



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.02

(21) Номер заявки
201891129

(22) Дата подачи заявки
2016.11.15

(51) Int. Cl. **A61K 39/04** (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

**(54) КОЖНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НА ТУБЕРКУЛЕЗ У
ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ**

(31) **РА 2015 00739; РА 2016 00064**

(32) **2015.11.18; 2016.02.01**

(33) **DK**

(43) **2019.02.28**

(86) **PCT/DK2016/050366**

(87) **WO 2017/084671 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СТЭЙТЭНС СЕРУМ ИНСТИТУТ
(DK)**

(72) Изобретатель:
**Аггербек Хенрик, Андерсен Питер
Лаваец, Рухвалд Мортен (DK)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю., Лыу
Т.Н., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.,
Гизатуллина Е.М. (RU)**

(56) Morten Ruhwald: "WHAT ARE THE PROSPECTS OF AN "IGRA-SKINTEST"?", 22 September 2014 (2014-09-22), pages 1-14, XP055336032, 2nd European Advanced Course in Clinical Tuberculosis Retrieved from the Internet: URL: https://www.kncvtbc.org/uploaded/2015/09/2014-09-22_nr_5_morten_ruhwald-prospects_of_an_igra-skintest_0.pdf [retrieved on 2017-01-17] page 9 - page 11

HENRIK AGGERBECK ET AL: "High heritability of antimycobacterial immunity in an area of hyperendemicity for tuberculosis disease", PLOS ONE, vol. 201, no. 5, 14 May 2013 (2013-05-14), page 15, XP055335518, DOI: 10.1371/journal.pone.0064215 the whole document

AGGERBECK ET AL: "Safety of ESAT-6", TUBERCULOSIS, ELSEVIER, GB, vol. 86, no. 5, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 363-373, XP005596693, ISSN: 1472-9792, DOI: 10.1016/

J.TUBE.2005.08.020 page 364, right-hand column, paragraph 1

WO-A1-2011135369

A.L.N. CHAPMAN: "Rapid detection of active and latent Mycobacterium tuberculosis infection in HIV-infected Zambians by enumeration of RD1 gene product-specific T cells", TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, ELSEVIER, GB, vol. 95, no. 3, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 244-249, XP004608001, ISSN: 0035-9203, DOI: 10.1016/S0035-9203(01)90225-1 abstract

KARIN WELDINGH ET AL: "ESAT-6/CFP10 Skin Test Predicts Disease in M. tuberculosis-Infected Guinea Pigs", PLOS ONE, vol. 3, no. 4, 23 April 2008 (2008-04-23), pages 1-6, XP055335343, DOI: 10.1371/journal.pone.0001978 the whole document

ABDULRAHMAN S. HAMMOND ET AL: "Mycobacterial T Cell Responses in HIV-Infected Patients with Advanced Immunosuppression", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, JID, vol. 197, no. 2, 15 January 2008 (2008-01-15), pages 295-299, XP055335349, CHICAGO, IL, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/524685 the whole document

S N M Hanif ET AL: "Species-specific antigenic Mycobacterium tuberculosis proteins tested by delayed-type hypersensitivity response", INT J TUBERC LUNG DIS, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 489-494, XP055335364, Retrieved from the Internet: URL: <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/iatld/10273719/v14n4/sl8.pdf?expires=1484319926&id=89666843&titleid=3764&accname=European+Patent+Office&checksum=1628395289972FA685B3BE7E6A5D3786> [retrieved on 2017-01-16] the whole document

CHAPMAN A L N ET AL: "RAPID DETECTION OF ACTIVE AND LATENT TUBERCULOSIS INFECTION IN HIV-POSITIVE INDIVIDUALS BY ENUMERATION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS-SPECIFIC TCELLS", AIDS, LONDON, GB, vol. 16, no. 17, 22 November 2002 (2002-11-22), pages 2285-2293, XP009019153, ISSN: 0269-9370, DOI: 10.1097/00002030-200211220-00008 the whole document

(57) Настоящее изобретение раскрывает применение антигенов Mycobacterium tuberculosis для применения при определении in vivo наличия инфекции Mtb у иммунокомпрометированных людей или людей, коинфицированных ВИЧ, и для получения диагностического реагента для кожного тестирования (реагент для кожного теста) для надежной оценки наличия инфекции Mtb у индивида, в которой индивидом является иммунокомпрометированный человек или человеком, коинфицированным ВИЧ.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к применению антигенов *Mycobacterium tuberculosis* для получения композиции специфического кожного теста с улучшенной эффективностью диагностики ТБ у людей, инфицированных *M. tuberculosis* и ВИЧ. В настоящем изобретении предоставлена композиция, содержащая антигены *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) для диагностики *in vivo* инфекции Mtb у иммунокомпрометированных людей или людей, инфицированных ВИЧ, при этом реагент содержит смесь двух антигенов ESAT6 и CFP-10.

