, содержащимся во фрагменте grnB P1-gfp. Конструкцию grnBP1-gfp экстрагировали из плазмиды pUC18T-mini-Tn7-gfp-Gmr (GenBank: DQ493877.2). Таким образом, фрагмент grnBP1-gfp был амплифицирован с праймерами grnBP1-F gttgcgcggtcagaaaattatmtta и Gfp_F-R2 ttattgtatagttcatccatgcca (AMP NO: 7) и клонирован в плазмиду pCR2.1 TA, используя инструкции производителя (ТОРО® TA Cloning®, Thermo Fisher Scientific) и затем субклонировали в pUC18R6KT-mini-Tn7-Kmr, устойчивый к 50 мкг/мл канамицина (Kmr) (Llobet et al, 2009. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(1): 298-302) с использованием EcoRI. Это привело к получению плазмиды pUC18R6KT-mini-Tn7-gfp (Таблица 1).

Пример 4. Конъюгация *E. coli* со штаммами *Brucella* и оценка ПЦР мутантов.

pUC18R6KT-mini-Tn7-gfp или pJQKm Δ wzm были трансформированы в *E. coli* S17 (λ pir), и плазмиды были перенесены в принимающие штаммы *Brucella* посредством конъюгации. В случае частичной делеции wzm с использованием плазмиды аллельного обмена pJQKm Δ wzm 1 мл ночной жидкой культуры *B. melitensis* культивировали с 0,5 мл ночных жидких культур *E. coli* S17 (λ pir) -pJQKm Δ wzm.

Для штаммов *Brucella* Δ wzm отбор трансконъюгантов после первой рекомбинации (интеграция вектора-«самоубийцы» в хромосому) был выбран путем выращивания бактерий в ВАВ с добавлением 50 мкг/мл канамицина (Kmr) и чувствительности к 5% сахарозе (Sacs). Вторая рекомбинация (иссечение плазмиды-мутатора и что приводит к конструированию мутантного штамма путем аллельного обмена) была отобрана по устойчивости к сахарозе и чувствительности к канамицину (Фигура 1). Наконец, полученные колонии были подвергнуты скринингу с помощью двух ПЦР, то есть одной ПЦР с праймерами F1 gcaaatgaaatggcagatg и R4 atgaaacgtggcgtagtcc, которые амплифицировали фрагмент из 931 п.о. у мутантов Δ wzm и фрагмент из 1,573 п.о. в родительском штамме (Таблица 1), и другой ПЦР с F9 atgatatcgatatggctaag и R5 gcggtgaaatgcaagagga, амплифицирующими 319 п.о. продукт ПЦР в штамме дикого типа и в штаммах-сиблингах (Фигура 2). Для ПЦР геномную ДНК экстрагировали путем повторного суспендирования бактерий в сверхчистой воде и кипячения суспензии при 100 °С в течение 20 минут, а затем центрифугирования полученной жидкости при 4000 об/мин в течение 10 минут и сбора супернатанта.

Во всех случаях три клона каждого мутанта и один штамм-сиблинг (то есть

представленный тем же субкультурам, что и соответствующий мутант; Фигура 1) в качестве контроля были использованы в большинстве экспериментов для оценки отсутствия неконтролируемых изменений во время генетических манипуляций.

Штамм Rev1, содержащий частичную делецию (82%) гена *wzm*, был идентифицирован и назван Rev1 Δ *wzm*. Этот штамм также был депонирован в депозитории в соответствии с Будапештским договором.

Мутанты *Brucella* Δ *wzm* комплементировали путем конъюгации с донором *E. coli* S17pBBR-*wzm* или *E. coli* S17pSRK-*wzm*. Комплементированные штаммы отбирали на чашках ВАВ с добавлением 20 мкг/мл хлорамфеникола (ВАВ-См20) или 50 мкг/мл канамицина (ВАВ-См50), что позволяло отбирать конъюганты, несущие неинтегративную плазмиду pBBR-*wzm* или pSRK*wzm*, соответственно. Трансконъюганты проверяли с помощью ПЦР (Фигура 2) с праймерами F9 atgatatcgatatggctaag и R5 gcgtgtaaattgcaagagga (Таблица 1), амплифицируя фрагменты ДНК длиной 319 п.о. (AMP NO: 6) исключительно в штаммах, несущих ген *wzm* дикого типа (родительские и штаммы-сиблинги) или комплементированные плазмиды pBBR-*wzm* или pSRK-*wzm* (Фигура 2).

Пример 5: Фенотипическая характеристика мутантов *Brucella* Δ *wzm*

Отобранные клоны Δ *wzm*-мутантов анализировали с помощью классических маркеров для типирования *Brucella*, следуя стандартным протоколам (Alton et al., 1988. *Techniques for the Brucellosis. Laboratory Paris: INRA*) теста на исключение с использованием кристаллического фиолетового-оксалата, тестов на каталазу, оксидазу, уреазу и акрифлавин (все от Sigma Aldrich), на чувствительность к фагам Tb, Wb, Iz и R/C, агглютинацию с моноспецифичными анти-А и анти-М сыворотками, зависимость от CO₂ и сыворотки, чувствительность к красителям (то есть тиониновый синий 10, 20 и 40 мкг/мл, фуксин 10 и 20 мкг/мл и сафранин 100 мкг/мл; Sigma) и к антибиотикам пенициллину 5 мг/мл (P5) и стрептомицин 2,5 мкг/мл (Str2,5), как показано в Таблице 2.

Кроме того, штаммы Rev1 Δ *wzm*, 16М Δ *wzm*, 2308 Δ *wzm* и S19 Δ *wzm* продемонстрировали фенотип R-LPS в отношении положительного окрашивания методом кристаллического фиолетового-оксалата (Фигура 3).

Кроме того, структура LPS всех мутантов Δ *wzm* и комплементарных штаммов была изучена с помощью SDS-PAGE и окрашивания серебром, модифицированных для LPS. Как показано на Фигуре 4А, оба мутанта Rev1 Δ *wzm*, 16М Δ *wzm*, 2308 Δ *wzm* и S19 Δ *wzm* показали R-LPS с интактным кором, идентичным таковому у родительских и/или штаммов-сиблингов. Однако при антигенном анализе с помощью Вестерн-блоттинга с использованием эпитопов анти-М, анти-С или анти-А-О-PS все мутанты Δ *wzm* показали О-PS в более низких количествах или антигенно различные эпитопы (Cloeckaert et al., *J Gen Microbiol.* 1992 Jun; 138 (6): 1211-9) для тех, кто присутствует в О-PS S-LPS (Фигура 4В). Кроме того, комплементация 16М Δ *wzm*::*gfp*-pBBR-*wzm* была оценена с помощью эпифлуоресцентной микроскопии с использованием первичного эпитопа анти-С О-PS МоАб (моноклональное антитело) и вторичного антитела, меченного техасским красным. Штаммы-сиблинги 16М Δ *wzm*::*gfp* и 16М были использованы в качестве контроля (Фигура

4С).

Помимо оценки ПЦР (см. Пример 4, Фигура 2), фенотипическая характеристика показала, что комплементированные штаммы восстанавливали фенотип S-LPS (Фигуры 3, 4В и 4С).

Таблица 2. Фенотипическая характеристика Δwzm , 16M Δwzm , 2308 Δwzm и S19 Δwzm

Штамм	Фаговый лизис				СО ₂ - зависимы й	Каталаза/ Оксидаза/ Уреаза	Агглютинация с Окрашивание акрифлавином и кристаллическим фиолетовым	Сыворотка анти-		Рост в красителях в ВAB-S в присутствии/отсутствии СО ₂					
	Tb	Wb	Iz	R/C				А	М	Тионин			Основной фуксин		Сафрани н
								А	М	10	20	40	10	20	100
16M	-	-	-2	-		+/+/+	-/-	-	+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+
16M Δwzm	-	-	-	-3		+/+/+	+/+	-	-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/-
Rev1	-	-	0	-		+/+/+	-/-	-	+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	+/-
Rev1 Δwzm	-	-	-	-4		+/+/+	+/+	-	-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-
2308	-3	-4	-4	-		+/+/+	-/-	+	-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
2308 Δwzm	ND	ND	ND	ND		+/+/+	+/+	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
S19	-3	-3	-2	-		+/+/+	-/-	+	-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
S19 Δwzm	-	-	-	-3		+/+/+	+/+	-	-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+

ND - Не определено

Пример 6. Удаление *wzm* в *Rev1Δwzm* и *16MΔwzm* стабильно после субкультивирования *in vitro* и *in vivo* у мышей.

Мутанты *BrucellaΔwzm* субкультивировали в течение 20 последовательных пассажей в чашках ВАВ путем переноса колоний на свежую чашку каждые 3-4 дня после того, как чашки инкубировали при 37 °С. Помимо анализа этих культур, выращенные бактерии хранили в течение 2 месяцев при 4 °С для оценки их стабильности после хранения. Кроме того, репрезентативное количество КОЕ, выделенного из селезенки мышей в экспериментах, описанных в примерах 12 и 13, было выбрано для оценки стабильности.

Каждую отобранную культуру анализировали на наличие делеции с помощью ПЦР с праймерами F1 *gcaattgaaatggcagatg* и R4 *atgaaacgtggcgtagtcc*, что позволило амплифицировать ДНК у бактерий *wt* и *Δwzm* (Таблица 1), а также с помощью фенотипического анализа, то есть размера колонии после инкубации при 37 °С и окрашивания кристаллическим фиолетовым-оксалатом. Наконец, инокуляты, содержащие $\approx 2 \times 10^3$ КОЕ/мл, были скорректированы с помощью спектрофотометрии и посеяны в трех экземплярах (3x100 мкл) в пять чашек, чтобы проанализировать размер колонии после 5 дней инкубации при 37 °С и фазу колонии путем окрашивания кристаллическим фиолетовым примерно при 3000 КОЕ.

Все проанализированные колонии показали ожидаемый генотип и фенотип, что указывает на стабильность генетической модификации.

Пример 7. Рост *16MΔwzmb*, а не *Rev1Δwzm*, ингибируется присутствием 10% CO₂ в атмосфере инкубации. Этот дефект восстанавливается путем выращивания в агаре с добавлением бычьей эмбриональной сыворотки.

Бактериальный рост мутантов *Δwzm* изучали на чашках с ВАВ, инкубированных в нормальной атмосфере или дополненных 10% CO₂. Для этого 100 мкл бактериальных суспензий, содержащих $\approx 5 \times 10^2$ КОЕ/мл, высевали в трех экземплярах и определяли количество КОЕ/100 мкл после инкубации (3-5 дней, 37 °С). Кроме того, *16MΔwzm* был проанализирован для определения частоты ингибирования (то есть количества КОЕ/мл, выделенного после инкубации с CO₂ относительно количества КОЕ/мл, выделенного после инкубации в нормальной атмосфере) путем посева всех бактериальных разведений, приготовленных в обоих ВАВ и ВАВ-S. Каждый отсчет повторялся три раза. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (n=9) отдельных подсчетов. Статистические сравнения значений были выполнены с помощью однофакторных тестов ANOVA и PLSD.

Как показано в Таблице 3, *16MΔwzm*, но не *Rev1Δwzm*, был не способен расти в ВАВ в условиях инкубации с CO₂.

Таблица 3 Рост в чашках ВАВ инкубируют в нормальной атмосфере или добавляют 10% CO₂. Количество КОЕ/100 мкл бактериальных суспензий, содержащих $\approx 5 \times 10^2$ КОЕ/мл. Среднее значение и стандартное отклонение трех экспериментов при посеве три раза 100 мкл в ВАВ.

Штамм	No. КОЕ/100 мкл (среднее \pm SD)
-------	------------------------------------

	Нормальная атмосфера	10% CO ₂
Rev1	70,1 ± 5,4	62,9 ± 8,3
Rev1-sibling	53,8 ± 3,0	61,8 ± 4,5
Rev1Δwzm	42,3 ± 2,3	28,6 ± 4,2
Rev1Δwzm::gfp	37,7 ± 2,4	21,5 ± 1,3
16M	57,9 ± 2,8	67,8 ± 2,5
16M-сиблинг	50,5 ± 1,8	73,1 ± 3,1
16MΔwzm	31,7 ± 3,5	0 ^a
16MΔwzm::gfp	21,4 ± 1,5	0 ^a

Тесты ^aPLSD: $p < 0,0001$ по сравнению с нормальной атмосферой и по сравнению с штаммами-сиблингами 16M и Rev1

Частота ингибирования 16Mwz после инкубации планшетов ВАВ в атмосфере CO₂ составляла $1-0,39 \times 10^{-2}$ КОЕ/мл. Этот фенотип не наблюдался при культивировании 16MΔwzm в чашках с ВАВ-S (Таблица 4).

