

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041657**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.18

(21) Номер заявки
201991076

(22) Дата подачи заявки
2017.10.30

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

**(54) ДЕАЦЕТИЛИРОВАННЫЙ ЛИПООЛИГОСАХАРИД, ИМЕЮЩИЙ
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ, И СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО
КОМПОЗИЦИЯ**

(31) 10-2016-0142703; 10-2017-0079762

(32) 2016.10.31; 2017.06.23

(33) KR

(43) 2019.10.31

(86) PCT/KR2017/012050

(87) WO 2018/080252 2018.05.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЙДЖИН ИНК. (KR)

(72) Изобретатель:
**Чо Ёан Чи, Ким Квансон, Ли На Кён,
Пак Син Э (KR)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) KR-A-1020120013260

KR-A-1020060117387

KR-A-1020030090897

BELLO G. et al.: "The Influence of Rough Lipopolysaccharide Structure on Molecular Interactions with Mammalian Antimicrobial Peptides", Biochimica et Biophysica Acta, 2016 (17 November 2015_Published online), vol. 1858, pages 197-209, See the entire document.

CLIFTON L. A. et al.: "Asymmetric Phospholipid: Lipopolysaccharide Bilayers; a Gram-negative Bacterial Outer Membrane Mimic", journal of the Royal Society Interface, 2013, vol. 10, no. 89, inner pages 1-11, See the entire document.

(57) Изобретение касается иммуномодулятора, содержащего деацетилованный липоолигосахарид с новой структурой. Также изобретение относится к иммуноадъювантной композиции и вакцинной композиции, которые его содержат. Иммуномодулятор по настоящему изобретению проявляет эффекты усиления иммунитета с отличным врожденным иммунитетом и способностью вызывать адаптивный иммунитет к определенным патогенам, а также очень безопасен вследствие низкой токсичности. Кроме того, вакцины, содержащие иммуномодулятор по настоящему изобретению, содержат и иммуномодулятор, и квасцы, поэтому они дают лучшие эффекты усиления иммунитета по сравнению с использованием только иммуномодулятора.

B1

041657

041657 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается иммуномодулятора, имеющего новую структуру, и содержащих его вакцинных композиций. В частности, настоящее изобретение касается иммуномодулятора, имеющего новую структуру, а именно аналога липополисахарида (LPS) с пониженной токсичностью, и его применения.

Уровень техники

Липополисахарид (LPS) является главным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий и стимулирует самые разные иммунные клетки, в особенности системы врожденного иммунитета. LPS активирует антигенпрезентирующие клетки посредством секреции цитокинов, экспрессии костимулирующих молекул и индукции презентации антигенов, а также связывает врожденный иммунитет с адаптивным иммунитетом (Akira S., Uematsu S., Takeuchi O., Cell 124: 783-801 (2006); Schnare M., Barton GM, Holt AC, Takeda K., Akira S. et al., Nat. Immunol. 2: 947-950 (2001)).

LPS состоит из трех доменов, а именно амфифильного домена (липида A), центрального олигосахарида (OS) и О-антигена (или О-антигенного полисахарида). Известно, что липид A играет роль в эндотоксиновой активности LPS и проявляет иммуностимулирующие эффекты посредством передачи сигналов через TLR4 (Toll-like рецептор-4) у различных типов иммунных клеток (Raetz CR, Whitfield C., Annu Rev Biochem. 71: 635-700 (2002)). Производные липида A, которые проявляют пониженную токсичность, были мишенью для разработки иммуoadъювантов для человеческих вакцин. Монофосфориллипид A (MPL) - нетоксичное производное LPS, выделенное из неочищенного штамма *Salmonella minnesota*. Кроме того, комбинации солей алюминия с MPL были одобрены в качестве иммуoadъювантов для вакцин против HBV (вируса гепатита В) и HPV (вируса папилломы человека).

Еще с 1950-х гг. было известно, что LPS обладает противораковым действием, но он не подходит для применения из-за токсичности, способной вызвать смерть от сепсиса даже при загрязнении на уровне наногрмм (нг). Поэтому постоянно проводились исследования, направленные на снижение токсичности LPS, и токсичность LPS удалось уменьшить, в частности, путем удаления полисахаридных цепей или деацилирования липида A (Katz SS et al., J Biol Chem. Dec 17, 274 (51): 36579-84, 1999). В частности, был разработан MPL, полученный путем фосфорилирования липида A, полученного путем удаления полисахаридной цепи LPS, в качестве иммунного противоракового средства, лишенного токсичности LPS, но известно, что его эффекты недостаточны.

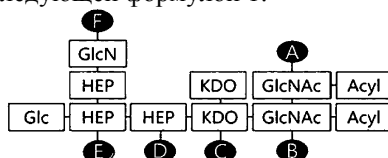
Заявитель настоящего изобретения уже разработал новый аналог LPS, который преодолевает недостатки вышеупомянутых иммуoadъювантов (Korean Patent No. 10-1509456). В настоящем описании приводятся и цитируются многие статьи и патентные документы. Содержание приведенных статей и патентных документов включено сюда путем ссылки во всей полноте, чтобы более четко описать уровень техники, к которой относится настоящее изобретение, и содержание настоящего изобретения.

В результате усилий по разработке аналогов LPS, способных проявлять отличную иммуностимулирующую активность при одновременном снижении токсичности, которая вызывала проблемы при использовании обычного LPS, авторы настоящего изобретения идентифицировали EG-иммуномодулятор (EG-IM) с новой структурой и пониженной токсичностью путем выделения и очистки LOS, не содержащего О-антигенного сайта, из штамма *E. coli*, встречающегося в кишечнике человека, и его деацилирования, и установили, что EG-IM может применяться в качестве иммуoadъюванта вследствие его отличной иммуностимулирующей активности. Авторы настоящего изобретения совершили настоящее изобретение на основании того, что вакцинные композиции, содержащие иммуномодулятор и соль алюминия, то есть квасцы, проявляют превосходную иммуностимулирующую активность по сравнению с тем, когда иммуномодулятор либо соль алюминия используются по отдельности.

Сущность изобретения

Техническая проблема

Итак, одной из целей настоящего изобретения является получение иммуномодулятора содержащего соединение, представленное следующей формулой 1:



Формула 1

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а А-В - положения, с которыми может связываться фосфат.

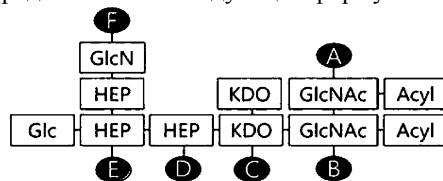
Еще одной целью настоящего изобретения было обеспечить иммуoadъювантную композицию, содержащую указанный выше иммуномодулятор в качестве активного ингредиента.

Другой целью настоящего изобретения является получение вакцинных композиций, содержащих (а) антиген; (б) иммуномодулятор, представленный формулой 1; и (с) квасцы.

Техническое решение

Для достижения вышеуказанных целей настоящим изобретением предусмотрен иммуномодулятор,

содержащий соединение, представленное следующей формулой 1



Формула 1

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат.

Настоящим изобретением также предусмотрены иммуноадьювантные композиции, содержащие иммуномодулятор в качестве активного ингредиента.

Настоящим изобретением также предусмотрены вакцинные композиции, содержащие (а) антиген; (b) иммуномодулятор, представленный выше; и (с) квасцы.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A представлены результаты по идентификации экстрагированного LOS методом электрофореза и окрашивания серебром, а на фиг. 1B представлен результат, показывающий, что размер EG-IM на основе LOS, экстрагированного при удалении О-ацильной цепи липида А, уменьшается при обработке LOS щелочью, где М означает маркер, дорожка 1 - LOS, экстрагированный перед деацилизацией, а дорожка 2 - иммуномодулятор (EG-IM).

На фиг. 2 представлена структура EG-иммуномодулятора (EG-IM) по настоящему изобретению, где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат.

На фиг. 3-5 представлены результаты анализа уровней цитокинов в сыворотке. Через 1 и 4 ч после введения 3 мкг иммуномодулятора (EG-IM) или MPL проводили анализ сердечной крови, полученной у мышей (n=3). На фиг. 3 представлены результаты анализа IL-6, IL-12p40 и TNF- α , на фиг. 4 - результаты анализа IL-5 и IL-10, а на фиг. 5 - результаты анализа MCP-1 и RANTES.