Предшествующий уровень техники

Обзор TB/PPD.

С момента его открытия в 1908 году Робертом Кохом очищенный белковый дериват туберкулин (PPD) использовали в качестве диагностического теста для латентной инфекции Mtb.

Применение диагностического теста для латентной инфекции Mtb для направления профилактического лечения оказывает значительное влияние на дальнейшее развитие заболевания ТБ. Люди, инфицированные Mtb, не имеют симптомов и требуют более мягкого протокола лечения, тогда как пациенты с активным заболеванием ТБ имеют тяжелое заболевание, высокую смертность и требуют более длительного и более сложного лечения. Предполагается, что инфицировано Mtb 1/3 мирового населения, активный туберкулез ежегодно развивается у 8 миллионов человек, из которых 1,3 миллиона умирают.

При использовании в качестве диагностического теста небольшой объем, составляющий 0,1 мл PPD, вводят в верхний слой кожи, и спустя 2-3 дня можно определить положительную реакцию путем измерения уплотнения кожи, используя простую линейку. Иммунологическая основа кожной реакции на PPD состоит в реакции гиперчувствительности замедленного типа IV типа, реакции, опосредованной в первую очередь PPD-специфичными Т-клетками Th1.

PPD при использовании, как описано у Mendel и Mantoux, одобрен Всемирной организацией здравоохранения с 1955 года, а туберкулиновая кожная проба (TST) на основе PPD остается одной из наиболее широко используемых диагностических тестов, причем ежегодно выполняется более 50 миллионов проб.

PPD представляет собой сложный культуральный фильтрат из *M. tuberculosis*, включающий, помимо липидов и углеводов, более 1000 белковых антигенов. Это делает PPD широко распознаваемым у людей, инфицированных Mtb, и он является весьма иммуногенным, стимулируя сильный ответ Т-клеток Th1 в коже. Однако неочищенный и сложный состав PPD также является причиной проблем с PPD TST. Важно отметить, что множественные антигены в PPD также распознаются регуляторными Т-клетками, CD1-рестриктированными Т-клетками и Th2-клетками, которые могут избирательно ингибировать реакцию IV типа. Кроме того, множественные антигены в PPD также экспрессируются микобактериями окружающей среды и *Bacillus Calmette-Guérin* (БЦЖ), используемыми для вакцинации против туберкулеза, что делает тест PPD неспецифичным.

ВИЧ и иммунокомпрометированные люди.

Еще одной серьезной проблемой, связанной с использованием TDP PPD, является его ненадежность у иммунокомпрометированных людей. В частности, у людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), PPD TST часто становится невосприимчивой и ложноотрицательной или может оказаться ложноположительной вследствие применения слишком низкого порога.

Иммунологическая основа воздействия ВИЧ на способность PPD вызывать кожную реакцию IV типа является сложной, однако установлено, что основной причиной является избирательная утрата CD4 Т-клеток вследствие ВИЧ-инфекции. Следовательно, иммунодефицит, вызванный потерей CD4 Т-клеток, является основополагающим фактором, приводящим к заболеванию от оппортунистических патогенных вирусов и бактерий (отличительный признак ВИЧ/СПИД), а также к неспособности реагировать на PPD TST.

Последствие этой дилеммы может быть смертельным. Часто ВИЧ-инфекция (или другой иммунодефицит) не диагностируется во время тестирования PPD TST. Поэтому ответственный врач часто ошибочно полагается на результат PPD TST. Это ложное чувство безопасности часто приводит к ошибочному диагнозу и отсутствию адекватного лечения инфекции Mtb, что приводит к дальнейшему развитию активного заболевания ТБ. Фактически, инфицированные Mtb больные с ВИЧ/СПИД имеют 10% ежегодный риск развития ТБ, а ТБ представляет собой заболевание, которое убивает большинство пациентов с ВИЧ/СПИД.

Решение проблемы перекрестной реактивности к БЦЖ.

Как указано выше, основным ограничением для PPD TST является перекрестная реактивность в отношении БЦЖ и микобактерий окружающей среды. Перекрестная реактивность уменьшает специфичность и потенциально приводит к избыточному лечению вследствие ложноположительных ответов. Проблема специфичности может быть решена до некоторой степени, но не полностью, путем увеличения порога для TST с 5 мм уплотнения до 10 мм или даже 15 мм, однако увеличение порога снижает чувствительность теста.