Таблица 4 Частота ингибирования 16MΔwzm и 16MΔwzm::gfp в чашках ВАВ и ВАВ-S, инкубированных в нормальной атмосфере или дополненной 10% CO₂.

Штамм	КОЕ/мл		Штамм	КОЕ/мл	
	Нормальная атмосфера	10% CO ₂ (частота ингибирования)		Нормальная атмосфера	10% CO ₂ (частота ингибирования)
16M			16MΔwzm		
ВАВ	$4,3 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8 (1 \times 10^0)$	ВАВ	$4,3 \times 10^8$	$4,4 \times 10^6 (1 \times 10^{-2})$
ВАВ-S	$4,9 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8 (1 \times 10^0)$	ВАВ-S	$3,4 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8 (1 \times 10^0)$
16M-сиблинг			16MΔwzm::gfp		
ВАВ	$5,4 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8 (1 \times 10^0)$	ВАВ	$4,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6 (0,39 \times 10^{-2})$
ВАВ-S	$6,6 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8 (0,9 \times 10^0)$	ВАВ-S	$3,9 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8 (1 \times 10^0)$

Пример 8: Rev1Δwzm более восприимчив к стрептомицину, чем Rev1

В отличие от других видов *Brucella*, таких как *B. melitensis* 16M и *B. abortus* 2308 и S19, Rev1 обладает относительной устойчивостью к 2,5 мкг/мл стрептомицина (Str2,5) при инкубации в нормальной атмосфере (в 10% CO₂ все штаммы *B. melitensis* демонстрируют аналогичную резистентность). Эта относительная устойчивость к Str2,5 *in vitro* напрямую связана с неэффективностью лечения на основе стрептомицина (антибиотик выбора у людей) против инфекций Rev1 у обоих, у человека и в животных моделях (Grilló et al. 2006. *J Antimicrob Chemother.* 58 (3): 622-626).

Чтобы оценить это свойство в Rev1Δwzm, бактериальные суспензии, содержащие

$\approx 2 \times 10^3$ КОЕ/мл, готовили в PBS и культивировали путем посева 100 мкл в трех экземплярах в ВАВ и в ВАВ с добавлением Str2,5 (ВАВ-Str2,5). Штамм-сиблинг Rev1 использовали в качестве контроля. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 5 дней в нормальной атмосфере и определяли среднее значение \pm стандартное отклонение ($n=3$) КОЕ/мл. Эксперимент был повторен три раза. Статистические сравнения значений были выполнены с помощью тестов ANOVA и PLSD.

В результате Rev1 Δ wzm был более ($p < 0,001$) восприимчивым к Str2,5, чем сиблинг Rev1 (Фигура 5).

Пример 9: 16М Δ wzm более восприимчив к высыханию, чем 16М, а Rev1 Δ wzm также восприимчив, как и Rev1.

Устойчивость к высыханию Rev1 Δ wzm, 16М Δ wzm, Rev1 и 16М тестировали путем аликвотирования 200 мкл/на лунку суспензии $\approx 10^9$ КОЕ/мл в TSB в 12-луночных полистирольных планшетах. Суспензии давали высохнуть при комнатной температуре в темноте в течение 6 дней. Затем осадок повторно гидратировали в PBS, серийно разводили и высевали на чашки с ВАВ для определения количества и процента выживших бактерий.

Как видно на Фигуре 6, частичная делеция гена wzm в 16М Δ wzm еще больше снизила ($p < 0,001$) способность штамма-сиблинга 16М выживать в сухих условиях. Тем не менее, Rev1 Δ wzm так же восприимчив, как и сиблинг Rev1. Эти результаты подтверждают, что 16М Δ wzm будет менее вероятно сохраняться в окружающей среде, чем вирулентный штамм 16М.

Пример 10. Rev1 Δ wzm более восприимчив, чем 16 М Δ wzm, к бактерицидным катионным пептидам врожденной иммунной системы. Оба Δ wzm-мутанта более восприимчивы, чем родительские или штаммы-сиблинги.

Полимиксин В использовали в качестве модели восприимчивости бактерий к катионным пептидам врожденной иммунной системы. Для этого экспоненциально растущий Rev1 Δ wzm или 16М Δ wzm доводили до $2-3 \times 10^3$ КОЕ/мл в PBS и смешивали с различными концентрациями от 3 до 0,188 мг/мл полимиксина В в фосфатно-солевом кислом буфере (PSA; 0,133M NaCl, 0,1M; NaH₂PO₄, pH 4,6) в 24-луночных планшетах для микротитрования в двух экземплярах. Суспензии (100 мкл, в трех экземплярах) высевали в ВАВ, и количество жизнеспособных КОЕ регистрировали после инкубации в течение 1 ч при 37 °С. В качестве контроля использовали как родительский штамм, так и сиблинг. Точки на графике представляют собой среднее \pm стандартное отклонение ($n=3$) КОЕ/мл.

На Фигуре 7 показано, что штамм Rev1 Δ wzm более восприимчив, чем 16М Δ wzm, к пагубным эффектам полимиксина В. Более того, оба мутанта Δ wzm были гораздо более восприимчивыми, чем родительские штаммы Rev1 и 16М и родственные штаммы. Фактически, Rev1 Δ wzm не смог расти после инкубации в присутствии самой низкой протестированной концентрации (0,188 мг/мл), в то время как 16М Δ wzm не был полностью ингибирован до концентрации Полимиоксина В 0,750 мг/мл в тех же экспериментальных условиях (Фигура 7). Напротив, родительские и штаммы-сиблинги Rev1 были ингибированы при 3 мг/мл, в то время как вирулентный 16М сопротивлялся даже при этой

высокой концентрации. Эти результаты согласуются с разной *in vivo* персистенцией Rev1 Δ wzm и 16M Δ wzm, наблюдаемой у мышей (Фигура 9).

Пример 11: Rev1 Δ wzm и 16M Δ wzm более восприимчивы, чем родительские штаммы Rev1 и 16M к обычным сывороткам овец и крупного рогатого скота.

Бактерии в экспоненциальной фазе доводили до концентрации $\approx 10^4$ КОЕ/мл в PBS и распределяли в планшетах для микротитрования (45 мкл/лунку) путем смешивания с нормальной или декомплементированной (1 час, 56 °C) овечьей или бычьей сывороткой (90 мкл/лунку). После инкубации (18 ч, 37 °C) в каждую лунку вносили 65 мкл TSB, бактериальную суспензию смешивали, 50 мкл/лунку высевали на ВАВ и планшеты инкубировали (5 дней, 37 °C) для определения количества КОЕ/мл и процента выживания бактерий. Мутант *B. melitensis* с минимальным ядром использовали в качестве положительного контроля (С+) с высокой восприимчивостью к нормальной сыворотке. Результаты выражены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (n=3) процента выживаемости. Статистические сравнения значений были выполнены с помощью тестов ANOVA и PLSD.

Как видно на Фигуре 8, штаммы Rev1 Δ wzm и 16M Δ wzm более восприимчивы, чем родительские штаммы Rev1 или 16M, к бактерицидному эффекту нормальной овечьей и коровьей сыворотки.

Пример 12. Rev1 Δ wzm является более аттенуированным, чем 16M Δ wzm, у мышей BALB/c.

Самок мышей BALB/c в возрасте 7 недель (Charles River Laboratories, Барселона, Испания) содержали в здании для животных Института агробиологии (регистрационный номер ES/31-2016-000002-CR-SU-US) с водой и едой без ограничения. Животные были случайным образом распределены и акклиматизированы за 1-2 недели до начала экспериментов. Процедура обращения с животными и экспериментальные процедуры соответствовали европейским (DOCE 86/609/EEC), национальным (RD 1201/2005) и региональным (Ley 11/2003) директивам и находились под надзором Этического комитета организации.

Мышей инокулировали внутрибрюшинно $\approx 10^8$ КОЕ/мышь Rev1 Δ wzm, Rev1 Δ wzm::gfp, 16M Δ wzm или 16M Δ wzm::gfp (штаммы R-LPS) и 10^6 КОЕ/мышь родственных штаммов Rev1 или 16M (штаммы S-LPS). Дополнительные группы мышей, инокулированных $\approx 10^8$ КОЕ/мышь мутантами S19 Δ wzm или 2308 Δ wzm *B. abortus* и 10^6 КОЕ/мышь штаммов сиблингов S19 или 2308, использовали для сравнения эффекта этой мутации в различных *Brucellae*. Через определенные интервалы группы из 5 мышей вскрывали для определения количества жизнеспособных бактерий, присутствующих в селезенке, а также массы селезенки, как сообщалось ранее (Grilló et al., 2012. *Veterinary Research*, 43 (1): 29). Жизнеспособные бактерии были идентифицированы на чашках ВАВ. Грубая идентичность изолятов селезенки была подтверждена методом окрашивания кристаллическим фиолетовым-оксалатом, а также методом ПЦР. Результаты выражали в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (n=5) отдельных log КОЕ/селезенка или

грамм/селезенка. Статистическое сравнение средних значений было выполнено с помощью однофакторного анализа ANOVA с последующими тестами Фишера на наименьшую достоверную разность (PLSD).

Как можно видеть на Фигурах 9А и 9С, частичная делеция гена *wzm* приводила к уменьшению количества *B. melitensis*, присутствующего в селезенке мышей, по сравнению с соответствующими штаммами сиблингами Rev1 или 16М. Тем не менее, Rev1Δ*wzm* был гораздо более ослабленным, чем 16МΔ*wzm*, поскольку полное выведение инфекций из селезенки происходило до 4 недели или 12 недели для Rev1Δ*wzm* или 16МΔ*wzm*, соответственно. В отличие от *B. melitensis*, мутанты *B. abortus* 2308Δ*wzm* и S19Δ*wzm* сохранялись в селезенке одинаково, то есть несколько более чем 8 недель или менее чем 9 недель, соответственно (Фигуры 9Е и 9Г). Эти данные показали, что оба мутанта *B. abortus* были более ослабленными, чем мутант 16МΔ*wzm*, но менее, чем Rev1Δ*wzm*.

Неожиданно, более сильное ослабление Rev1Δ*wzm* сопровождалось индукцией транзиторной спленомегалии, которая достигла пика на 2-й неделе после инфекции (Фигура 9В). Это открытие обычно связано с активацией эффективного иммунного ответа (Conde-Álvarez et al. 2012. PLoS Pathog. 8 (5): e1002675). Эта реакция селезенки не наблюдалась ни у 16МΔ*wzm* (Фигура 9Д), ни у мутантов *B. abortus* 2308Δ*wzm* и S19Δ*wzm* (Фигура 9F и 9H).

Штаммы Rev1Δ*wzm*::*gfp* и 16МΔ*wzm*::*gfp* показали сходную вирулентность и спленомегалию, как у Rev1Δ*wzm* и 16МΔ*wzm*, соответственно (Фигуры 9А-9Д), что указывает на то, что введение мини-Tn7-*gfp* в геном действительно не влияет на биологические свойства Rev1Δ*wzm* и 16МΔ*wzm*.

Пример 13: Rev1Δ*wzm* не инфицирует плаценту или плод беременных мышей

Самок мышей CD1 (n=7) на 4,5 сутки беременности внутрибрюшинно инфицировали $\approx 7 \times 10^6$ КОЕ/мышь Rev1Δ*wzm* или 16МΔ*wzm* или $\approx 7 \times 10^5$ КОЕ/мышь Rev1 или 16М. Всех мышей умерщвляли при доношенной беременности для оценки макроскопических повреждений при вскрытии, а также бактериологии образцов селезенки, плаценты и плода. Количество жизнеспособных бактерий (log КОЕ/орган) в каждой ткани определяли путем посева на ВАВ. Кроме того, было зарегистрировано количество беременных самок, инфицированных плацент и самок, несущих инфицированные плоды.

Как видно из Таблицы 5, у всех мышей выявлены хорошо установленные инфекции в селезенке на одинаковых уровнях ($\approx 4-5$ log) между группами. Однако спленомегалия, генерируемая Rev1Δ*wzm* и 16МΔ*wzm* у беременных самок, была умеренной или низкой, соответственно, в отличие от родительских штаммов Rev1 и 16М (Таблица 5). Удивительно, что Rev1 (и в меньшей степени 16М) вызывал более высокую спленомегалию у беременных (Таблица 5), чем у небеременных мышей на 2 неделе (Фигура 9). Однако мутанты Rev1Δ*wzm* и 16МΔ*wzm* индуцировали сходную спленомегалию у беременных и небеременных мышей, демонстрируя более высокую массу селезенки на 2 неделе у Rev1Δ*wzm*, чем у 16МΔ*wzm* (0,30 против 0,16 г/селезенка, Таблица 5). Доношенные беременности наблюдались у большинства мышей, вакцинированных Rev1Δ*wzm* или 16МΔ*wzm*, а также у тех, кто вакцинирован Rev1, но только несколько самок,

инфицированных родительским 16М, достигли доношенной беременности. Более того, в то время как Rev1 Δ wzm и 16М Δ wzm были практически неспособны колонизировать плаценту и плод при введенной дозе, инфекция одним логарифмом меньше Rev1 позволила колонизировать эти ткани на очень высоком уровне (6-8 log инфекции) у всех самок (Таблица 5).