На фиг. 6 представлены результаты измерения титров антител, специфичных к антигену вируса японского энцефалита (JEV), при использовании комбинации EG-IM/ квасцы.

На фиг. 7 представлены результаты измерения уровней секреции цитокинов IFN- γ и IL-5 при введении вакцины против японского энцефалита.

На фиг. 8 представлены результаты измерения титров антител, специфичных к антигену Haemophilus influenzae типа b (HIB), при использовании комбинации EG-IM/ квасцы.

На фиг. 9 представлены результаты измерения титров антител, специфичных к антигену S1 шипов коронавируса MERS (MERS-CoV), при использовании комбинации EG-IM/квасцы. На фиг. 9A представлены титры специфичных к антигену вируса MERS антител типа IgG1 в сыворотке, а на фиг. 9B - титры специфичных к антигену вируса MERS антител типа IgG2a в сыворотке.

На фиг. 10 представлены уровни секреции цитокинов IFN- γ , IL-4 и IL-5, измеренные при стимуляции белком S1 шипов вируса MERS, при введении вакцины против MERS с рекомбинантным белком S1 шипов MERS-CoV.

На фиг. 11 представлены результаты измерения уровня секреции цитокина IFN- γ при введении вакцины против MERS с рекомбинантным белком RBD шипов MERS-CoV.

На фиг. 12 представлены результаты измерения титров антител, специфичных к антигену вируса Зика, при использовании комбинации EG-IM/квасцы.

На фиг. 13 представлены результаты измерения уровней секреции цитокинов IFN- γ и IL-5 при введении вакцины против Зика.

На фиг. 14 и 15 представлены результаты измерения титров антител, специфичных к антигенам P. aeruginosa, при использовании комбинации EG-IM/квасцы. На фиг. 14 представлена иммунизация с помощью антигена FT2 P. aeruginosa, а на фиг. 15 - иммунизация с помощью антигена FT1 P. aeruginosa.

На фиг. 16 представлены результаты определения опсонофагоцитической активности сыворотки мышей против P. aeruginosa при использовании комбинации EG-IM/квасцы. На фиг. 16A представлена активность по стимуляции фагоцитоза, на фиг. 16B представлена активность по стимуляции фагоцитоза в зависимости от концентрации сыворотки, а на фиг. 16C представлены результаты по сравнению активности по стимуляции фагоцитоза в отсутствие комплемента и в присутствии комплемента.

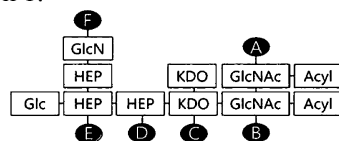
Раскрытие сущности изобретения

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такие же значения, которые известны специалистам в той области, к которой относится настоящее изобретение. В общем, используемая здесь номенклатура и описанные ниже способы проведения экспериментов хорошо известны в данной области, обычно они и применяются.

В одном воплощении настоящего изобретения EG-иммуномодулятор (EG-IM) получали путем приготовления высушенных бактериальных клеток E. coli и экстракции LOS, а затем устранения токсичности LOS путем обработки щелочью, причем MS-анализ показал, что иммуномодулятор (EG-IM) имеет

структуру по формуле 1.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение направлено на иммуномодулятор, представленный следующей формулой 1:



Формула 1

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат.

В настоящем изобретении термин "LOS (липоолигосахарид)" относится к вариантам LPS (липополисахарида) с более короткой сахаридной цепочкой, чем у природного LPS, поэтому они имеют меньшую молекулярную массу. Перед деацилированием LOS предпочтительно имеет молекулярную массу от 3000 до 10000 Да, более предпочтительно от 3000 до 4000 Да. Термин "деацилированный LOS" означает такой LOS, у которого удалена жирная кислота, соединенная с глюкозамином липида A через связь -C(O)O-, и сильно снижена токсичность по сравнению с LOS. Жирная кислота соединяется с глюкозамином липида A через связи -C(O)O- и -C(O)NH-. Деацилированный LOS настоящего изобретения представляет собой LOS, у которого жирная кислота, соединенная связью -C(O)O-, удалена посредством деацилирования липида A.

EG-IM может быть получен различными способами, но может быть получен в соответствии со способами, раскрытыми в предшествующих патентах авторов настоящего изобретения, а именно Korean Patent No. 0456681; WO 2004/039413; Korean Patent № 0740237 и WO 2006/121232. К примеру, LPS деацилируют путем обработки сильным основанием (например, 0,2N NaOH), чтобы удалить некоторые жирные кислоты из липида A и тем самым его детоксифицировать.

Согласно настоящему изобретению EG-IM может быть связан с 2-6 фосфатными группами, предпочтительно с 3-4 фосфатными группами, без ограничения. Кроме того, количество и положения фосфатных групп в формуле 1 могут быть такими, как приведенные ниже в табл. 1.

Таблица 1

Пример	Количество фосфатных групп	Положения фосфатных групп	Пример	Количество фосфатных групп	Положения фосфатных групп
Пример 1	2	A, B	Пример 25	3	A, E, F
Пример 2	2	A, C	Пример 26	3	B, C, D
Пример 3	2	A, D	Пример 27	3	B, C, E
Пример 4	2	A, E	Пример 28	3	B, C, F
Пример 5	2	A, F	Пример 29	3	B, D, E
Пример 6	2	B, C	Пример 30	4	B, D, F
Пример 7	2	B, D	Пример 31	3	B, E, F
Пример 8	2	B, E	Пример 32	3	C, D, E
Пример 9	2	B, F	Пример 33	3	C, D, F
Пример 10	2	C, D	Пример 34	3	C, E, F
Пример 11	2	C, E	Пример 35	3	D, E, F
Пример 12	2	C, F	Пример 36	4	A, B, C, D
Пример 13	2	D, E	Пример 37	4	A, B, C, E
Пример 14	2	D, F	Пример 38	4	A, B, C, F
Пример 15	2	E, F	Пример 39	4	A, B, D, E
Пример 16	3	A, B, C	Пример 40	4	A, B, D, F
Пример 17	3	A, B, D	Пример 41	4	A, B, E, F
Пример 18	3	A, B, E	Пример 42	4	A, C, D, E
Пример 19	3	A, B, F	Пример 43	4	A, C, D, F
Пример 20	3	A, C, D	Пример 44	4	A, D, E, F
Пример 21	3	A, C, E	Пример 45	5	A, B, C, D, E
Пример 22	3	A, C, F	Пример 46	5	A, B, C, D, F
Пример 23	3	A, D, E	Пример 47	6	A, B, C, D, E, F
Пример 24	3	A, D, F			

Фосфат связывается в положениях, выбранных из группы, состоящей из AB, AC, AD, AE, AF, BC, BD, BE, BF, CD, CE, CF, DE, DF, EF, ABC, ABD, ABE, ABF, ACD, ACE, ACF, ADE, ADF, AEF, BCD, BCE, BCF, BDE, BDF, BEF, CDE, CDF, CEF, DEF, ABCD, ABCE, ABCF, ABDE, ABDF, ABFE, ACDE, ACDF, ADEF, BCDE, BCDF, BCEF, BDEF, CDEF, ABCDE, ABCEF и ABCDEF в формуле 1.

Согласно настоящему изобретению сахараиды в формуле 1 выбирают из группы, состоящей из гексозы, гексозамина, N-ацетилгексозамина, гептозы и Kdo (2-кето-3-дезоксиктоната).

В настоящем изобретении термин "гексоза" означает моносахарид, содержащий 6 атомов углерода в молекуле, а их примеры включают, без ограничения, кетогексозы (психоза, фруктоза, сорбоза, тагатаза), альдогексозы (аллоза, альтроза, глюкоза, манноза, гулоза, идоза, галактоза, талоза) и дезоксигексозы (фукоза, фукулоза, рамноза).

Согласно настоящему изобретению гексоза представлена альдогексозой, а в определенных примерах альдогексоза представлена глюкозой или галактозой.