Если не было предложено адекватное лечение инфекции Mtb, дальнейшая потеря чувствительности может оказаться фатальной особенно для ВИЧ-инфицированных и других крупных групп пациентов с

высоким риском развития ТВ. Таким образом, для оптимальной результативности PPD TST перед тестированием TST PPD, например, у вакцинированных БЦЖ, потребовалось бы тестирование на ВИЧ. Однако из-за ограниченных ресурсов и запретов как среди поставщиков медицинских услуг, так и у пациентов тестирование на ВИЧ часто не предлагается или не принимается человеком, нуждающимся в тестировании PPD TST.

Эра специфического тестирования.

Открытие Mtb-специфических иммунодоминантных антигенов привело к значительному новому пути диагностики инфицирования Mtb. Предшествующая работа показала возможность замены PPD TST на тест, который анализировал *in vitro* выработку Т-клетками интерферона-гамма (IFN- γ) в ответ на антигены Mtb. Примерно в то же время важным шагом вперед стало открытие высокоиммуногенных антигенов, ранней секреторной антигенной мишени-6 (ESAT-6) и белка культурального фильтрата 10 (CFP-10), что значительно улучшило специфичность. Эти антигены закодированы в области различий гена 1 (RD1) возбудителя и, следовательно, отсутствуют у всех вакцинных штаммов бактерий *Bacille Calmette Guérin* (БЦЖ) и большинства нетуберкулезных микобактерий (за исключением *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium szulgai*).

Основу для обнаружения Mtb инфекции в двух коммерчески доступных тестах анализа секреции IFN- γ (IGRA): QuantiFERON-TB Gold (QIAGEN, Germany) и T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK) составляют ответы IFN- γ на перекрывающиеся пептиды закодированных RD антигенов ESAT-6 и CFP-10.

QuantiFERON-TB Gold (QFT, QIAGEN, Germany), метод иммунной пробы цельной крови, связанный с ферментом (ELISA), имеет европейский знак соответствия и одобрение Американского управления по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) для обнаружения как латентной ТВ инфекции, так и заболевания.

T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK), иммуноферментный спот-анализ (ELISPOT), который использует моноклеарные клетки периферической крови, имеет европейский знак соответствия и одобрение FDA.

Ограничения IGRA.

Однако, несмотря на очевидное превосходство, установленное для IGRA по сравнению с TST, IGRA имеет несколько ограничений.

Тесты IGRA на основе образцов крови требуют взятия крови, сложного лабораторного оборудования и обученного персонала для его проведения. Эти ограничения делают тест практически невозможным для реализации в условиях ограничения ресурсов, где такие тесты пользуются наибольшим спросом. Тесты IGRA также подвержены проблемам на предварительной аналитической стадии, например ложноотрицательные ответы вследствие отсроченного начала стадии инкубации.

По сравнению с PPD TST диагностическая эффективность тестов IGRA также требует, чтобы у человека, подвергаемого тестированию, смог сформироваться надежный иммунный ответ. Точно так же, как и в случае PPD TST, чувствительность IGRA может быть нарушена у людей с иммуносупрессией. В частности, пациенты с ВИЧ-инфекцией и низким количеством CD4 Т-клеток или пациенты, принимающие иммуносупрессивное лечение, часто испытывают ложноотрицательные или сомнительные ответы.

Вероятная основополагающая причина низкой результативности тестов IGRA у иммуносупрессированных заключается в том, что они основаны на обнаружении очень слабого IFN- γ -сигнала, считающегося положительным (17,5 пг/мл или 6 реактивных Т-клеток на 200000 PBMC). Такие низкие ответы граничат с пределами обнаружения наиболее чувствительных анализов, используемых в клинической медицине.

Таким образом, кожный тест, при котором иммунная реакция может быть вызвана потенциально любой специфической Т-клеткой, доступной в организме, по-видимому, сам по себе намного более надежен по сравнению с диагностическим тестом *in vitro*, при котором доступное количество Т-клеток ограничено небольшим числом клеток, содержащихся в образце.

В метаанализе Cattamanchi и коллег (JAIDS 2011, 56(3) 230-238) показано, что для ВИЧ-инфицированных людей с активным ТВ (суррогатный эталонный стандарт для латентной туберкулезной инфекции) в странах с низким и средним уровнем дохода оценки объединенной чувствительности были неоднородными, но выше для анализа T-SPOT.TB (72%; 95% CI, 62-81%), чем для анализа QFT (61%; 95% CI, 47-75%). Тем не менее, в прямом сравнительном исследовании ни один из IGRA не был более чувствительным, чем PPD TST. Авторы пришли к выводу, что на IGRA может меньше влиять степень ВИЧ-индуцированной иммуносупрессии по сравнению с TST PPD, но результаты различаются по географическим параметрам.