Эти уровни инфекции сопровождались макроскопическими повреждениями в плацентах, инфицированных Rev1 и 16М, но не в плацентах от самок, инокулированных мутантами Rev1 Δ wzm или 16М Δ wzm (Фигура 10). Все эти результаты показали, что мутанты Rev1 Δ wzm или 16М Δ wzm были более безопасными у беременных мышей, чем вирулентные и вакцинные эталонные штаммы.

Таблица 5. Селезеночные, плацентарные и внутриутробные инфекции и доношенные беременности у мышей CD1, инфицированных Rev1Δwzm, 16MΔwzm, Rev1 или 16M на 4,5 день беременности и умерщвленных через 15 дней.

Штамм	Инокуляция	Селезенка		Беременность	Плацента		Плод	
		log КОЕ/селезенка	Масса селезенки (грамм)		Количество беременных/общее количество самок	Количество самок с инфицированной плацентой/беременных	log КОЕ/грамм плаценты*	Количество самок с инфицированным плодом/беременных
<i>B. melitensis</i>	Доза /путь							
Rev1 (vaccine)	6,0x10 ⁵ /IP	5,70±0,8	0,89±0,29	10/14	10/10	8,5±0,8	10/10	6,71±0,49
Rev1Δwzm	6,3x 10 ⁶ /IP	4,7±0,8	0,30 ^a ±0,16	12/14	0/12	1,52±0 ^a	0/5	1,52±0 ^a
16M (вирулентный)	6,9x10 ⁵ /IP	4,10±0,5	0,83±0,43	4/14	4/4	6,0±1,42	2/2	6,16±1,21
16MΔwzm	6,5x 10 ⁶ /IP	3,60±0,7	0,16 ^a ±0,08	5/7	0/5	1,52±0 ^a	0/5	1,52±0 ^a

IP: внутрибрюшинно; а: p < 0,001 против 16M (вирулентный) или Rev1 (вакцинный) инфицированных мышей; *Предел обнаружения=1,52 log (т.е. нет выделенных КОЕ)

Пример 14: Rev1 Δ wzm и 16M Δ wzm придают прочную защиту от S и R вирулентных инфекций у мышей, эквивалентную или лучшую, чем у Rev1.

Вакцинную эффективность мутантов *Brucella* Δ wzm оценивали у самок мышей BALB/c 8-10 недель (n=5) путем внутрибрюшинной или подкожной вакцинации $\approx 10^8$ КОЕ/мышь соответствующего мутанта. Мышей (n=5), вакцинированных подкожно 2×10^5 КОЕ/мышь Rev1 или S19, использовали в качестве контрольных вакцинированных контролей против инфекций *B. melitensis* H38 и *B. ovis* PA или *B. abortus*, соответственно. Три группы мышей (n=5), инокулированных 0,1 мл стерильного PBS, использовали в качестве невакцинированных контролей в соответствующем эксперименте. Через четыре недели после вакцинации всем мышам вводили внутрибрюшинно $\approx 1 \times 10^4$ КОЕ/мышь *B. melitensis* H38::*Gmr*, 2×10^5 КОЕ/мышь *B. ovis* BoPA::*Gmr* или 5×10^4 КОЕ/мышь *B. abortus* 2308::*Gmr*, контрольные штаммы, устойчивые к 15 мкг/мл гентамицина (Gm15). Наконец, количество вирулентных бактерий в селезенке определяли через 2 (H38::*Gmr* и 2308::*Gmr*) и 3 (BoPA::*Gmr*) недели после инфекции, высевая каждую селезенку на BAV-S-Gm15.

Как видно из Таблицы 6А, мутанты Rev1 Δ wzm и 16M Δ wzm::*gfp* продемонстрировали степень защиты от вирулентной инфекции *B. melitensis*, аналогичную показанной для эталонного вакцинного штамма Rev1, не только при внутрибрюшинной, но и подкожной вакцинации. Более того, оба мутанта *B. melitensis* Δ wzm придавали превосходную защиту от инфекции *B. ovis* ($p < 0,001$) по сравнению с штаммом Rev1. В отличие от этого, как ни удивительно, мутация Δ wzm у обоих штаммов *B. abortus* 2308 Δ wzm и S19 Δ wzm не обеспечивает адекватной защиты от вирулентной инфекции *B. abortus* у мышей (Таблица 6В).

Таблица 6А. Эффективность вакцинации против вирулентной инфекции с помощью *B. melitensis* H38 (S-LPS вирулентный штамм) или *B. ovis* PA::Gm^r (R-LPS вирулентный штамм).

	Доза/путь вакцинации	Заражение H3S::GmJ			Заражение B, ovis PA::Gm ^r		
		log H3S/селезенка	Неинфицированные ^a /всего	UP ^b	log BoPA/селезенка (среднее±SP)	Неинфицированные/всего	UP ^b
Rev1Δwzm	10 ⁸ /IP	1,44 ± 1,28 ^c	3/5	4,32	0,7 ± 0,00 ^a	5/5	5,37
	10 ⁸ /SC	1,93±1,43 ^c	2/5	3,83	ND		
16MΔwzm::gfp	10 ⁸ /IP	1,75 ± 1,52 ^c	3/5	4,01	0,62 ± 0,05 ^a	5/5	5,45
	10 ⁸ /SC	2,05± 1,00 ^c	1/5	3,71	1,91 ±1,76 ^a	2/5	4,16
Rev1	2×10 ⁵ /SC	1,39± 1,16 ^c	3/5	4,37	2,58 ± 1,88 ^a	2/5	3,49
PBS контроль		5,76 ± 0,58 ^c	0/5		6,07 ±0,24	0/5	

IP: внутрибрюшинно; SC: подкожно; ^a < 5КОЕ/селезенка; ^bЕдиницы защиты (UP^b) = log КОЕ селезенки в невакцинированном контроле - в тестируемой группе; ^cp<0,001 против PBS контроля с помощью теста PLSD. ND: Не определено

Таблица 6B. Эффективность вакцинации 2308 Δwzm или S19 Δwzm против вирулентной инфекции *V. abortus* 2308::*GmR* (вирулентный штамм S-LPS)

Вакцинный штамм	Доза/путь вакцинации	Заражение 2308:: <i>GmR</i>	
		log 2308/селезенка (среднее \pm SD)	Неинфицированные/всего*
2308 Δwzm	10 ⁸ /IP	2,97 \pm 1,41 ^b	1/5
	10 ⁸ /SC	4,13 \pm 1,08	0/5
S19 Δwzm	10 ⁸ /IP	4,18 \pm 1,91	0/5
S19	10 ⁵ /SC	1,57 \pm 1,96 ^a	4/5
PBS контроль	-	5,87 \pm 0,26	0/5

IP: внутривенно; СК: подкожно; * <5 КОЕ/селезенка; ** Единицы защиты=log КОЕ/селезенка в невакцинированном контроле - в исследуемой группе; a: p <0,001; b: p <0,05 против контроля PBS с помощью теста PLSD

Пример 15: Серологический ответ ягнят, инокулированных Rev1 Δwzm ::gfp или 16M Δwzm ::gfp против Rev1::gfp

Самцы и самки ягнят Rasa Aragonesa, родившиеся в экспериментальном стаде Исследовательского центра технологий (CITA) del Gobierno de Aragón (Сарагоса, Испания), использовались в этих экспериментах в возрасте 3-4 месяцев. Эти животные были размещены в уполномоченных учреждениях CITA (регистрационный номер ES/50-2970-12005), обрабатывались и подвергались манипуляциям в соответствии с рекомендациями FELASA (www.felasa.eu) и ARRIVE (Kilkenny et al., 2010). PLoS Biology, 8: e1000412).

Ягнят вакцинировали путем подкожной инокуляции суспензии, содержащей 1-2 \times 10¹⁰ КОЕ Rev1 Δwzm ::gfp (n=14) или 16M Δwzm ::gfp (n=8). Группы ягнят, не вакцинированных (n=13) или вакцинированных 1-2 \times 10⁹ КОЕ Rev1::gfp (n=12), использовали в качестве контроля. После этого безвредность оценивали путем клинического осмотра (температура тела прямой кишки и пальпация места инокуляции) в течение одного месяца после вакцинации и путем периодического осмотра эпидидимиса и яичек на протяжении всего эксперимента. Кроме того, пробы крови брали непосредственно перед вакцинацией, а затем еженедельно или каждые две недели пункцией яремной вены с использованием вакуумных пробирок Venojet® (Terumo). После забора крови при комнатной температуре в течение 24 часов образцы крови центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 минут и полученную сыворотку хранили при -20 °C до ее анализа.

Ответ на LPS измеряли с использованием пробы бенгал-роз (sRBT) и реакции связывания комплемента (CFT), рекомендованных ВОЗ/ОИЕ. Кроме того, были проведены тесты диффузии в геле (GDT) с антигеном R-LPS, чтобы оценить с помощью сероконверсии, что вакцинация была эффективной. Подробную информацию об этих серологических тестах можно найти в «Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals» Всемирной организации здравоохранения животных (ОИЕ, 2016). ИФА для антител против GFP в сыворотке также проводили на образцах, полученных из сыворотки ягнят, инокулированных 16M Δwzm ::gfp.

Фигуры 11А и 11В показывают, что, в отличие от Rev1::gfp, вакцинация с помощью Rev1 Δ wzm::gfp или 16M Δ wzm::gfp индуцировала (если да) минимальную серологическую интерференцию в тестах S-LPS Brucella. Фактически, серологический ответ, индуцированный вакцинацией Rev1 Δ wzm, не вызывал какой-либо интерференции в sRBT (Фигура 11А), и только три ягненка вызывали выработку антител против S/LPS, детектированных с помощью CFT. Напротив, трое животных, вакцинированных 16M Δ wzm::gfp были положительными в sRBT (Фигура 11А), и одно из них было также положительным в CFT. В любом случае, эти четыре CFT-положительных ягненка, вакцинированных мутантами Δ wzm, показали очень низкие титры антител против S/LPS, которые сохранялись в течение менее 6 недель после вакцинации (Фигура 11В). 100% животных, положительных по GDT-R/LPS (Фигура 11С), продемонстрировали, что все ягнята были правильно вакцинированы Rev1 Δ wzm::gfp или мутантом 16M Δ wzm::gfp, что указывает на отсутствие S/LPS-реакций, возникающих благодаря природе O-PS, накопленных у Δ wzm мутантов.

На Фигуре 11D показано, что ягнята, которых инокулировали 16M Δ wzm::gfp, также продуцировали антитела, которые связываются с GFP. Эти антитела могут быть использованы в серологическом тесте для дифференциации вакцинированных и инфицированных ягнят. Кроме того, этот вид теста также можно использовать для дифференциации ягнят, инокулированных Rev1 Δ wzm::gfp, и инфицированных ягнят.

Пример 16. Эффективность вакцинации Rev1 Δ wzm::gfp против экспериментальной инфекции *B. ovis* PA у баранов.

Самцы и самки ягнят Rasa Aragonesa, родившиеся в экспериментальном стаде Исследовательского центра технологий (CITA) del Gobierno de Aragón (Сарагоса, Испания), использовались в этих экспериментах в возрасте 3-4 месяцев. Эти животные были размещены в уполномоченных учреждениях CITA (регистрационный номер ES/50-2970-12005), обрабатывались и подвергались манипуляциям в соответствии с рекомендациями FELASA (www.felasa.eu) и ARRIVE (Kilkenny et al., 2010. PLoS Biology, 8: e1000412).