В настоящем изобретении термин "гептоза" означает моносахарид, содержащий 7 атомов углерода в молекуле, которые подразделяются на альдогептозы (положение 1) и кетогептозы (положение 2) в соответствии с положением функциональных групп (альдегидных и кетогрупп). Примером альдогептозы является L-глицеро-D-манногептоза, без ограничения. Примером кетогептозы является седогептулоза и манногептулоза, без ограничения.

Согласно настоящему изобретению гексозамин представляет собой глюкозамин, галактозамин или маннозамин, а в определенных примерах гексозамин представляет собой глюкозамин.

Согласно настоящему изобретению N-ацетилгексозамин представляет собой N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин или N-ацетилманнозамин, а в определенных примерах N-ацетилгексозамин представляет собой N-ацетилглюкозамин.

EG-IM по настоящему изобретению содержит меньше сахаридов, чем LPS дикого типа. Согласно одному воплощению настоящего изобретения EG-IM может содержать от 5 до 7 сахаридов. В определенных примерах EG-IM содержит 6 или 7 Сахаров, без ограничения.

EG-IM по настоящему изобретению не содержит O-связанных жирных кислот.

EG-IM по настоящему изобретению отличается тем, что он обладает значительно меньшей токсичностью, так как из липида А удалена (деацилирована) жирная кислота (к примеру, жирная кислота C14). Жирная кислота соединяется с глюкозамином в липиде А через связь -C(O)O- или -C(O)NH-. В настоящем изобретении деацилирование означает удаление жирной кислоты, соединенной через связь -C(O)O-.

Деацилирование может осуществляться путем обработки LOS щелочью, а щелочи включают NaOH, KOH, Ba(OH)₂, CsOH, Sr(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH, RbOH и Mg(OH)₂, более предпочтительно NaOH, KOH, Ba(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH и Mg(OH)₂, еще более предпочтительно NaOH, KOH и Mg(OH)₂, наиболее предпочтительно NaOH.

EG-IM по настоящему изобретению происходит из *E. coli*, а *E. coli* представляет собой *Escherichia coli* EG0024 (номер доступа: KCTC 12948BP). Этот штамм был депонирован 19 ноября 2015 г. с депозитным номером KCTC 12948BP в Корейской коллекции типовых культур Корейского научно-исследовательского института биологии и биотехнологии.

Согласно настоящему изобретению EG-IM проявляет иммуностимулирующую активность.

В настоящем изобретении термин "иммуностимуляция" относится к индукции первоначального иммунного ответа или усилению обычного иммунного ответа на антиген в измеримой степени.

В другом воплощении настоящего изобретения EG-IM вводится мышам для анализа уровня цитокинов в сыворотке мышей. В результате оказалось, что EG-IM вызывает секрецию цитокинов типа TNF- α , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1 и RANTES.

Итак, в другом аспекте настоящее изобретение направлено на иммуноадьювантные композиции, содержащие EG-IM в качестве активного ингредиента.

EG-IM по настоящему изобретению особенно подходит для вакцинных композиций настоящего изобретения, так как он проявляет отличные иммуностимулирующие эффекты и меньшую токсичность по сравнению с обычными иммуноадьювантами. EG-IM по настоящему изобретению менее токсичен, чем MPL (монофосфорилипид А), полученный путем фосфорилирования липида А, полученного при удалении полисахаридной цепочки из LPS для устранения токсичности LPS.

Иммуноадьювантные композиции настоящего изобретения могут вызывать достаточный иммунный ответ даже при одном EG-IM и тем самым оказывать профилактическое действие против различных заболеваний. В частности, иммуноадьювантные композиции могут применяться для лечения рака или иммунных заболеваний.

Согласно настоящему изобретению рак может представлять собой фибросаркому, рак мочевого пузыря, аденому гипофиза, глиому, опухоль головного мозга, рак носоглотки, рак гортани, тимому, мезотелиому, рак молочной железы, рак легких, рак желудка, рак пищевода, рак толстой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, эндокринную опухоль поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак полового члена, рак мочеточников, почечно-клеточную карциному, рак простаты, неходжкинскую лимфому, миелодиспластический синдром, множественную миелому, плазмочитарные опухоли, лейкоз, детский рак, рак кожи, рак яичников или рак шейки матки, без ограничения.

Согласно настоящему изобретению иммунные заболевания могут представлять собой атопический дерматит, астму, псориаз, аллергический конъюнктивит, аллергический ринит, аллергическую гранулему, аллергический дерматит, желудочно-кишечные аллергии, гиперчувствительный пневмонит, пищевую гиперчувствительность, крапивницу, экзему, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, муковисцидоз, позднее или хроническое отторжение трансплантатов твердых органов, рассеянный склероз, системную красную волчанку, синдром Шёгрена, тиреоидит Хашимото, рассеянный миозит, склеродермию, болезнь Аддисона, витилиго, злокачественную анемию, гломерулонефрит, фиброз легких, воспалительную болезнь кишечника или болезнь Грейвса, без ограничения.

Кроме того, необязательно иммуноадьювантные композиции настоящего изобретения могут дополнительно содержать и другой иммуноадьювантный ингредиент, к примеру элемент II группы из числа Mg, Ca, Sr, Ba и Ra или его соль; элемент IV группы из числа Ti, Zr, Hf и Rf; соль алюминия или её гидрат; или же диметилдоктадециламмонийбромид. Соли образуются, к примеру, из оксида, пероксида, гид-

роксида, карбоната, фосфата, пирофосфата, гидрофосфата, дигидрофосфата, сульфата или силиката.

Согласно настоящему изобретению, иммуноаdjувантный ингредиент, который может дополнительно содержаться в иммуноаdjувантной композиции по настоящему изобретению, выбирают из группы, состоящей из гидроксида магния, карбоната магния, пентагидрата гидроксида, диоксида титана, фосфата кальция, карбоната кальция, оксида бария, гидроксида бария, пероксида бария, сульфата бария, сульфата кальция, пирофосфата кальция, карбоната магния, оксида магния, гидроксида алюминия, фосфата алюминия и гидратированного сульфата калия-алюминия.

Согласно настоящему изобретению иммуноаdjувантные композиции могут дополнительно содержать гидроксид алюминия или фосфат кальция.

В другом воплощении настоящего изобретения вакцины получают путем смешивания EG-IM и квасцов с антигеном вируса японского энцефалита (JEV), антигеном *Haemophilus influenzae* типа b (HIB), рекомбинантным белком S1 шипов MERS-CoV, рекомбинантным белком RBD шипов MERS-CoV, белком оболочки вируса Зика либо антигеном FT2 или антигеном FT1 *Pseudomonas aeruginosa*, а для установления эффекта усиления иммуногенности EG-IM и квасцов каждую вакцину вводят мышам, измеряют титры антител и анализируют цитокины. В результате оказалось, что каждая из вакцин эффективно вызывает отличный опосредованный антителами иммунитет и/или клеточный иммунитет.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на вакцинные композиции, содержащие: (a) антиген; (b) иммуномодулятор, представленный формулой 1; и (c) квасцы.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ профилактики иммунных заболеваний, включающий введение нуждающимся в лечении пациентам иммуномодулятора, представленного формулой 1, или на применение иммуномодулятора для предотвращения иммунных заболеваний.

В настоящем изобретении термин "антиген" относится к веществам, которые индуцируют иммунный ответ у получателя. Так, в настоящем изобретении можно использовать любые вещества, проявляющие такую активность индукции иммунного ответа, без ограничения.

Антиген по настоящему изобретению может представлять собой пептид, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид, патоген, аттенуированный патоген, инактивированный патоген, вирус, вирусоподобные частицы (VLP), клетки или фрагменты клеток.