Потенциально жизнеугрожающие последствия ложноотрицательных результатов PPD TST и IGRA были описаны у Sester с соавт. (Am J Respir Crit Care Med. 2014 Nov 15; 190(10):1168-76. doi: 10.1164/rccm.201405-0967OC). В этом большом проспективном исследовании, включавшем 768 пациентов с ВИЧ-инфекцией, у восьми пациентов с ВИЧ-инфекцией во время наблюдения развивалось активное заболевание ТВ. Пять из 8 пациентов с установленным результатом теста IGRA во время скрининга

имели ложноотрицательный результат теста IGRA, и им не предлагали профилактическое лечение. Еще у 3 ВИЧ-инфицированных, у которых развился ТБ, результат теста IGRA был сомнительным. PPD TST проводили у всех 11, у которых развился ТБ. В этой группе только 4 из 11 протестированных были позитивными с использованием оптимизированной для ВИЧ порога, составившего 5 мм.

Диаскинтест представляет собой рекомбинантный слитый белок CFP10-ESAT6, продуцируемый *E. coli* BL21 (DE3)/pCF-ESAT. Белок экспрессируется в виде 6х гистидин-меченого белка, а в Российской Федерации производится Generium. Доза составляет 0,2 мкг/0,1 мл. Считается, что любой размер уплотнения указывает на инфицирование *Mtb*. Гистидиновая метка вызывает риск появления неоэпитопов. Сообщают о выполнении диаскинтеста с приемлемой специфичностью, но с высокой частотой (4-14%) везикулярных некротических изменений, лимфангита и лимфаденита (Kiselev, VI; Probl. Tuberk. Bolezn. Legk. 2009; 2:11-6). Повторные инъекции высоких доз антигена могут вызвать риск сенсибилизации, который может привести к ложноположительным реакциям, помимо этого, вызывая риск неблагоприятных реакций. Диаскинтест является единственным продуктом в клиническом применении. Несколько исследований изучали результативность диаскинтеста у ВИЧ-инфицированных людей и обнаружили очень сильное отрицательное влияние ВИЧ-инфекции на результативность диаскинтеста. Панкратова обнаружила 42,9% чувствительность у ВИЧ-положительных субъектов по сравнению с 79,7% у субъектов без ВИЧ-инфекции (Pankratova L et al, European Respiratory Journal 2012, vol 40, Suppl 56/P431), аналогичные значительные результаты были получены Литвиновым; 43,5% у ВИЧ-инфицированных по сравнению с 89,7% в ВИЧ-отрицательных случаях (Litvinov et al, Am J Respir Crit Care Med 185;2012:A4703).

Таким образом, PPD TST представляет собой привлекательный и простой тест на латентную инфекцию *Mtb*, однако компонент антиген PPD неспецифичен, а результаты теста PPD TST у ВИЧ-инфицированных часто являются ложноотрицательными. Тест IGRA основан на конкретных антигенах *Mtb* ESAT-6 и CFP10 и решает вопросы, связанные со специфичностью теста PPD TST, однако эти тесты сложны для реализации и выполнения, а также часто являются ложноотрицательными у ВИЧ-инфицированных людей. Диаскинтест предоставляет кожный тест с такой же специфичностью, как и у IGRA, однако эффективность диаскинтеста у ВИЧ-инфицированных значительно нарушена, причем у ВИЧ-инфицированных чувствительность снижена наполовину по сравнению с не инфицированными ВИЧ. Таким образом, существует необходимость в новом диагностическом кожном тесте на *Mtb* инфекцию со специфичностью, превосходящей TST PPD, и повышенной чувствительностью у ВИЧ-инфицированных.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящем изобретении раскрыт диагностический метод *in vivo* (кожное тестирование) и диагностические агенты для диагностики *Mtb* у иммунокомпрометированных людей или людей, коинфицированных ВИЧ, людей, у которых иначе нельзя было бы распознавать инфицирование *M. tuberculosis* из-за отсутствия чувствительности у существующих тестов.