Ягнят (n=14) вакцинировали путем подкожной инъекции $1-2 \times 10^{10}$ КОЕ Rev1 Δ wzm::gfp. Одна группа (n=13), оставшаяся невакцинированной, использовалась в качестве контроля. После этого безвредность оценивали путем клинического осмотра (температура тела прямой кишки и пальпация места инокуляции) в течение одного месяца после вакцинации и путем периодического осмотра эпидидимиса и яичек на протяжении всего эксперимента. Через 8 месяцев после вакцинации всех ягнят экспериментально инфицировали 2×10^9 КОЕ *B. ovis* PA конъюнктивальным и препуциальным путями (30 мкл/каждый путь) КОЕ и забивали через 2 месяца для бактериологических целей. Образцы селезенки, эпидидимиса, семенного пузырька и краниальные, прескапулярные, круральные образцы и подвздошных и мошоночных лимфатических узлов отбирали, гомогенизировали в стерильном PBS и культивировали в двух экземплярах в среде CITA (De Miguel et al. 2011. Journal of Clinical Microbiology. 49 (4): 1458-1463). Количество и процент инфицированных животных и образцов определяли, как описано ранее (Grilló et al. 2009. Vaccine, 27: 187-191)

и средний индекс инфекции рассчитывали как сумму уровней инфекции, которые оценивали для каждого образца, деленную на все образцы, обработанные из каждой группы. Уровень инфекции оценивали следующим образом: 1 (1-5 КОЕ), 2 (6-25 КОЕ); 3 (26-125 КОЕ); 4 (126-300 КОЕ); 5 (> 300 КОЕ). Статистические сравнения процентов и средних значений были выполнены с помощью критериев хи-квадрата и Крускала-Уоллиса, соответственно.

Как показано в Таблице 7, вакцинация ягнят в возрасте 3-4 месяцев с помощью Rev1Δwzm::gfp обеспечивает значительную защиту от заражения инфекцией *V. ovis* PA в возрасте 11-12 месяцев, причем это касается не только количества инфицированных животных, но также количества образцов, детектированных как зараженные *V. ovis* PA. Кроме того, уровень инфекции, наблюдаемый в группах обеих вакцин, был ниже, чем в невакцинированной контрольной группе.

Таблица 7. Эффективность против инфекции *V. ovis* PA у баранов, вакцинированных Rev1Δwzm::gfp в возрасте 3-4 месяцев.

Группа вакцинации ¹	№. (%) Инфицированных / всего животных	№. (%) инфицированных/ всего образцов	Средний индекс инфекции ²
Rev1Δwzm::gfp	5/14 (35,7%) ^a	15/ 112 (13,4%) ^b	0,29
Невакцинированные	12/13 (92,3%)	47/ 104 (45,2%)	1

¹Самцов ягнят в возрасте 3-4 месяцев вакцинировали подкожно 2×10^{10} КОЕ Rev1Δwzm::gfp, заражали через 8 месяцев после вакцинации и анализировали бактериологически через 2 месяца после заражения; ²Средний индекс инфекции=сумма уровней инфекции, которые оценивали для каждого образца, деленная на все образцы, обработанные из каждой группы; Статистические сравнения: ap=0,002; bp <0,0001.

Пример 17. Иммунные сыворотки ягнят, вакцинированных Rev1Δwzm, эффективны против вирулентных штаммов *V. melitensis* H38 и *V. abortus* 2308 S-LPS.

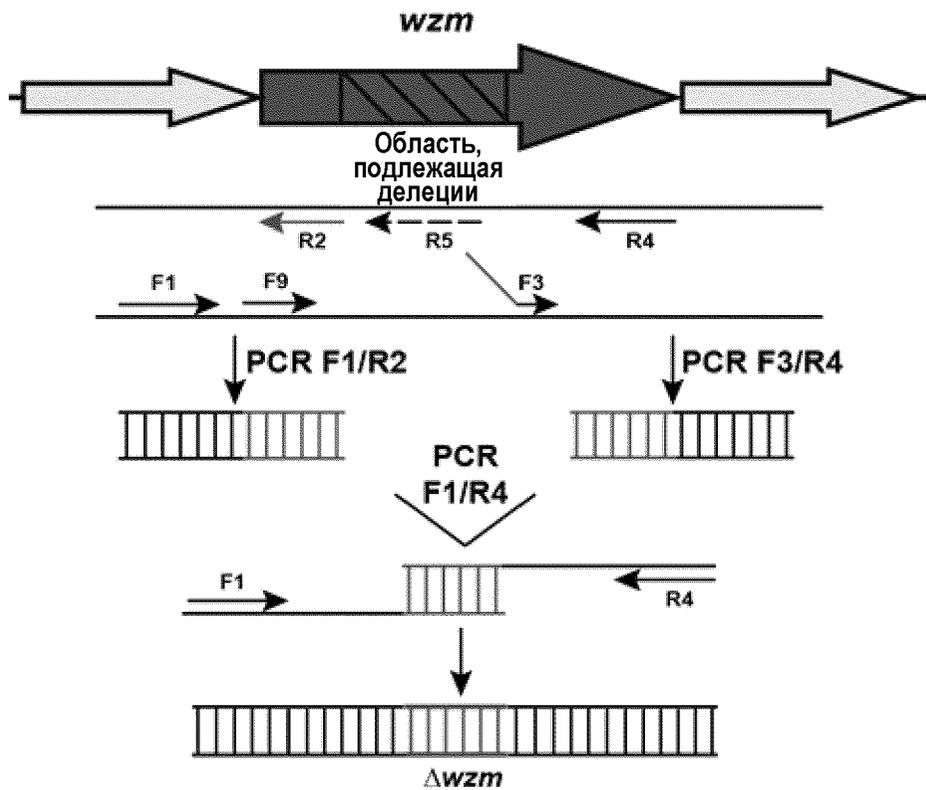
Экспоненциально выращенные *V. melitensis* H38, *V. abortus* 2308 и *V. ovis* PA доводили до 10^4 КОЕ/мл в PBS и смешивали с трехкратным повторением в планшетах для микротитрования (45 мкл/лунку) с 90 мкл/лунку нормальной или термообработанной (1 ч, 56 °C) сыворотки, извлеченной из ягнят, демонстрирующих антитела против R/LPS в GDT-R/LPS (один из них также был положительным в CFT) через 2 недели после инокуляции Rev1Δwzm. После 18 ч инкубации при 37 °C и 10% CO₂ для *V. ovis* в каждую лунку вносили 65 мкл TSB, бактериальную суспензию смешивали, и 50 мкл высевали на BAV в трех экземплярах. Результаты выражали в виде стандартизированного процента количества бактерий по отношению к первоначальному количеству в инокуляте. Как видно из Фигуры 12, иммунная сыворотка ягнят, обработанных Rev1Δwzm, была способна уничтожить либо *V. melitensis* H38, *V. abortus* 2308, либо *V. ovis* PA.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

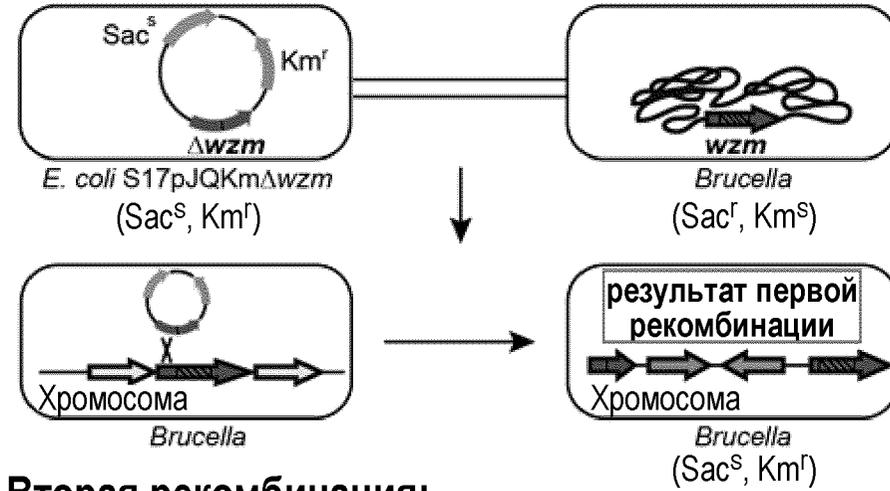
1. Модифицированный штамм *Brucella melitensis* Rev1, в котором ген *wzm* инактивирован, для применения в профилактике бруцеллеза.
2. Штамм для применения по п.1, в котором ген *wzm* частично deletирован.
3. Штамм для применения по п.2, в котором по меньшей мере 50% SEQ ID NO: 1 deletировано.
4. Штамм для применения по любому из пп. 1-3, причем штамм был дополнительно модифицирован для экспрессии флуоресцентного белка.
5. Штамм для применения по любому из пп. 1-4, причем штамм был лиофилизирован.
6. Штамм для применения по любому из пп. 1-5, причем инфекционный агент, вызывающий бруцеллез, выбран из группы, состоящей из *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*, *Brucella microti*, *Brucella ceti* и *Brucella pinnipedialis*.
7. Штамм для применения по любому из пп. 1-6, причем штамм используют для профилактики бруцеллеза у человека, крупного рогатого скота, коз, овец, свиней и/или собак.
8. Набор, содержащий:
 - (i) модифицированный штамм *Brucella melitensis* Rev1, в котором ген *wzm* был инактивирован, и
 - (ii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель; для применения в профилактике бруцеллеза.
9. Набор для применения по п.8, в котором ген *wzm* частично deletирован.
10. Набор по п.9, в котором по меньшей мере 50% SEQ ID NO: 1 deletировано.

По доверенности

ФИГ.1

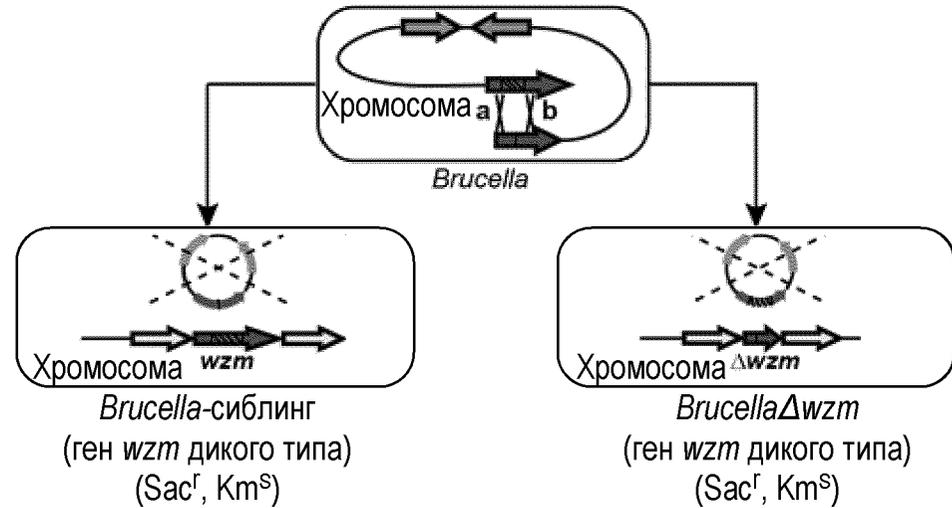


Конъюгация и первая рекомбинация:

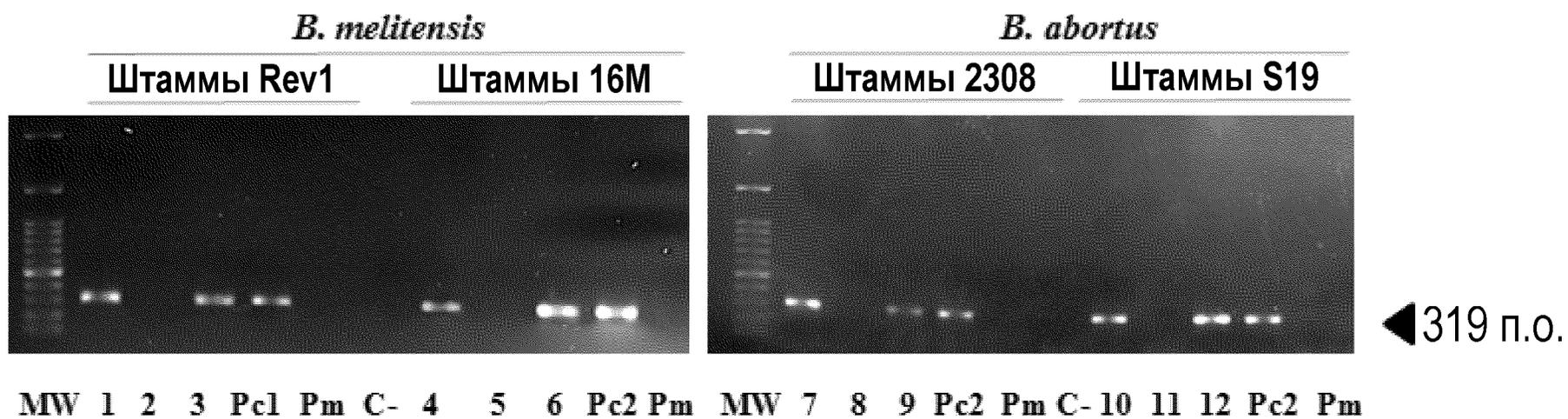


1/15

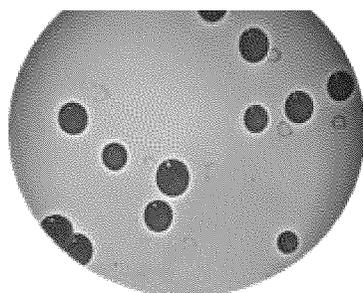
Вторая рекомбинация:



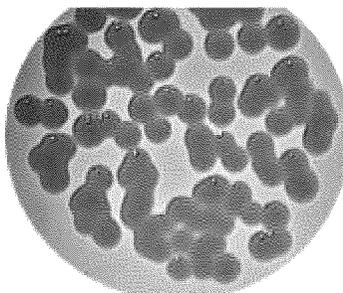
ФИГ.2



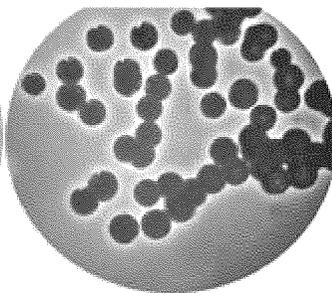
ФИГ.3



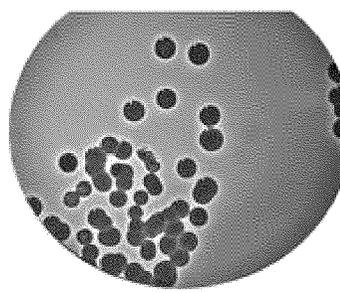
Rev1 Δ wzm



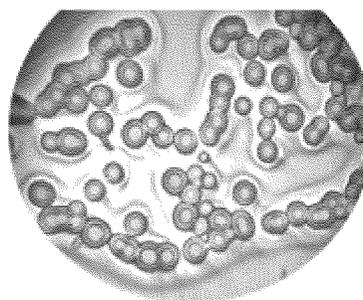
16M Δ wzm



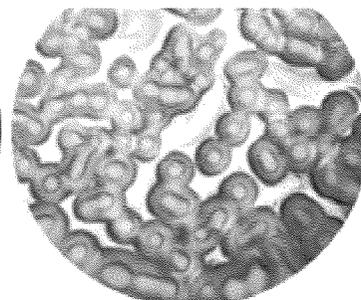
2308 Δ wzm



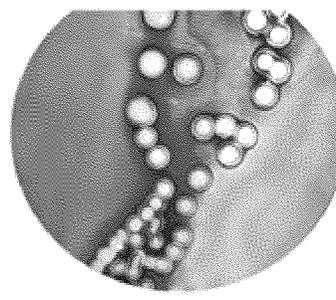
S19 Δ wzm



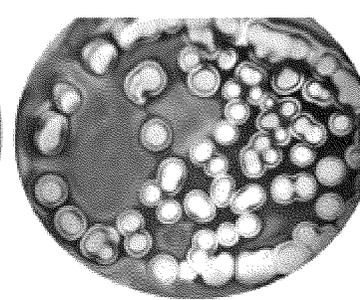
Rev1-сиблинг



16M-сиблинг



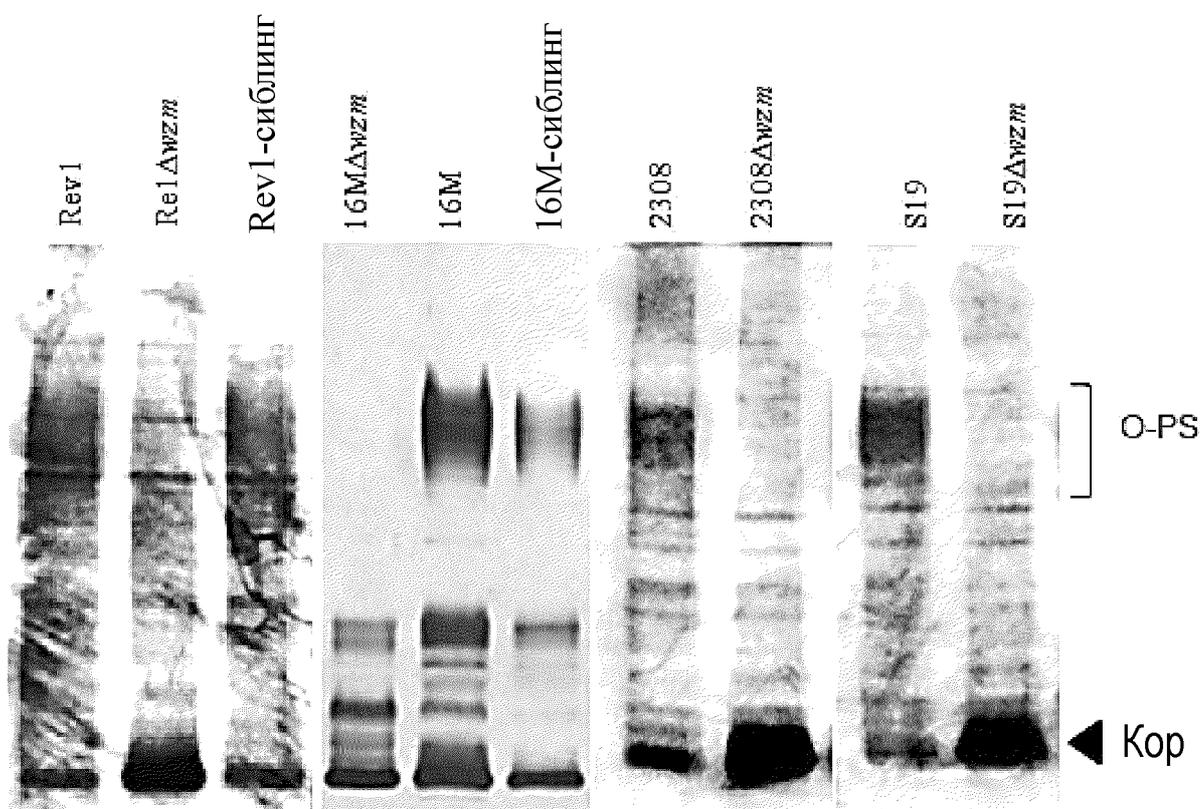
2308-сиблинг



S19-сиблинг

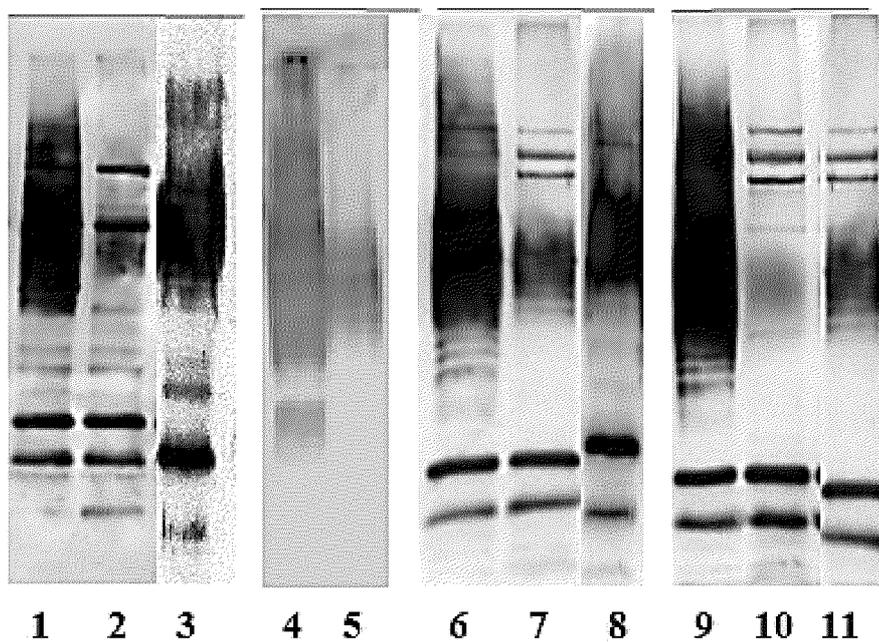
ФИГ.4

A)



B)

Rev1 (Анти-М) 16M (Анти-С) 2308 (Анти-А) S19 (Анти-А)



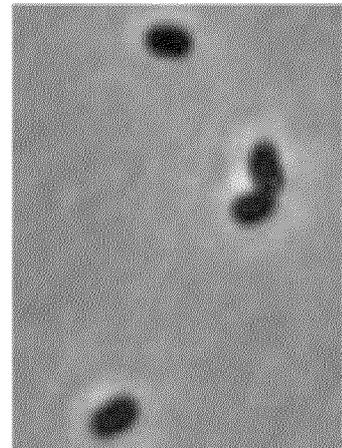
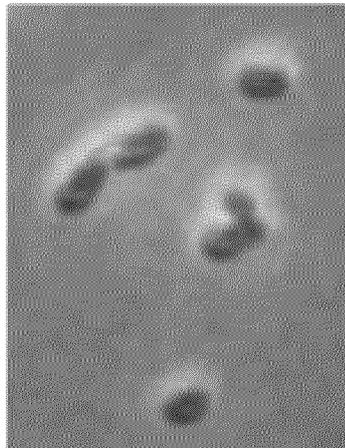
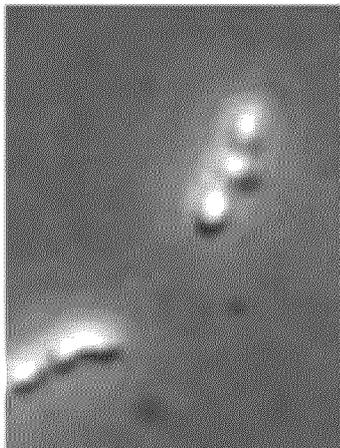
ФИГ.4 (продолжение)

С)