В настоящем изобретении антиген выбирают из группы, состоящей из антигена вируса японского энцефалита, антигена *Haemophilus influenzae* типа b (HIB), антигена вируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS), антигена вируса Зика, антигена *Pseudomonas aeruginosa*, антигена коклюша, антигена *Mycobacterium tuberculosis*, антигена сибирской язвы, антигена вируса гепатита A (HAV), антигена вируса гепатита B (HBV), антигена вируса гепатита C (HCV), антигена вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), антигена вируса *Herpes simplex* (HSV), антигена *Neisseria meningitidis*, антигена *Corynebacterium diphtheriae*, антигена *Bordetella pertussis*, антигена *Clostridium tetani*, антигена вируса папилломы человека (HPV), антигена вируса ветряной оспы, антигена энтерококков, антигена *Staphylococcus aureus*, антигена *Klebsiella pneumoniae*, антигена *Acinetobacter baumannii*, антигена *Enterobacter*, антигена *Helicobacter pylori*, антигена малярии, антигена вируса денге, антигена *Orientia tsutsugamushi*, антигена бунья-вируса тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (SFTS), антигена коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), антигена вируса гриппа, антигена вируса Эбола и антигена *Diplococcus pneumoniae*.

Вакцинные композиции настоящего изобретения могут вызывать достаточные иммунные ответы и тем самым оказывать профилактическое действие против определенных заболеваний, даже при базовом составе композиций, то есть с антигеном и только с EG-иммуномодулятором (EG-IM). Необязательно, вакцинные композиции настоящего изобретения могут дополнительно содержать еще один иммуноаdjувантный ингредиент, описанный выше.

Кроме того, согласно настоящему изобретению вакцина может быть в виде инактивированной вакцины, аттенуированной вакцины, субъединичной вакцины, конъюгатной вакцины, рекомбинантной вакцины, конъюгированной с белком вакцины, моновалентной вакцины, поливалентной вакцины или смешанной вакцины.

Вакцина по настоящему изобретению может представлять собой вакцину против японского энцефалита, вакцину против *Haemophilus influenzae* типа b, вакцину против MERS, вакцину против Зика, вакцину против *Pseudomonas aeruginosa*, вакцину против рака, вакцину против туберкулеза, вакцину против сибирской язвы, вакцину против HAV, вакцину против HBV, вакцину против HCV, вакцину против ВИЧ, вакцину против *Herpes simplex*, менингококковую вакцину, вакцину против дифтерии, вакцину против коклюша, вакцину против столбняка, вакцину против ветряной оспы, вакцину против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, вакцину против энтерококков, вакцину против *Staphylococcus aureus*, вакцину против *Klebsiella pneumoniae*, вакцину против *Acinetobacter baumannii*, вакцину против *Enterobacter*, вакцину против *Helicobacter pylori*, вакцину против малярии, вакцину против вируса денге, вакцину против *Orientia tsutsugamushi*, вакцину против буньявируса тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (SFTS), вакцину против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), вакцину против вируса гриппа, вакцину против вируса Эбола или вакцину против *Diplococcus pneumoniae*, предпочтительно вакцину против японского энцефалита, вакцину против *Haemophi-*

lus influenzae типа b, вакцину против MERS, вакцину против Зика или вакцину против *Pseudomonas aeruginosa*.

Противораковая вакцина может быть выбрана из группы, состоящей из вакцин против фибросаркомы, рака мочевого пузыря, аденомы гипофиза, глиомы, опухолей головного мозга, рака носоглотки, рака гортани, тимомы, мезотелиомы, рака молочной железы, рака легких, рака желудка, рака пищевода, рака толстой кишки, рака печени, рака поджелудочной железы, эндокринных опухолей поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака полового члена, рака мочеточников, почечно-клеточной карциномы, рака простаты, неходжкинской лимфомы, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы, плазмодитарных опухолей, лейкоза, детского рака, рака кожи, рака яичников и рака шейки матки, без ограничения.

Вакцины по настоящему изобретению могут содержать от 1 до 10 мас.% иммуномодулятора от общей массы композиции. Если иммуномодулятор содержится в количестве менее 1% масс, то нельзя ожидать эффективного иммунного эффекта. Если иммуномодулятор содержится в количестве, превышающем 30 мас.%, то может возникнуть иммунотолерантность.

Вакцины по настоящему изобретению могут содержать от 70 до 99 мас.% квасцов от общей массы композиции. Если квасцы содержатся в количестве менее 70 мас.%, то нельзя ожидать эффективного иммунного эффекта.

Вакцинные композиции настоящего изобретения могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, а также ингредиенты, которые обычно применяются в качестве рецептурного вещества, типа лактозы, декстрозы, сахарозы, сорбита, маннита, крахмала, гуммиарабика, фосфата кальция, альгината, желатина, силиката кальция, микрокристаллической целлюлозы, поливинилпирролидона, целлюлозы, воды, сиропа, метилцеллюлозы, метилгидроксibenзоата, пропилгидроксibenзоата, талька, стеарата магния и минерального масла, без ограничения. Вакцинные композиции настоящего изобретения также могут содержать смазывающие, смачивающие вещества, подсластители, ароматизаторы, эмульгаторы, суспендирующие вещества, консерванты и т.п., в дополнение к ингредиентам, описанным выше. Подходящие фармацевтически приемлемые носители и рецептуры подробно описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995).

Вакцинные композиции настоящего изобретения можно вводить перорально или парентерально. В случае парентерального введения вакцинные композиции можно вводить внутривенно, подкожно, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно, трансдермально и т.п.

Подходящие дозировки вакцинных композиций настоящего изобретения можно назначать поразному на основе таких факторов, как способ составления, способ введения и возраст, вес тела, пол, патология, рацион, время введения, способ введения, скорость выведения и восприимчивость пациента.

Вакцинные композиции настоящего изобретения могут быть получены в виде однократной дозовой формы или же заключены во флаконы с множественными дозами при составлении лекарственной формы с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или эксципиента в соответствии со способом, который может легко выполняться рядовыми специалистами в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. В данное время лекарственные формы могут быть в виде растворов, суспензий или эмульсий в масляной или водной среде или же в виде экстракта, порошка, гранул, таблеток или капсул и могут дополнительно содержать диспергатор или стабилизатор.

Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно на следующих примерах. Однако специалистам в данной области должно быть ясно, что эти примеры приводятся только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Препаративный пример 1. Получение иммуномодулятора (EG-IM)

1. Получение высушенных клеток штамма

Культивировали *E. coli* со встряхиванием при 80 об/мин или меньше в 30 г/л среды TSB (триптический соевый бульон, Difco) при 37°C в течение 20 ч и собирали клетки с помощью центрифуги. Собранные клетки смешивали с этанолом и центрифугировали, получая осадок. Затем к полученному осадку добавляли ацетон, тщательно перемешивали, а затем центрифугировали, получая осадок. К полученному осадку добавляли этиловый эфир, тщательно перемешивали, а затем центрифугировали, получая осадок. Полученный осадок высушивали в сушильном шкафу при 60°C, получая высушенные бактериальные клетки.

2. Экстрагирование LOS

После измерения веса высушенных бактериальных клеток добавляли 7,5 мл экстрагирующего раствора PCP (фенол, хлороформ, петролейный эфир) на 1 г массы для выделения LOS из бактериальных клеток. Из полученного при этом экстракта LOS удаляли органический растворитель при высокой температуре на ротационном испарителе. Полученный экстракт центрифугировали при высокой температуре, получая осадок, который промывали этиловым эфиром. Затем туда же добавляли очищенную воду для образования осадка. Образовавшийся осадок центрифугировали и отделяли от супернатанта, а полученный при этом осадок промывали этанолом и собирали. Осадок тщательно высушивали в сушильной печи

при высокой температуре, а затем растворяли в очищенной воде для экстракции LOS.

3. Устранение токсичности LOS

После определения содержания экстракта LOS доводили концентрацию экстракта LOS до 3 мг/мл и смешивали экстракт LOS с 0,2N NaOH при объемном соотношении 1:1. Проводили реакцию в водяной бане с постоянной температурой при 60°C в течение 120 мин с перемешиванием на вибротомашке в течение 5 с каждые 10 мин. Затем туда же добавляли 1N уксусную кислоту в количестве примерно 1/5 от исходного количества 0,2N NaOH. Затем получали иммуномодулятор EG-IM путем осаждения этанолом.