Результат достигается за счет использования смеси антигенов *M. tuberculosis* ESAT6 и CFP10 для получения средства для кожного теста, состоящего из смеси, содержащей эти антигены. В предпочтительном варианте осуществления используют смесь антигенов rdESAT-6 и rCFP-10. Смесь антигенов C-Tb является весьма функциональной при ВИЧ-инфекции, демонстрируя в целом снижение чувствительности лишь на 33% по сравнению с 45% для Quantiferon. В отличие от других методов тестирования, на C-Tb, по-видимому, влияет только ВИЧ-инфекция в наиболее тяжелых случаях с количеством CD4+ Т-клеток <100 CD4+ Т-клеток/мкл.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

В настоящем изобретении раскрыта композиция, содержащая антигены *Mycobacterium tuberculosis* для применения при определении *in vivo* наличия инфекции *Mtb* у иммунокомпрометированных людей или людей, коинфицированных ВИЧ, при этом средство содержит смесь двух антигенов ESAT6 и CFP-10.

В настоящем изобретении раскрыто применение антигенов *Mycobacterium tuberculosis* для получения диагностического средства для кожного тестирования (средства для кожных тестов) для надежной оценки наличия инфекции *Mtb* у человека, при этом индивидом является иммунокомпрометированный человек или человек, коинфицированный ВИЧ.

В настоящем изобретении также раскрыт способ диагностики *Mtb* инфекции у иммунокомпрометированных людей или у людей, коинфицированных ВИЧ. Диагностический способ основан на измерении интенсивности реакции в коже, генерируемой в ответ на стимуляцию специфических иммунных клеток специфическими антигенами *Mtb*.

Два антигена предпочтительно клонируют, ферментируют и очищают в подходящем организме, например, из *Lactococcus lactis*, rESAT6 и rCFP10, и наиболее предпочтительно двойные ESAT-6 (rdESAT-6, две молекулы ESAT-6, слитые вместе). rdESAT-6 и rCFP10 предпочтительно смешивают в соотношении 1:1 (м/м). Композиция содержит два антигена, смешанных в наполнителе, причем наиболее предпочтительным наполнителем является фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) с 0,01% полисорбатом 20 и 0,5% фенолом.

Определения.

Термин "туберкулез" относится к клиническому состоянию заболевания туберкулезом, вызванному различными штаммами микобактерий, обычно *Mycobacterium tuberculosis*.

Термин "латентная инфекция *M. tuberculosis*" относится к субклинической или латентной инфекции *M. tuberculosis*, которая определяется наличием иммунного ответа на *M. tuberculosis* без признаков или симптомов активного заболевания.

Термин "ESAT-6" в настоящем изобретении относится к ранней секреторной антигенной мишени 6 кДа, вырабатываемой *Mycobacterium tuberculosis* (esxA), и представляет собой секреторный белок и мощный антиген для Т-клеток, locus tag Rv3875.

Термины "CFP10" в настоящем изобретении относится к секретируемому антигену 10 кДа из *Mycobacterium tuberculosis*, также известному как ESAT-6-подобный белок esxB, или секретируемому антигенному белку MTSA-10, или антигену культурального фильтрата 10 кДа, Rv3874.

Термины "коктейль" и "антигенный коктейль" в настоящем изобретении относится по меньшей мере к двум белкам вместе в наполнителе или растворе.

Термин "иммунодефицит" или "иммуносупрессия" или "иммунокомпрометированный" относится к состоянию, в котором способность иммунной системы бороться с инфекционным заболеванием или формировать иммунный ответ скомпрометирована или полностью отсутствует.

Термин "С-Тб" относится к препарату композиции rdESAT-6 и rCFP-10.

Термин "ВИЧ" относится к лентивирусу иммунодефицита человека, вызывающему ВИЧ-инфекцию и со временем может привести к синдрому приобретенного иммунодефицита (СПИД).

Под термином "слитый белок" понимают случайный порядок двух или более иммуногенных полипептидов из *M. tuberculosis* или их аналогов, слитых вместе с аминокислотным линкером/спейсером (аминокислотными линкерами/спейсерами) или без аминокислотного линкера/спейсера (аминокислотных линкеров/спейсеров) произвольной длины и последовательности. Чтобы избежать агрегации белка в дальнейшей продукции, все цистеины в слитом белке можно заменить любой аминокислотой, но предпочтительным заместителем является серии из-за его высокого структурного сходства с цистеином.

Неожиданно улучшенная диагностическая чувствительность у ВИЧ-инфицированных, вероятно, достигается посредством суммы механизмов. Реагент для кожного теста С-Тб состоит из смеси антигенов, по сравнению, например, с диаксинтестом, который представляет собой гибридную конструкцию, содержащую два белка, соединенных линкером. Конструкция смеси С-Тб предлагает несколько потенциальных преимуществ, включая лучшее воздействие эпитопов без вмешательства линкерных белков. Кроме того, формат кожного теста дает преимущества перед форматом IGRA. Длительный период инкубации позволяет рекрутировать ту же популяцию эффекторных Т-клеток, которую отслеживают при IGRA, но также и рекрутировать популяцию менее дифференцированных клеток. Более широкий рекрутинг Т-клеток в сочетании с форматом смеси для кожного теста, вероятно, позволил добиться превосходной чувствительности.