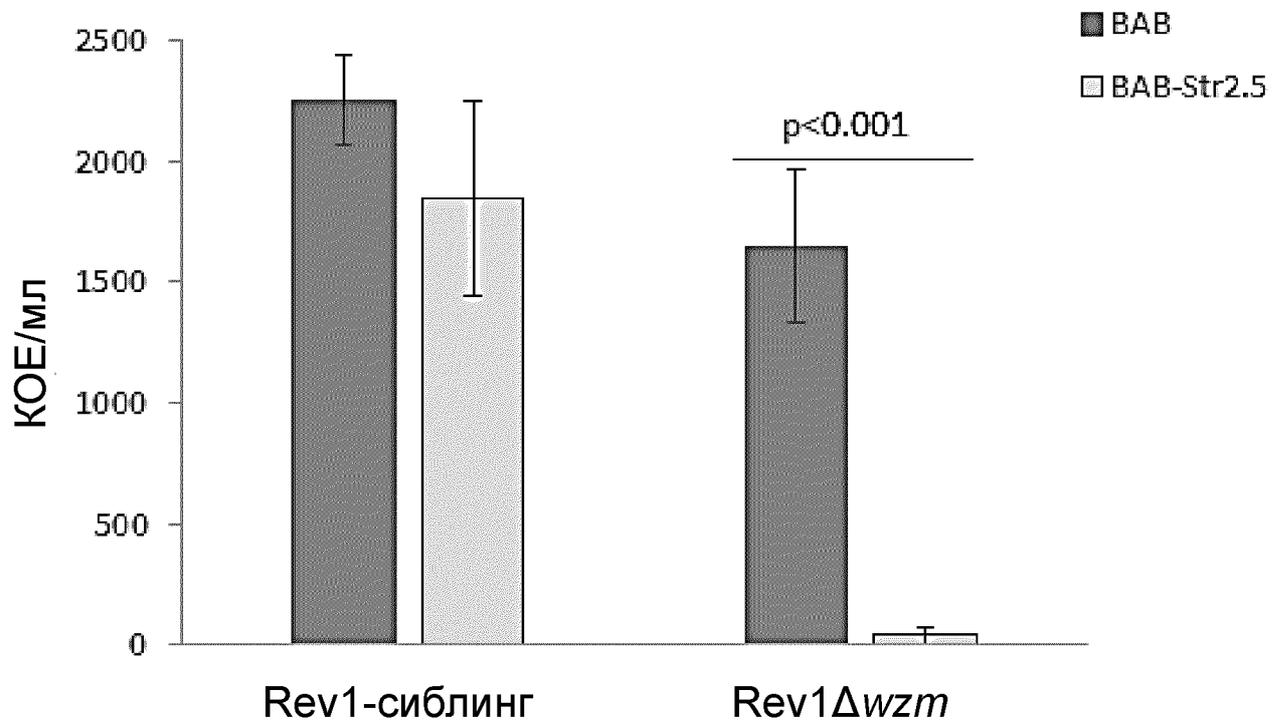
16M Δ wzm::*gfp*-pBBR-*wzm*

16M Δ wzm::*gfp*

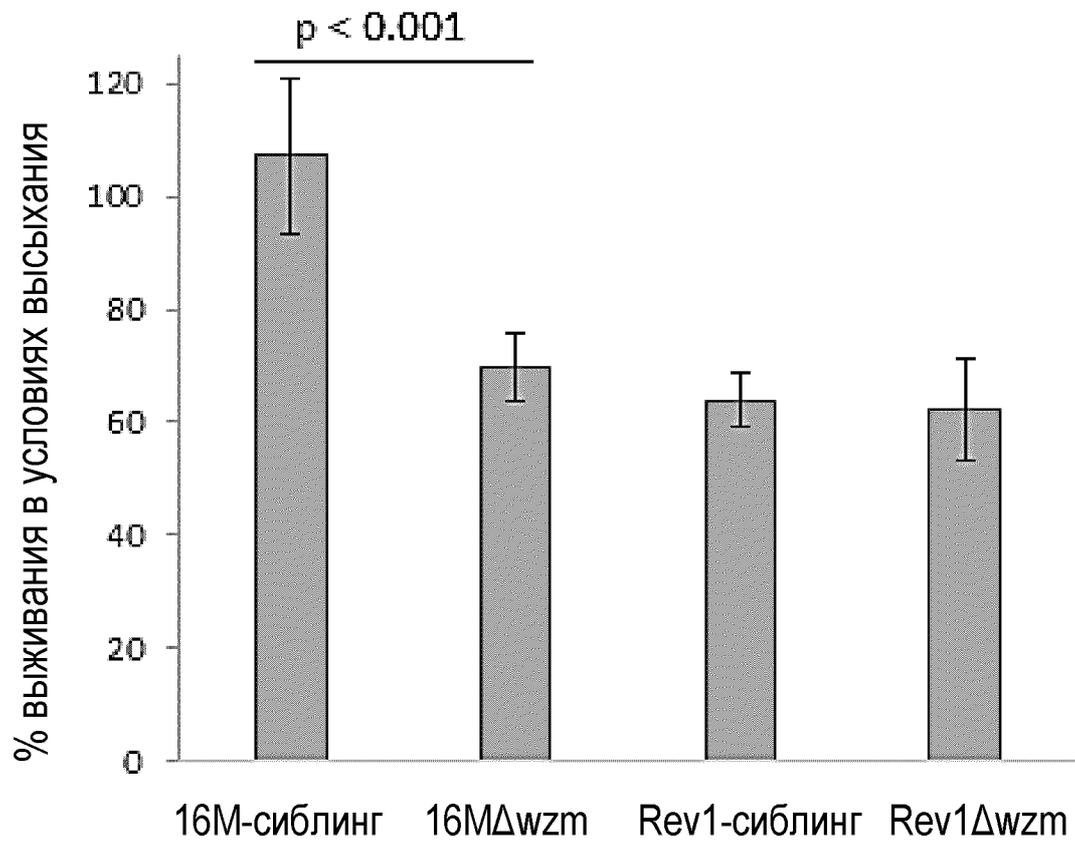
16M-сиблинг



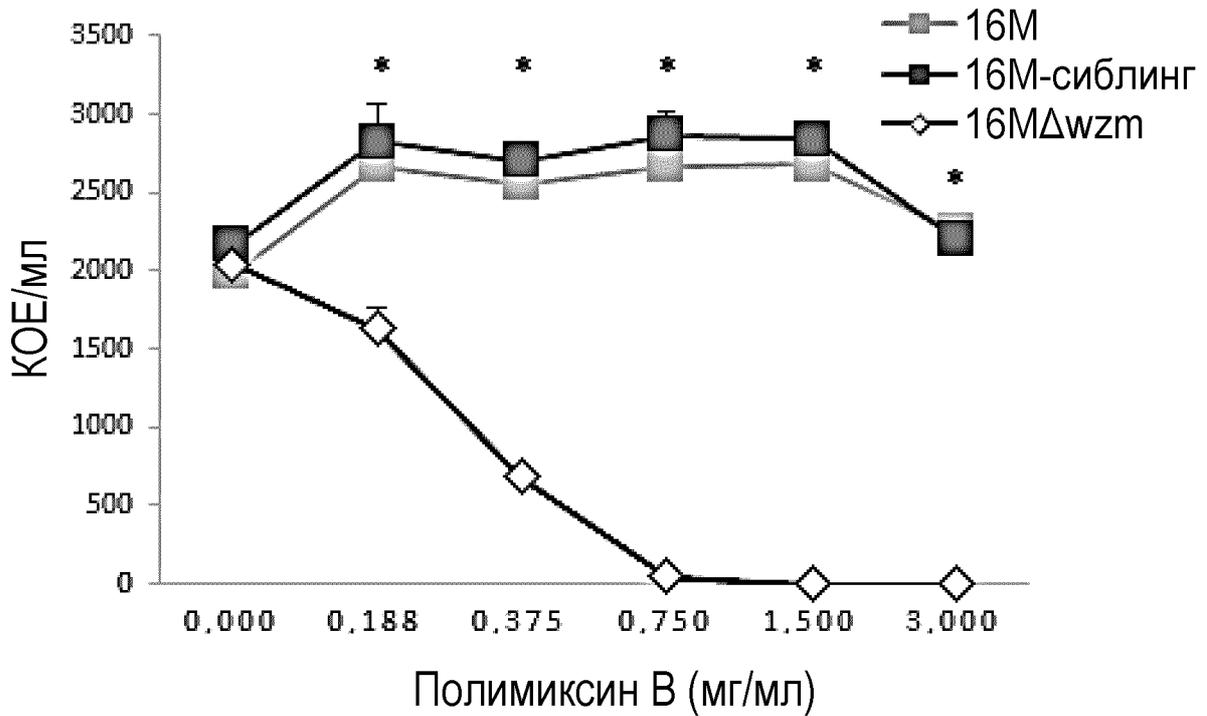
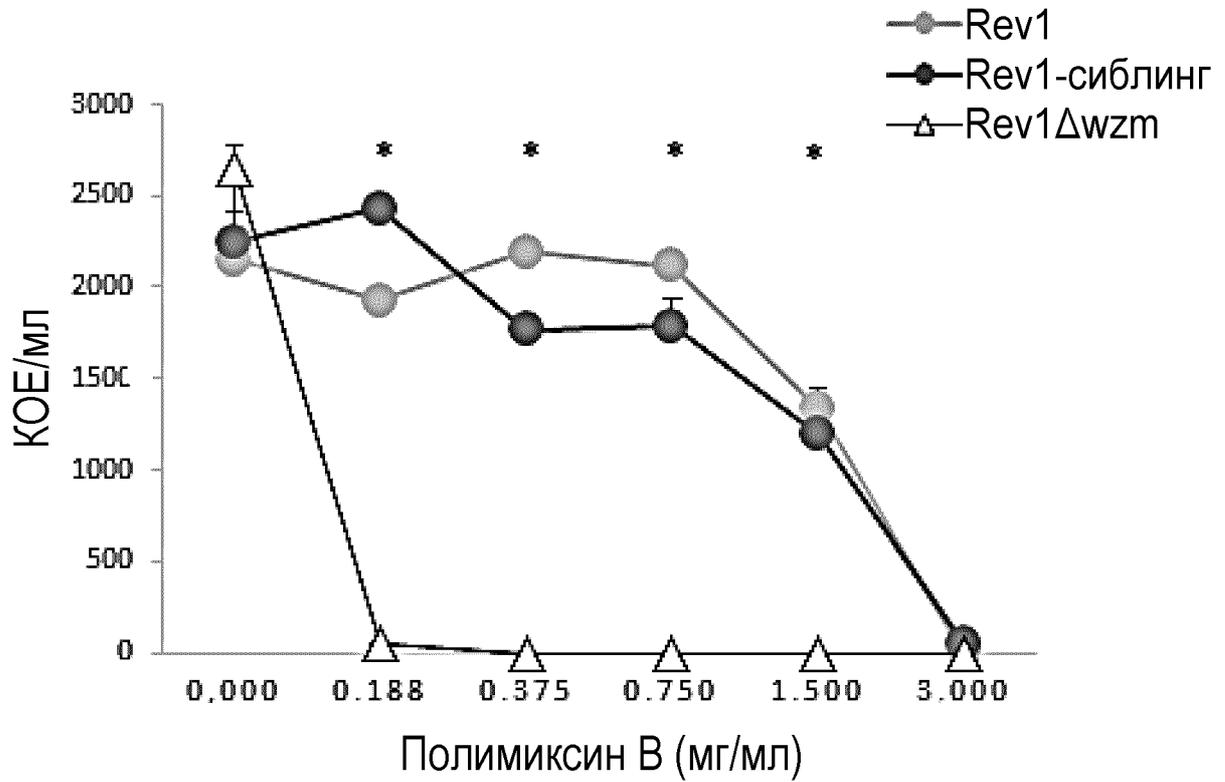
ФИГ.5



ФИГ.6



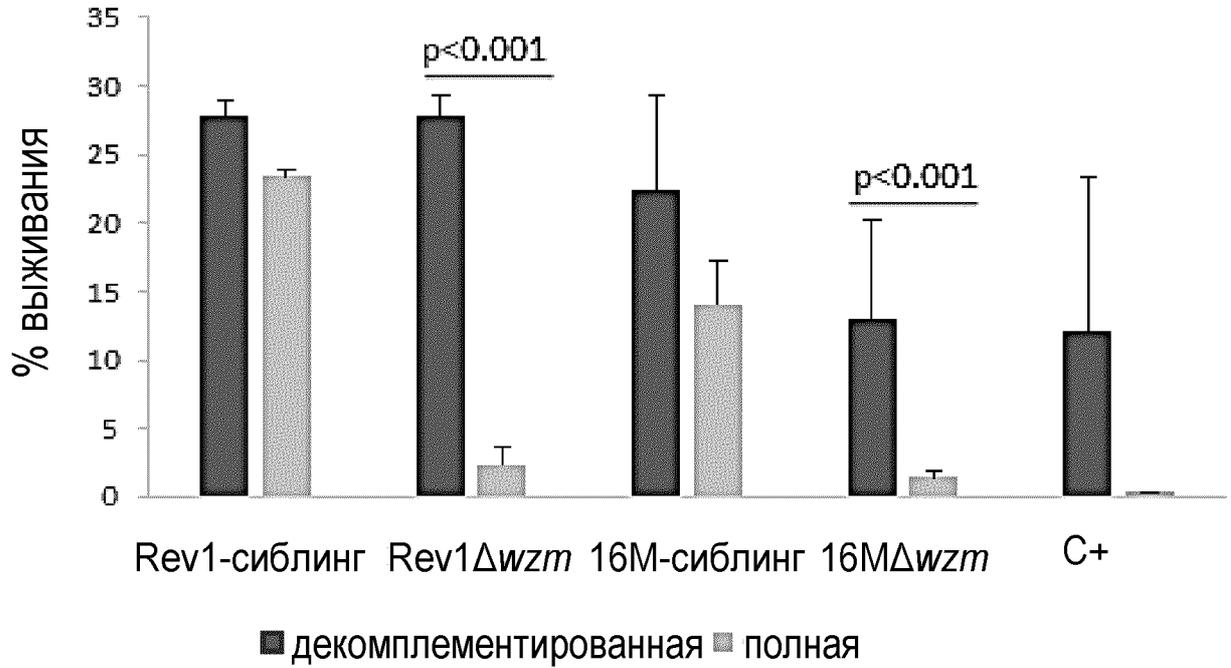
ФИГ.7



ФИГ.8

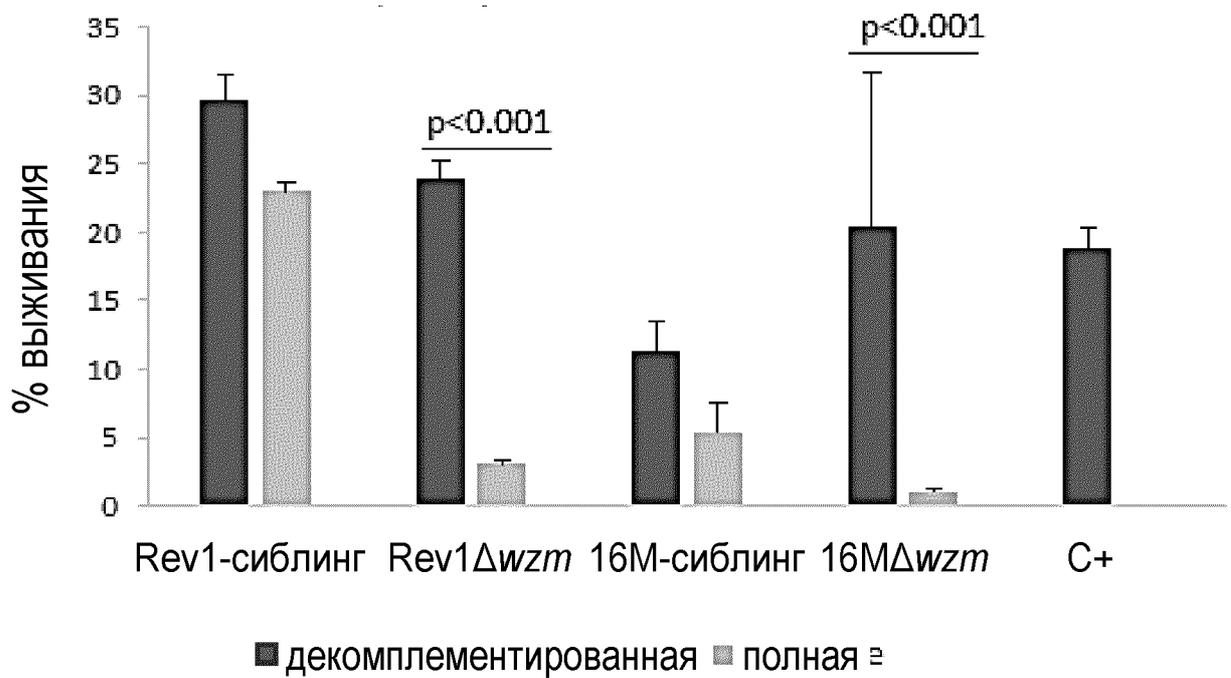
А)