4. Определение и идентификация LOS и EG-IM

Содержание LOS и EG-IM измеряли по анализу KDO (2-кето-3-диоксиоктонат) с помощью 2-тиобарбитуровой кислоты, измеряли их концентрации и разделяли LOS и EG-IM по размеру методом SDS-PAGE и идентифицировали по окрашиванию серебром, что представлено на фиг. 1. На фиг. 1А представлены результаты по идентификации экстрагированного LOS методом электрофореза и окрашивания серебром. На фиг. 1В представлен результат, показывающий, что размер EG-IM на основе LOS, экстрагированного при деградации липида А, уменьшается при обработке LOS щелочью, где М означает маркер (предварительно окрашенный стандарт SeeBlue® Plus 2, Invitrogen, LC5952), дорожка 1 - LOS, экстрагированный перед деацилированием, а дорожка 2 - деацилированный LOS (EG-IM).

Пример 1. Структурный анализ иммуномодулятора (EG-IM)

Очищенный образец соответствующим образом разбавляли очищенной водой. На прибор (UPLC, Waters) устанавливали обратнофазовую колонку CU18 (Acquity BEH300 C18 1,7 мкм, 2,1×150 мм), а затем разделяли образец в градиенте концентрации от 35 до 95% подвижной фазы А (50 мМ формиат аммония, pH 4,5) и подвижной фазы В (100% ацетонитрила). Проводили анализ методом MS и MS/MS на масс-спектрометре (Velos Pro, Thermo). Анализировали молекулы с молекулярной массой от 100 до 3000 масса/заряд. После MS-анализа идентифицированные молекулы с молекулярной массой от 50 до 2000 масса/заряд подвергали анализу еще раз. В качестве основного ингредиента была идентифицирована молекула с молекулярной массой 2372 масса/заряд, а на фиг. 2 схематически представлена структура, полученная при анализе каждого пика. Пример 2. Анализ иммунных ответов у иммуномодулятора (EG-IM)

1. Иммунизация и получение проб крови

Вводили по 3 мкг EG-IM или MPL по настоящему изобретению в дельтовидную область бедра задних конечностей 6-недельных мышей (BALB/с, самки, животные из центральной лаборатории/SLC, Япония), которые поступали в 5-недельном возрасте и содержались поодиночке в течение 1 недели (n=3). Мышам контрольной группы вводили солевой раствор. Через 1 и 4 ч после введения мышам для анестезии внутрибрюшинно вводили раствор анестетика ромпун/кетамин и брали кровь из сердца. Кровь выдерживали с охлаждением примерно 4 ч, а затем отделяли сыворотку центрифугированием при 4°C и 3000 об/мин в течение 10 мин, переносили в новые пробирки и хранили при -70°C.

2. Анализ уровня цитокинов в сыворотке мышей

Для измерения уровня цитокинов и хемокинов проводили мультиплексный анализ цитокинов (набор для анализа MAP, Millipore, Billerica, MA, США). Целевые цитокины -TNF-α, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1 и RANTES, а результаты определения, которое проводили на приборе Luminex 200 (Millipore) и анализировали с помощью программы MILLIPLEX Analyst (Millipore), представлены на фиг. 3-5. На фиг. 3 представлены результаты анализа IL-6, IL-12p40 и TNF-α, на фиг. 4 - результаты анализа IL-5 и IL-10, а на фиг. 5 - результаты анализа MCP-1 и RANTES.

Как видно из фиг. 3-5, при введении EG-IM он вызывает секрецию TNF-α и IL-6 в качестве провоспалительных цитокинов, IL-12p40 в качестве цитокина Th1-типа и IP-10, MIG-1, MCP-1 и RANTES в качестве хемокинов. Кроме того, уровень индуцированных иммуномодулятором цитокинов был выше, чем индуцированных MPL. Это означает, что иммуномодулятор EG-IM превосходит MPL по иммуностимулирующей активности *in vivo*.

Пример 3. Анализ эффективности смеси EG-IM/квасцы в составе инактивированной вакцины

1. Иммунизация вакциной против японского энцефалита

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у смеси EG-IM/квасцы в составе инактивированной вакцины использовали антиген вируса японского энцефалита (JEV). 6-недельным мышам BALB/с (Koates, Корея) дважды с интервалом в две недели вводили инактивированную вакцину против японского энцефалита или комбинацию из вакцины против японского энцефалита и квасцов (гидроксида алюминия; Brenntag, Германия). Комбинацию готовили таким образом, чтобы инактивированная вакцина против японского энцефалита использовалась по 0,5 мкг/мышь или 1 мкг/мышь, квасцы - по 25 мкг/мышь, а EG-IM - по 0,5 мкг/мышь в конечном объеме 100 мкл. Группе отрицательного контроля вводили PBS (физрастор на фосфатном буфере, pH 7,3).

2. Измерение титра специфичных к антигену JEV антител

Через 2 недели после последнего введения мышам анестезировали и брали у них сердечную кровь для приготовления проб крови. Для определения титра специфичных к антигену JEV антител в сыворотке после иммунизации использовали метод иммуоферментного анализа до конечной точки разведения. Антиген JEV разбавляли до концентрации 1 мкг/мл, фиксировали на 96-луночном планшете по 100

мкл/лунку (в течение ночи при 4°C) и блокировали 300 мкл 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) (комнатная температура, 1 ч). После блокировки трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Tween-20, а сыворотку, полученную после иммунизации, разбавляли в 10-кратных серийных разведениях и вносили по 100 мкл каждого разведения сыворотки для реакции (37°C, 2 ч). Для идентификации специфичных к антигену JEV антител добавляли конъюгированное с пероксидазой хрена антитело против IgG мыши (Jackson, 115-035-003), антитело против IgG1 мыши (Serotec, STAR132P) и антитело против IgG2a мыши (Serotec, STAR133P) и проводили реакцию, а затем добавляли TMB (тетраметилбензидин, BD BioScience, #55555214) и останавливали реакцию с помощью 1N H₂SO₄. Результаты определения получали путем измерения поглощения при 450 нм и расчета титров антител типа IgG, IgG1 и IgG2a в пробах крови после иммунизации. В результате в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы продукция специфичных к антигену JEV антител типа IgG повышалась в 13 раз и 3 раза соответственно, по сравнению с опытными группами с одним EG-IM или только с квасцами. Кроме того, продукция специфичных к антигену JEV антител типа IgG1 в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы повышалась в 12 раз и 3 раза, соответственно, по сравнению с опытными группами с одним EG-IM или только с квасцами, и продукция специфичных к антигену JEV антител типа IgG2a также повышалась в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы (фиг. 6).

Таким образом, вакцина против японского энцефалита по настоящему изобретению, содержащая EG-IM в качестве иммуномодулятора, а также квасцы в качестве иммуноадаьюванта, проявляет отличное иммунное действие, то есть эффективность в качестве вакцины.

3. Анализ цитокинов

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки, которые стимулировали с помощью 5 мкг/мл инактивированного антигена JEV или рекомбинантного белка gE JEV и культивировали в течение 72 ч. Затем анализировали секрецию цитокинов IFN-γ и IL-5 методом сэндвич-ELISA (R&D Systems; DY485, DY405).

В результате в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы повышалась секреция IFN-γ по сравнению с опытной группой с одними квасцами, которые дают улучшение гуморального иммунитета, но не повышалась секреция IL-5 (фиг. 7).

Таким образом, оказалось, что вакцина против японского энцефалита, содержащая EG-IM и квасцы, обладает отличной способностью индуцировать клеточный иммунитет типа TH1, а также иммунитет, опосредованный антителами.

Пример 4. Анализ эффективности смеси EG-IM/квасцы в составе конъюгатной вакцины

1. Иммунизация вакциной против *Haemophilus influenzae* типа B

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у смеси EG-IM/квасцы в составе конъюгатной вакцины использовали антиген HIB (*Haemophilus influenzae* b). 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) трижды с интервалом в две недели вводили внутримышечно смесь ActHIB (конъюгатная вакцина против *Haemophilus* b, конъюгат со столбнячным токсиндом, Sanofi Pasteur SA) и EG-IM/квасцов. Что касается вводимого количества, то ActHIB вводили по 2 мкг/мышь, квасцы - по 25 мкг/мышь и EG-IM - по 0,5 мкг/мышь.

2. Измерение титра специфичных к антигену HIB антител

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали и брали у них сердечную кровь для приготовления проб крови, а затем измеряли титр антител типа IgG в крови с помощью набора для ELISA на IgG против *Haemophilus influenzae* типа b (XpressBio, США) для измерения титра специфичных к антигену HIB антител.