Диагностическое средство для кожного теста содержит два антигена ESAT6 и CFP10. В предпочтительном варианте осуществления кожного теста реагент состоит из смеси рекомбинантных версий двух антигенов. В наиболее предпочтительном варианте осуществления два антигена представляют собой двойной ESAT-6 (rdESAT-6; две молекулы ESAT-6, слитые вместе) и rCFP-10. Два антигена клонируют, ферментируют и очищают в подходящем организме, например, из *Lactococcus lactis* или *E. coli*. Антигены смешивают в наполнителе или фармацевтически приемлемом носителе. В наиболее предпочтительном варианте осуществления rdESAT-6 и CFP10 смешивают в соотношении 1:1 (м/м) в наполнителе фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) с 0,01% полисорбатом 20® (и 0,5% фенолом). Величина дозы антигена находится в диапазоне, составляющем 0,25-2,0 мкг/мл каждого антигена. Предпочтительное количество составляет 0,1 мкг/0,1 мл, соответствующее общей концентрации, составляющей 1 мкг антигенов/мл, соответствующей 0,5 мкг/мл каждого. Этот специфический препарат rdESAT-6 и rCFP-10 называют С-Тб. Реагент не ограничивается только этими антигенами, но может дополнительно включать в себя другие антигены, такие как Rv3615.

Проведение кожного теста.

Кожное тестирование проводят путем инъекции небольшого объема С-Тб внутрикожно, например 0,1 мл, во внутреннюю поверхность предплечья.

Инъекцию следует делать с помощью туберкулинового шприца, при этом иглу направляют срезом вверх. Однако также можно использовать другие средства внутрикожной инъекции. В правильной области инъекция С-Тб должна вызывать бледное возвышение кожи (папулу) от 6 до 10 мм в диаметре.

Реакцию кожного теста следует читать между 48 и 72 ч после введения. Пациенту, который не приходит повторно в течение 72 ч, необходимо перенести дату для другого кожного теста.

Величину реакции кожи можно определить путем измерения уплотнения в миллиметрах (диаметр пальпируемой, возвышающейся области уплотнения или набухания). Диаметр уплотненной области следует измерять поперек предплечья (перпендикулярно длинной оси предплечья).

Уплотнение 5 мм или более, согласно иллюстративному материалу, является предпочтительным порогом, не противореча тому, что можно использовать другой порог, включая 10, 4, 3, 2, 1 или даже любую реакцию выше 0 мм.

Концепция С-Tb заключается в комбинировании хорошо известной методики Манту, использующей специфические антигены из IGRA, со специфическим кожным тестом с использованием единого универсального порога, составляющего 5 мм уплотнение, независимо от вакцинации БЦЖ и ВИЧ-статуса, считываемым через 2-3 дня для выявления людей, зараженных Mtb, доставленный и интерпретируемый медицинским или медсестринским персоналом в месте оказания медицинской помощи.

Диагностика.

Тестирование кожи специфическим реагентом особенно полезно для людей с иммуносупрессией. ВИЧ представляет собой ключевую популяцию риска, при которой инфекция Mtb может быстро прогрессировать до активного заболевания. ВИЧ-инфицированные индивиды имеют скомпрометированную функцию CD4 Т-клеток, поэтому может оказаться превосходным кожное тестирование со специфическими для реагента мишенями, Т-клетками Th1, а не Th2 или регуляторными Т-клетками.

Целевая популяция для С-Tb включает людей, контактирующих с Mtb, или людей, демонстрирующих признаки или симптомы ТВ, с особым вниманием к группам с повышенным риском развития ТВ после инфицирования. Эти группы включают, без ограничения, свежее инфицированные случаи, выявленные при отслеживании контактов, детей до 5 лет и ВИЧ-инфицированных.

В настоящем изобретении предоставлен реагент для кожного теста для надежной оценки наличия инфекции Mtb у людей, инфицированных ВИЧ. Как ясно показано в приведенных примерах, пример специфического кожного теста (С-Tb) имеет превосходную результативность как для PPD TST, так и для IGRA.

rdESAT-6 и CFP10 смешивают в соотношении 1:1 (м/м) в наполнителе, хотя в предпочтительном варианте осуществления соотношением являются иные чем 1:1 м/м соотношения, включая 1:5, 1:4, 1:3, 1:2; 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, и полезными ожидаются другие соотношения, охватывающие 1:20 и 20:1.