Восприимчивость к овечьей сыворотке

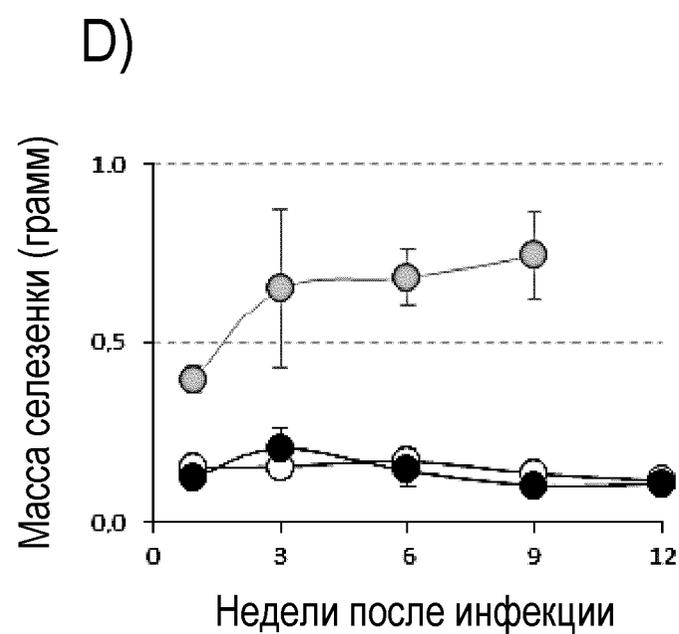
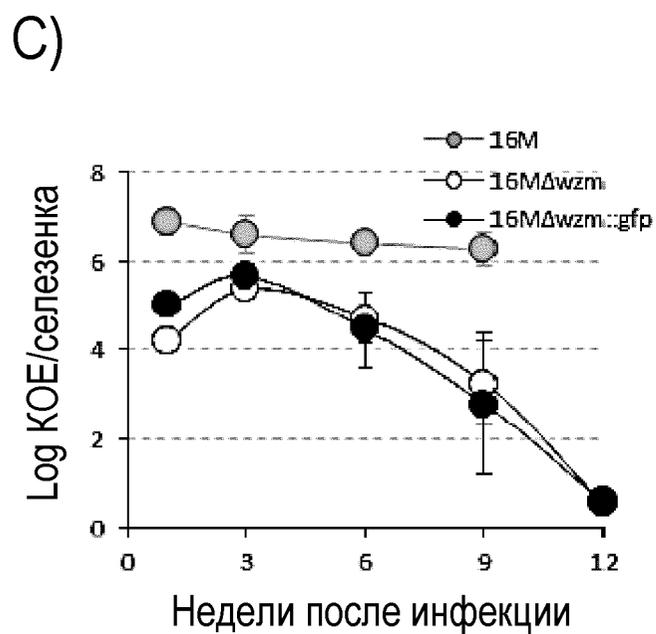
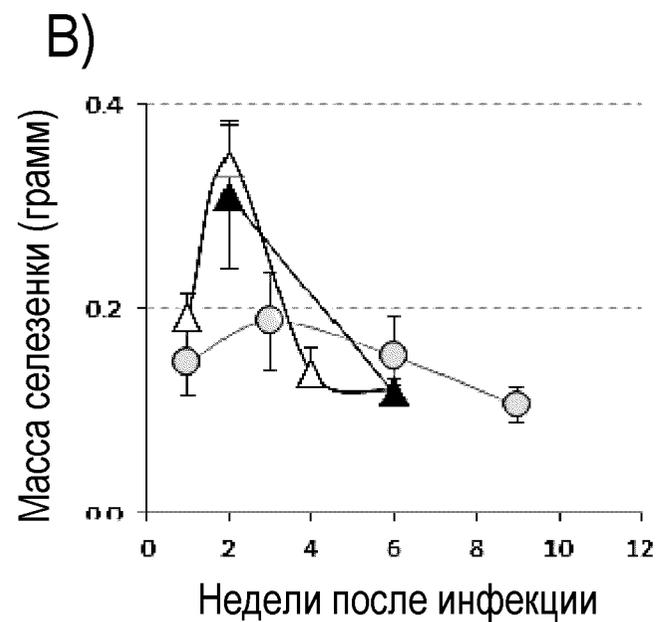
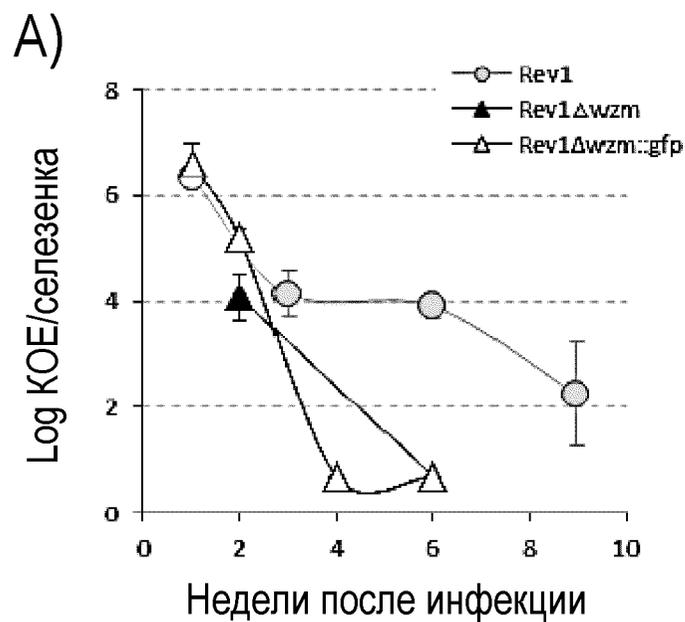


В)

Восприимчивость к бычьей сыворотке

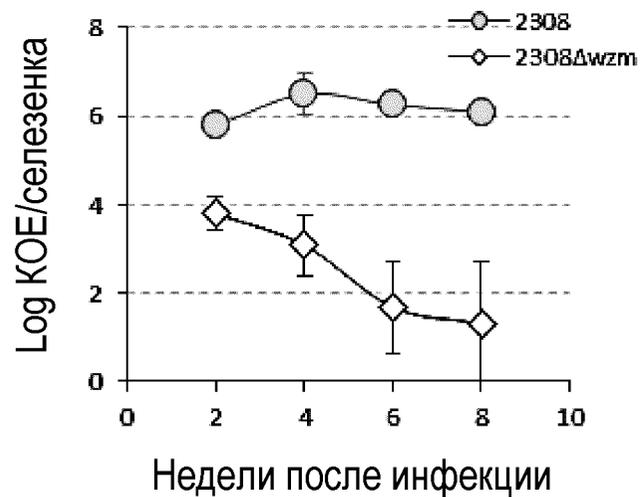


ФИГ.9

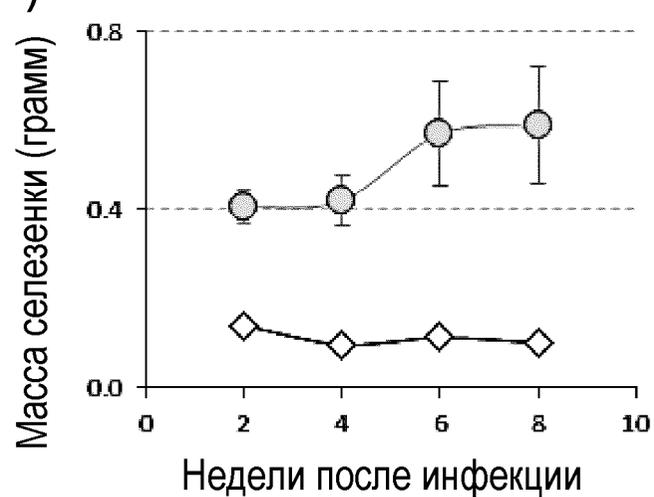


ФИГ.9 (продолжение)

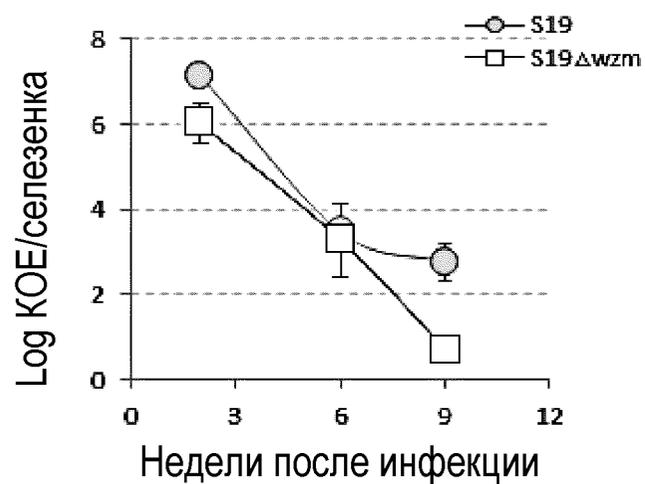
Е)



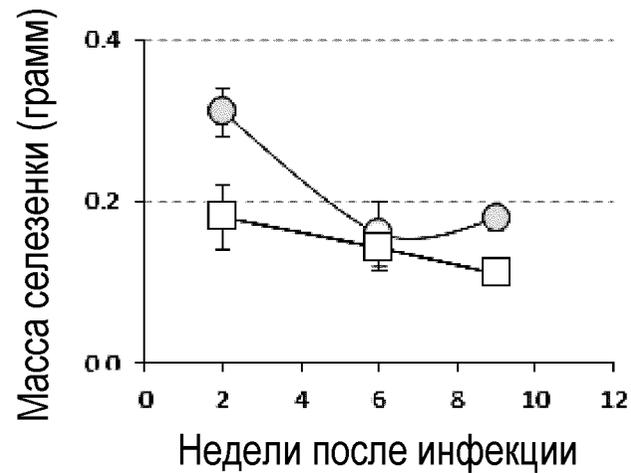
Ф)



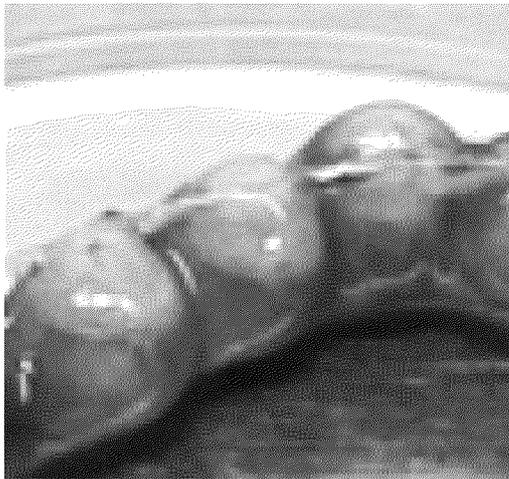
Г)



Н)