В результате в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы проявлялось 2-кратное повышение продукции специфичных к антигену HIB антител типа IgG по сравнению с коммерчески доступной вакциной (фиг. 8).

Таким образом, оказалось, что вакцина против *Haemophilus influenzae* типа B, содержащая и EG-IM в качестве иммуномодулятора, и квасцы в качестве иммуноадаьюванта, вызывает опосредованный антителами иммунный ответ и проявляет отличное иммунное действие, то есть эффективность в качестве вакцины.

Пример 5. Анализ эффективности смеси EG-IM/квасцы в составе рекомбинантной вакцины

Вакцина против MERS

1. При использовании рекомбинантного белка S1 шипов MERS-CoV

1. Иммунизация вакциной против MERS

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у смеси EG-IM/квасцы в составе рекомбинантной вакцины использовали рекомбинантный белок S1 шипов MERS-CoV (eEnzyme, MERS-S1-005P). 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) трижды с интервалом в две недели вводили внутримышечно смесь из рекомбинантного белка S1 шипов MERS-CoV и квасцов и/или EG-IM. Что касается вводимого количества, то белок S1 вводили по 0,5 или 1 мкг/мышь, квасцы - по 25 мкг/мышь и EG-IM - по 0,5 мкг/мышь.

2. Измерение титра специфичных к антигену вируса MERS антител

Через 4 недели после последнего введения мышей анестезировали и брали у них сердечную кровь для приготовления проб крови, а затем измеряли титр антител типа IgG1 и IgG2a в крови с помощью набора для ELISA для измерения титра специфичных к антигену вируса MERS антител.

В результате в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы зависимым от концентрации образом повышалась продукция специфичных к антигену вируса MERS антител типа IgG1 и IgG2a по сравнению с опытной группой с одними квасцами, причем степень возрастания IgG2a была выше, чем IgG1, по сравнению с опытной группой с одними квасцами (фиг. 9). Таким образом, оказалось, что вакцина против MERS, содержащая и EG-IM в качестве иммуномодулятора, и квасцы в качестве иммуноадьюванта, проявляет отличное иммунное действие, то есть эффективность в качестве вакцины.

3. Анализ цитокинов

Через 4 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки, которые стимулировали с помощью белка S1 и культивировали в течение 72 ч. Затем анализировали секрецию цитокинов IFN- γ , IL-4 и IL-5 методом сэндвич-ELISA (R&D Systems; DY485, DY404, DY405).

В результате в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы зависимым от концентрации образом повышалась секреция IFN- γ по сравнению с опытной группой с одними квасцами, которые дают улучшение гуморального иммунитета, но снижалась секреция IL-4 и IL-5 (фиг. 10).

II. При использовании рекомбинантного белка RBD шипов MERS-CoV

1. Иммунизация вакциной против MERS

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у смеси EG-IM/квасцы в составе рекомбинантной вакцины использовали рекомбинантный белок RBD шипов MERS-CoV (eEnzyme, MERS-S1-005P). 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) трижды с интервалом в две недели вводили внутримышечно смесь из рекомбинантного белка RBD шипов MERS-CoV и квасцов и/или EG-IM. Что касается вводимого количества, то белок RBD вводили по 1 мкг/мышь, квасцы - по 25 мкг/мышь, Addavax - по 12,5 мкг/мышь и EG-IM - по 0,5 мкг/мышь.

2. Анализ цитокинов

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки, которые стимулировали с помощью белка RBD и культивировали в течение 72 ч. Затем для анализа подтипа Т-клеток, способствующих секреции цитокина IFN- γ , каждую опытную группу при стимуляции антигеном обрабатывали блокирующим антителом к CD4 или блокирующим антителом к CD8. Через 72 ч собирали культуральную жидкость клеток и анализировали секрецию цитокина IFN- γ методом сэндвич-ELISA (R&D Systems, DY485). В качестве контрольного иммуноадьюванта использовали Addavax (Invivogen).

В результате в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы повышалась секреция IFN- γ по сравнению с опытной группой с одними квасцами, которые дают улучшение гуморального иммунитета, или с опытной группой с Addavax (фиг. 11).

Таким образом, оказалось, что вакцина против MERS, содержащая EG-IM и квасцы, обладает отличной способностью индуцировать клеточный иммунитет типа TH1, а также иммунитет, опосредованный антителами.

Вакцина против Зика

1. Иммунизация вакциной против Зика

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у смеси EG-IM/квасцы в составе рекомбинантной вакцины использовали рекомбинантный белок оболочки вируса Зика. 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) дважды с интервалом в две недели вводили внутримышечно смесь из рекомбинантного белка оболочки вируса Зика и квасцов и/или EG-IM. Что касается вводимого количества, то белок оболочки вируса Зика вводили по 2 мкг/мышь, квасцы - по 25 мкг/мышь и EG-IM - по 0,5 мкг/мышь.

2. Измерение титра специфичных к антигену вируса Зика антител

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали и брали у них сердечную кровь для приготовления проб крови, а затем измеряли титр антител типа IgG1 и IgG2a в крови с помощью набора для ELISA для измерения титра специфичных к рекомбинантному белку оболочки вируса Зика антител.

В результате в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы улучшалась продукция специфичных к антигену вируса Зика антител типа IgG1 и IgG2a по сравнению с опытной группой с одним EG-IM или только с квасцами, причем степень возрастания IgG2a была выше, чем IgG1, по сравнению с опытной группой с одними квасцами (фиг. 12). Таким образом, видно, что вакцина против Зика, содержащая и EG-IM в качестве иммуномодулятора, и квасцы в качестве иммуноадьюванта, проявляет отличное иммунное действие, то есть эффективность в качестве вакцины.

3. Анализ цитокинов

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки, которые стимулировали с помощью белка оболочки вируса Зика и куль-

тивировали в течение 72 ч. Затем анализировали секрецию цитокинов IFN- γ и IL-5 методом сэндвич-ELISA (R&D Systems; DY485, DY405).

В результате в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы зависимым от концентрации образом повышалась секреция IFN- γ по сравнению с опытной группой с одними квасцами, которые дают улучшение гуморального иммунитета, но снижалась секреция IL-5 (фиг. 13).

Таким образом, оказалось, что вакцина против Зика, содержащая EG-IM и квасцы, обладает отличной способностью индуцировать клеточный иммунитет типа TH1, а также иммунитет, опосредованный антителами.

Пример 6. Анализ эффективности смеси EG-IM/квасцы в составе экстрагированной белковой вакцины

1. Иммунизация вакциной против *Pseudomonas aeruginosa*

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у смеси EG-IM/квасцы в составе экстрагированной белковой вакцины использовали антиген FT2 или антиген FT1 *P. aeruginosa*. 6-недельным мышам BALB/c дважды с интервалом в 1 неделю вводили внутримышечно смесь из антигена FT2 или антигена FT1 и квасцов и/или EG-IM. Антиген использовали в количестве 5 или 6,5 мкг/мышь. В качестве группы отрицательного контроля использовали группу, получавшую PBS.

2. Измерение титра специфичных к антигенам *Pseudomonas aeruginosa* антител

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали и брали у них сердечную кровь для приготовления проб крови, а затем измеряли титры антител типа IgG (общий), IgG1 и IgG2a в крови с помощью набора для ELISA для измерения титра специфичных к антигенам *Pseudomonas aeruginosa* антител.

В результате при иммунизации с помощью антигена FT2 *P. aeruginosa* в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы улучшалась продукция специфичных к *Pseudomonas aeruginosa* антител типа IgG по сравнению с опытной группой с одним EG-IM или только с квасцами (фиг. 14). Кроме того, при иммунизации с помощью антигена FT1 *P. aeruginosa* в опытной группе со смесью EG-IM/квасцы также улучшалась продукция специфичных к антигену антител типа IgG, IgG1 и IgG2a, как и продукция специфичных к GN3 *P. aeruginosa* (штамм FT1) антител типа IgG, IgG1 и IgG2a по сравнению с опытной группой с одним EG-IM или только с квасцами (фиг. 15). Это означает, что при использовании смеси EG-IM/квасцы в качестве иммуноадъюванта улучшается реактивность к антигену, использовавшемуся для вакцины против *P. aeruginosa*, а также реактивность к реальным клеткам инфекционных бактерий.