Величина дозы антигена находится в диапазоне, составляющей 0,25-20,0 мкг/мл каждого антигена. Предпочтительное количество составляет 0,1 мкг/0,1 мл, соответствующее общей концентрации 1 мкг антигенов/мл, соответствующей 0,5 мкг/мл каждого. Ожидается, что большее количество антигена приведет к более сильной реакции уплотнения кожи, но увеличивает риск неблагоприятных или чрезмерно сильных реакций. В зависимости от клинической ситуации, генетического или этнического состава, степени иммуносупрессии или других характеристик тестируемой популяции дозу антигена можно выбирать в диапазоне 0,25-20,0 0,25-20,0 мкг/мл каждого антигена.

Хотя в настоящем изобретении описан специфический препарат rdESAT-6 и rCFP-10, средство не ограничено только этими антигенами, но может дополнительно включать в себя другие антигены, такие как espC (Rv3615) или другие специфические антигены, экспрессируемые *M. tuberculosis*. Некоторые антигены, которые, как известно, специфически экспрессируются возбудителями инфекции в комплексе *M. tuberculosis*, могут быть подходящим дополнением или заменой ESAT-6 и CFP10 в С-Tb. Эти антигены включают RD1-рестриктированные антигены, RD1-ассоциированные антигены и антигены с иммунодиагностическим потенциалом, такие как Rv2564, Rv3865, Rv3877, Rv2348, Rv3614, Rv3616 и другие, известные специалистам.

В предпочтительном варианте осуществления теста С-Tb предложена внутрикожная инъекция. Следует понимать, что инъекция с использованием шприца и иглы является лишь одним из нескольких способов введения. Альтернативные способы предусматривают пистолет Гиффа (Стернидл) и различные другие методы, такие как, без ограничения, струевая инъекция, доставка пульками с использованием частиц порошка и золота (т. е. генная пушка), твердые микроигольные пластыри (металлические или растворяющиеся микроиглы), топическое добавление С-Tb после предварительного лечения посредством микроигл, пистолеты для нанесения татуировок или методики, предназначенные для повышения проницаемости кожи в комбинации с пластырем для доставки, например абразия, ультразвук, электропорация, лазерпорация, химические энхансеры и термическая абляция кожи.

Описание фигур

Фиг. 1 - частота положительных тестов С-Tb (черный; порог 5 мм) и QFT (белый; порог 0,35 МЕ/мл) среди 534 ВИЧ-отрицательных и 277 ВИЧ-положительных с подозрением на ТВ. Величина ошибки показывает 95% CI.

Фиг. 2 - частота положительных тестов С-Tb (черный) и QFT (белый), стратифицированных в соответствии с количеством CD4 среди 292 с подозрением на ТВ. Величина ошибки показывает 95% CI.

Примеры

Диагностическое средство С-Tb получали посредством клонирования, ферментации и очистки рекомбинантных версий двух антигенов rdESAT-6 и rCFP-10 из *Lactococcus lactis*. Антигены смешивали в эквимоллярных количествах ESAT-6 и CFP-10, соответствующих соотношению 1:1 м/м rdESAT-6 и rCFP-10 в наполнителе фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с 0,01% полисорбате 20® (и 0,5% феноле).

Диагностическую эффективность С-Tb, PPD и an IGRA, называемого QuantiFERON®-TB Gold In Tube (QFT), сравнивали на III стадии испытаний у младенцев и детей в возрасте до 5 лет с подозрением на инфекцию Mtb, и у детей старшего возраста и взрослых с подозрением на заболевание ТВ. Испытание 1190 участников включало 299 ВИЧ-положительных и 730 ВИЧ-отрицательных. Кровь для тестирования

QFT собирали перед кожным тестом. С-Тб и PPD инъецировали двойным слепым методом в разные группы с рандомизированным дизайном с разделением участников. Были включены доступные результаты добровольцев с парными результатами.

Как видно из фиг. 1, С-Тб и QFT показали одинаковый показатель положительных результатов среди ВИЧ-отрицательных, 292/534 (54,7%) были положительными с С-Тб и 285/534 (53,4%) были положительными с QFT. Всего в обоих тестах было протестировано 277 ВИЧ-инфицированных. Неожиданно С-Тб обнаружил значительно больше инфицированных *Mtb*, чем тест QFT, 102/277 (36,8%) имели положительные тесты с С-Тб и только 80/277 (28,9%) имели положительные тесты с QFT (таблица, McNemar; $P=0,009$).