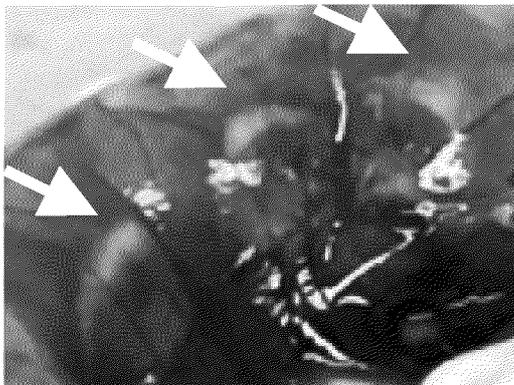
ФИГ.10



Rev1



Rev1 Δ wzm



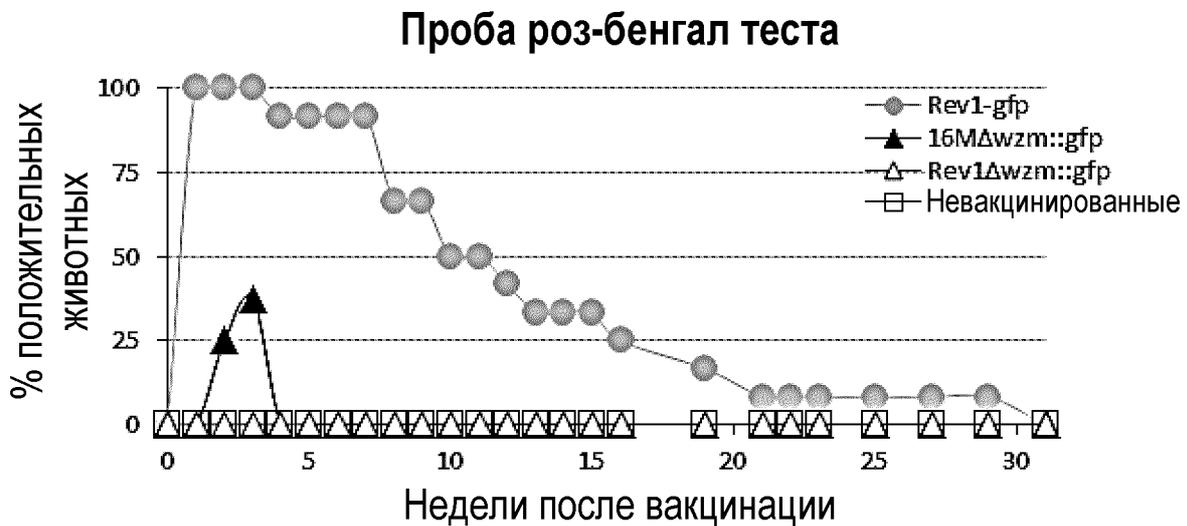
16M



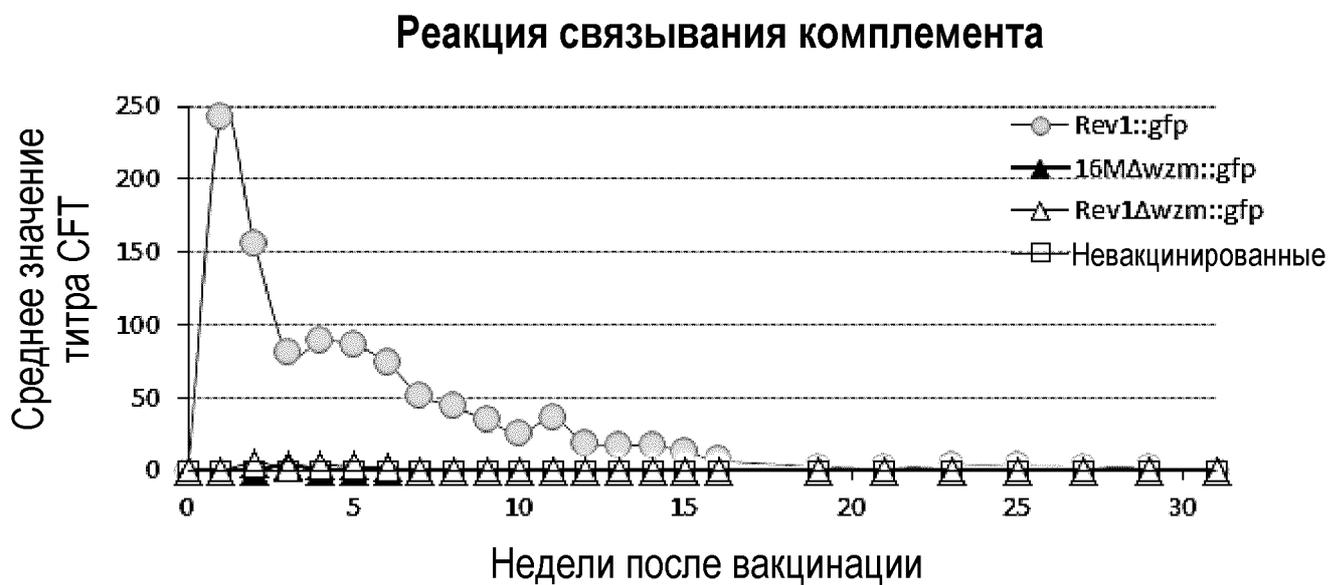
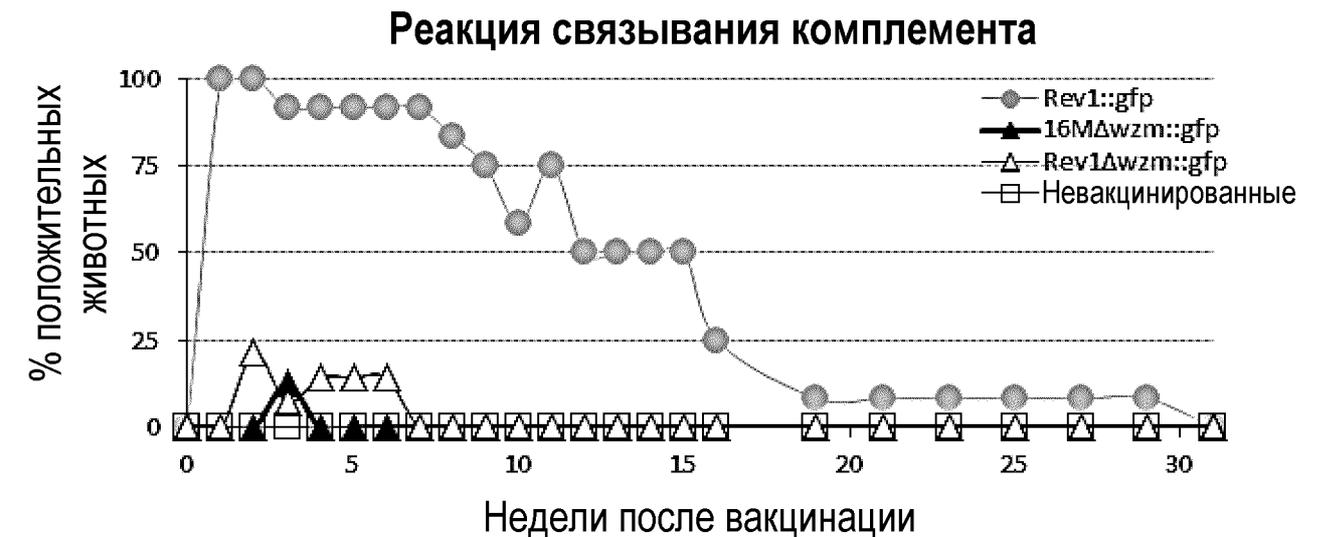
16M Δ wzm

ФИГ.11

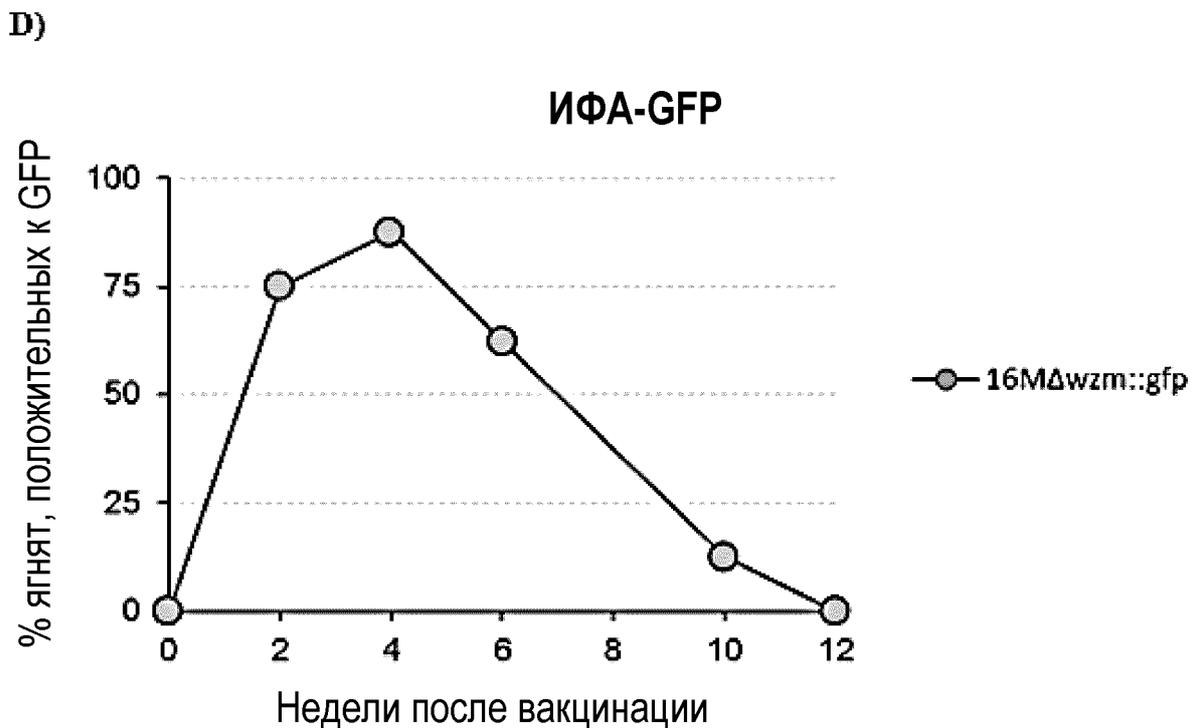
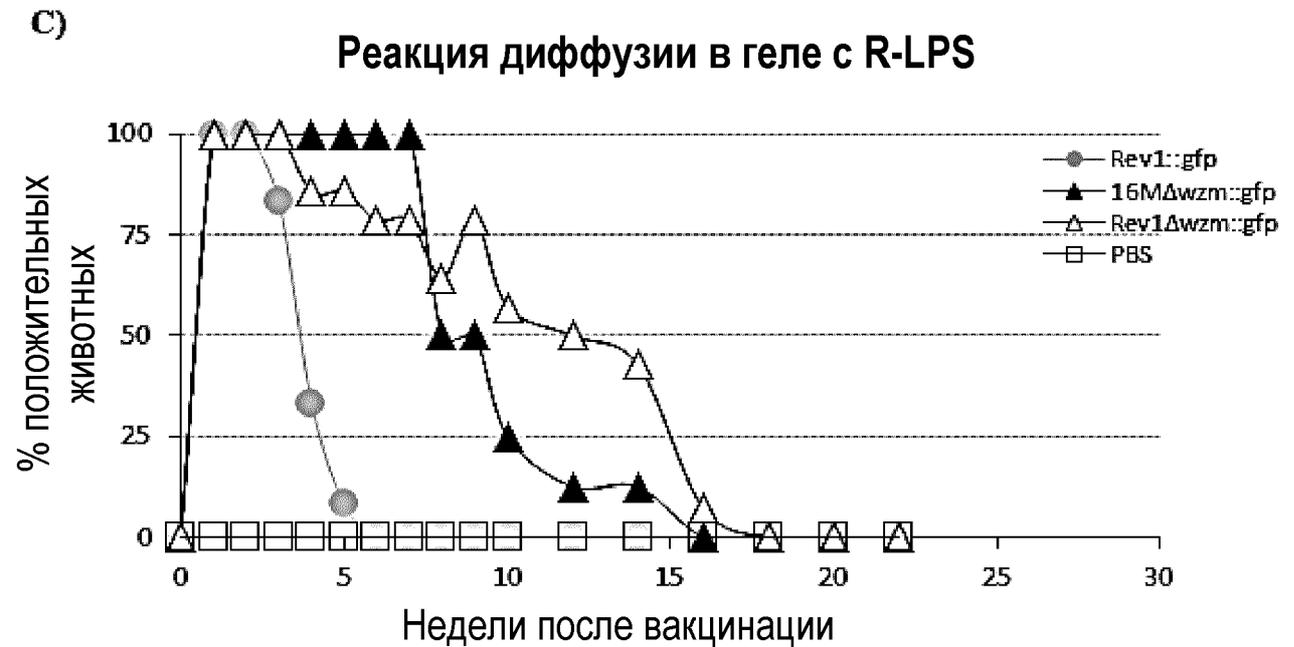
А)



В)



ФИГ.11 (продолжение)



ФИГ.12