3. Измерение опсонофагоцитической активности в сыворотке мышей, возникающей при иммунизации вакциной против *Pseudomonas aeruginosa*

Для определения опсонофагоцитической активности в сыворотке мышей, возникающей при иммунизации вакциной против *Pseudomonas aeruginosa*, дважды с интервалом в две недели вводили 6,5 мкг одного лишь антигена FT2 *P. aeruginosa* или смеси антигена с квасцами и/или EG-IM. Через 2 недели после последней иммунизации брали сердечную кровь, получали сыворотку и измеряли опсонофагоцитическую активность против *P. aeruginosa* PA103 (штамм FT2). В частности, культивировали *P. aeruginosa* FT2 до экспоненциальной фазы, собирали клетки, инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 мин и проводили реакцию с 100 мкг/мл изомера I FITC при 4°C в течение 1 ч для флуоресцентного мечення клеток. Клетки с флуоресцентной меткой несколько раз промывали PBS и разбавляли до OD₆₀₀ = 0,9 буферным раствором для определения опсонофагоцитической активности (HBSS с 5% FBS и 0,1% желатина).

Клетки с флуоресцентной меткой подсчитывали и смешивали по 5×10^6 к.о.е. с иммунизированной сывороткой, смешивали с инактивированным кроличьим комплементом и культивировали со встряхиванием в отсутствие света в течение 30 мин. Затем смесь с этим штаммом смешивали с клетками HL-60 в соотношении 20:1 (штамм:клетки HL-60) и культивировали в течение 30 мин. После этого клетки промывали PBS, содержащим 0,1% BSA, собирали и анализировали методом проточной цитометрии (система FACSCanto II™, BD Biosciences) с помощью программы FlowJo (Treestar, США). Опсонофагоцитическую активность выражали в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI), отмеченной в клетках HL-60.

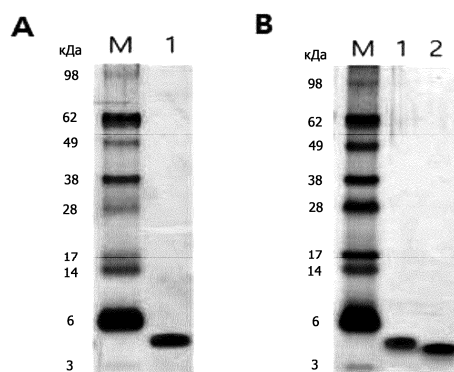
В результате фагоцитоз активировался сывороткой мышей, получавших комбинацию антигена и EG-IM/квасцов, по сравнению с группой отрицательного контроля, получавшей только EG-IM/квасцы, или с опытной группой, получавшей комбинацию антигена и квасцов (фиг. 16A). Фагоцитоз зависел от концентрации сыворотки и комплемента (фиг. 16B и 16C). Из этого видно, что антитела, специфичные к вакцине против *Pseudomonas aeruginosa*, индуцированные композицией EG-IM/квасцы, усиливают опсонофагоцитоз против *P. aeruginosa*, так что функции антител улучшаются.

4. Измерение защитного действия на антиген *P. aeruginosa*

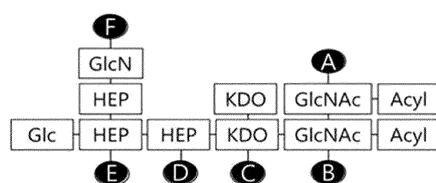
Для идентификации защитного действия смеси EG-IM/квасцы на антиген *Pseudomonas aeruginosa* 6-недельным мышам BALB/c дважды с интервалом в 1 неделю вводили по 5 мкг смеси антигена FT2 и квасцов и/или EG-IM. В качестве группы отрицательного контроля использовали группу, получавшую PBS. Через 2 недели после последнего введения брали пробы крови, а еще через 1 неделю мышей под-

иммунодефицита человека (ВИЧ), антигена вируса Herpes simplex (HSV), антигена *Neisseria meningitidis*, антигена *Corynebacterium diphtheria*, антигена *Bordetella pertussis*, антигена *Clostridium tetani*, антигена вируса папилломы человека (HPV), антигена вируса ветряной оспы, антигена энтерококков, антигена *Staphylococcus aureus*, антигена *Klebsiella pneumoniae*, антигена *Acinetobacter baumannii*, антигена *Enterobacter*, антигена *Helicobacter pylori*, антигена *Plasmodium spp.*, антигена вируса денге, антигена *Orientia tsutsugamushi*, антигена буньявируса тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (SFTS), антигена коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), антигена вируса гриппа, антигена вируса Эбола и антигена *Diplococcus pneumoniae*.

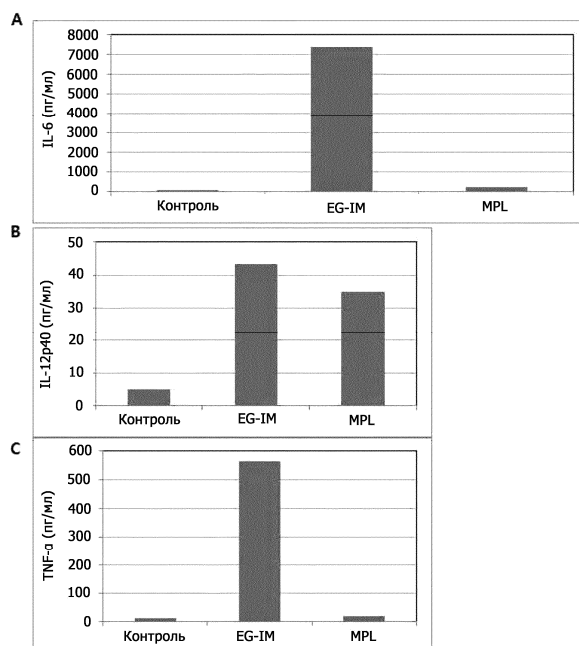
12. Вакцинная композиция по п.9, при этом вакцина представляет собой инактивированную вакцину, аттенуированную вакцину, субъединичную вакцину, конъюгатную вакцину, рекомбинантную вакцину, конъюгированную с белком вакцину, моновалентную вакцину, поливалентную вакцину или смешанную вакцину.