		QFT		S
		+	-	
С-Тб	ВИЧ-полож.			
	+	59	43	102
	-	21	154	175
		S80	197	277
P= 0,009				

При стратификации остальных результатов с помощью подсчета CD4 Т-клеток (фиг. 2) становится очевидно, что более высокая чувствительность к С-Тб обусловлена значительно повышенной устойчивостью не только в низких стратах CD4 Т-клеток, но и во всем спектре подсчетов CD4 Т-клеток.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей смесь двух антигенов *Mtb* ESAT6 и CFP-10, для диагностики *in vivo* кожным тестом наличия латентной инфекции *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) у иммунокомпрометированных людей или людей, коинфицированных ВИЧ.

2. Применение по п.1, где два указанных антигена клонированы, получены и очищены в подходящем организме, например, из *Lactococcus lactis*.

3. Применение по любому из предшествующих пунктов, где композиция состоит из смеси двух антигенов рекомбинантного двойного ESAT6 и рекомбинантного CFP-10.

4. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, где указанные антигены смешаны в наполнителе.

5. Применение по п.4, где рекомбинантный двойной ESAT6 и рекомбинантный CFP10 смешаны в соотношении 1:1 (м/м).

6. Применение по п.4, где рекомбинантный двойной ESAT6 и рекомбинантный CFP10 смешаны в соотношениях между 1:20 (м/м) и 20:1 (м/м).

7. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, где количество указанных антигенов составляет между 0,25 и 2,0 мкг/мл каждого антигена.

8. Применение по любому одному из пп.4-7, где наполнитель содержит фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) с 0,01% полисорбата 20 и 0,5% фенола.

9. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, где диагностика основана на измерении интенсивности реакции в коже, генерируемой в ответ на стимуляцию иммунных клеток указанной композицией, введенной с помощью внутрикожной инъекции.

10. Применение по п.9, где интенсивность реакции измеряют между 48 и 72 ч после введения указанной композиции.

11. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, где композиция содержит один или более дополнительных антигенов *Mycobacterium tuberculosis*.

12. Применение по п.10, где дополнительные антигены выбраны из группы, состоящей из RD1-рестриктированных антигенов, RD1-ассоциированных антигенов и Rv2564, Rv3865, Rv3877, Rv2348, Rv3614, Rv3615 и Rv3616.

13. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, причем субъектом является ребенок.

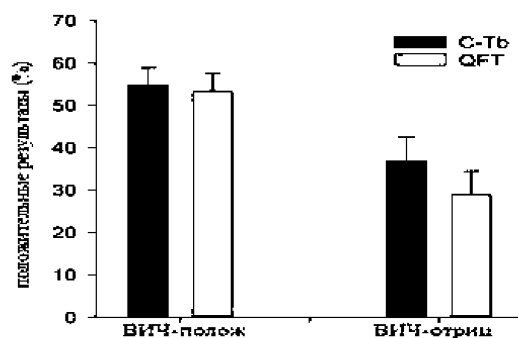
14. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, причем субъектом является взрослый.

15. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, причем у субъекта подозревают наличие инфекции *Mtb*.

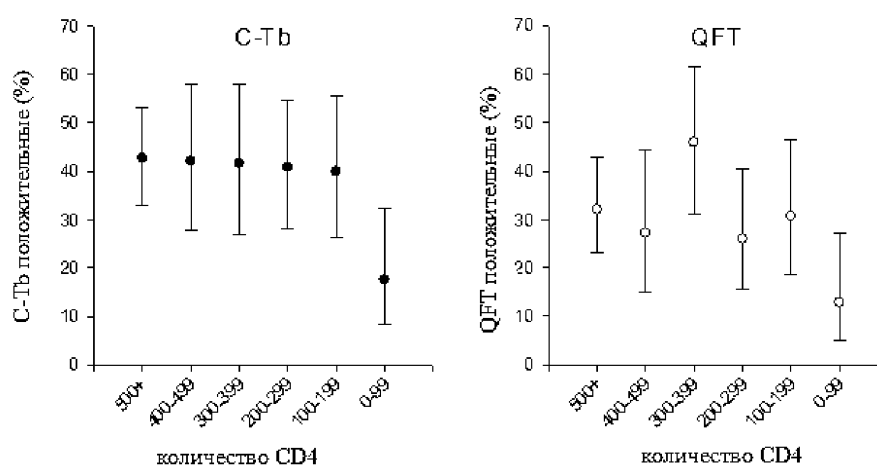
16. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, причем у субъекта подозревают наличие заболевания ТБ.

17. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, причем субъект не имеет признаков и/или симптомов активного заболевания ТБ.

18. Применение по любому одному из предшествующих пунктов, причем у субъекта диагностировано наличие латентной инфекции Mtb, если уплотнения после введения указанной композиции больше заранее определенного порога.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2