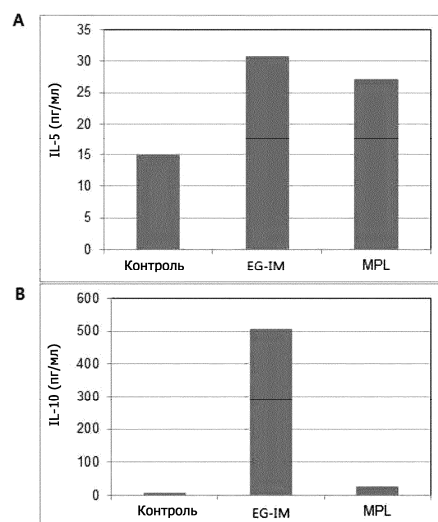
Фиг. 1



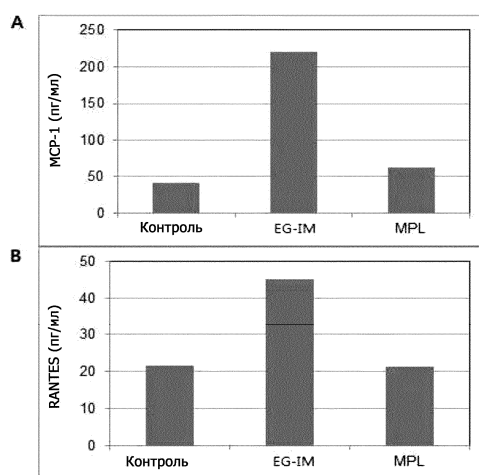
Фиг. 2



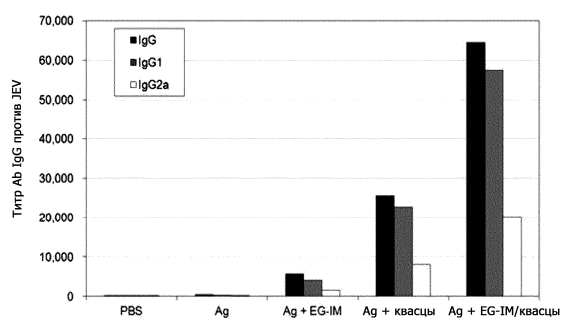
Фиг. 3



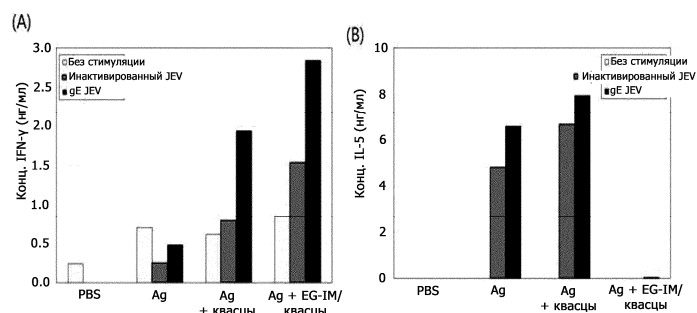
Фиг. 4



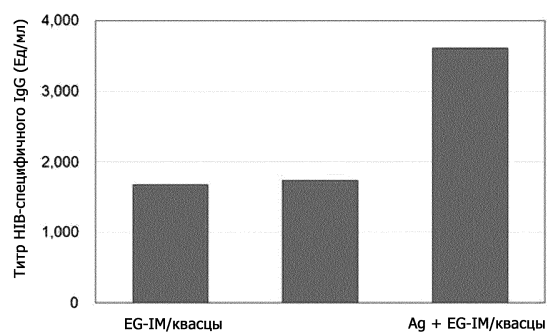
Фиг. 5



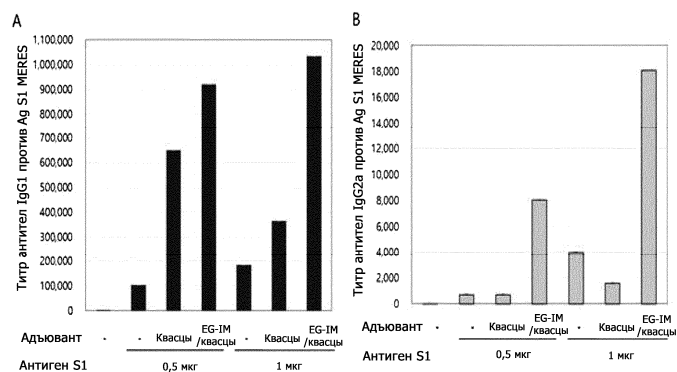
Фиг. 6



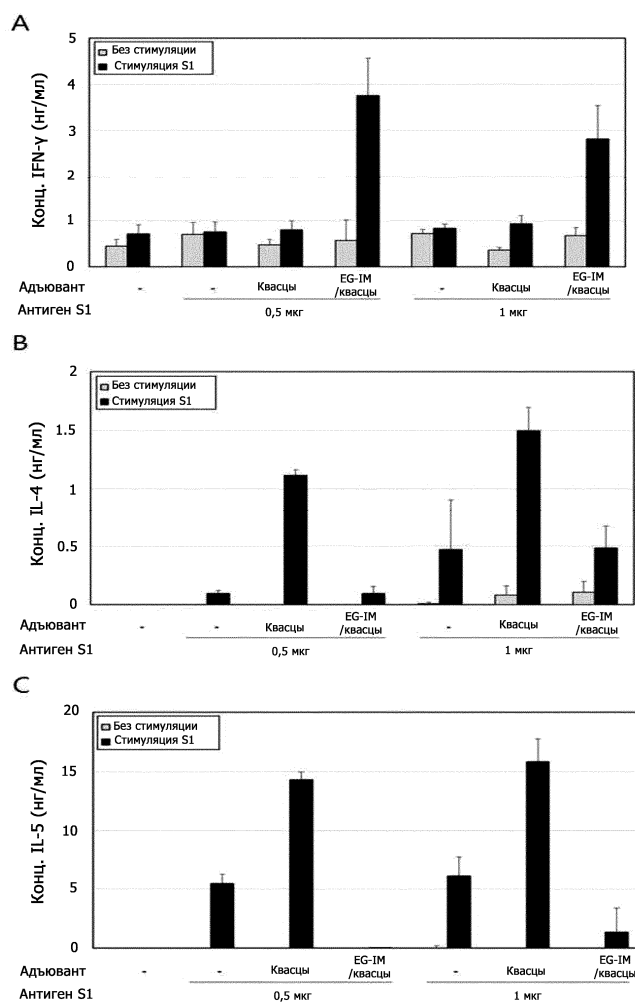
Фиг. 7



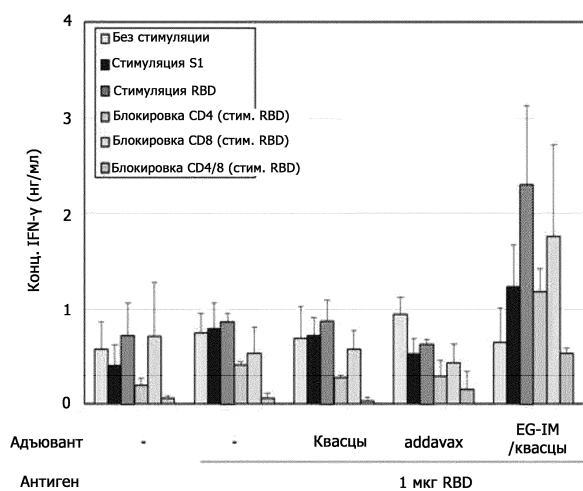
Фиг. 8



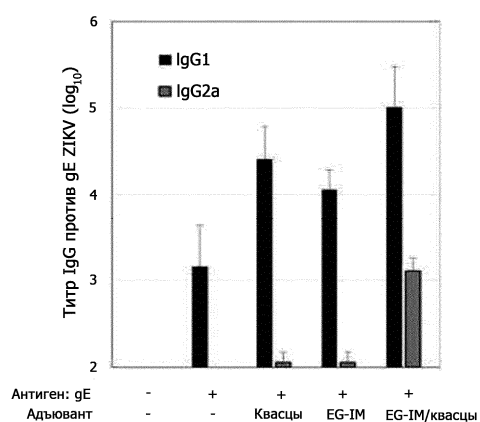
Фиг. 9



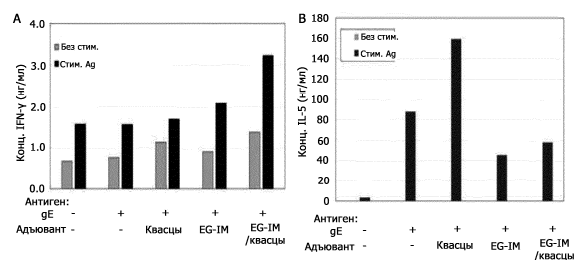
Фиг. 10



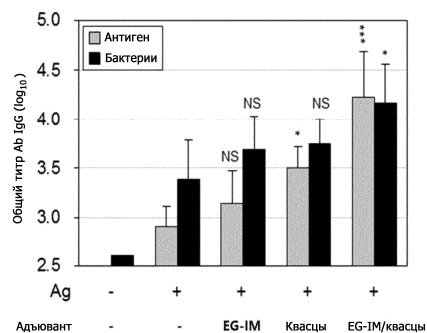
Фиг. 11



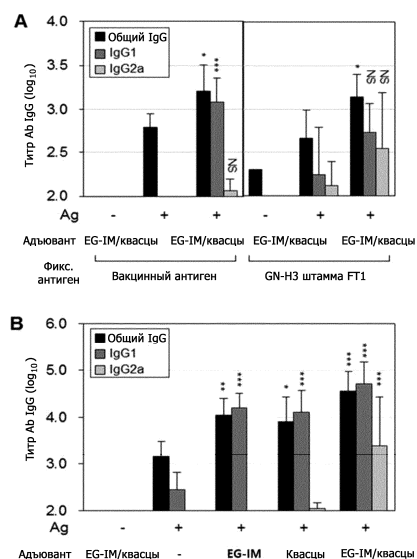
Фиг. 12



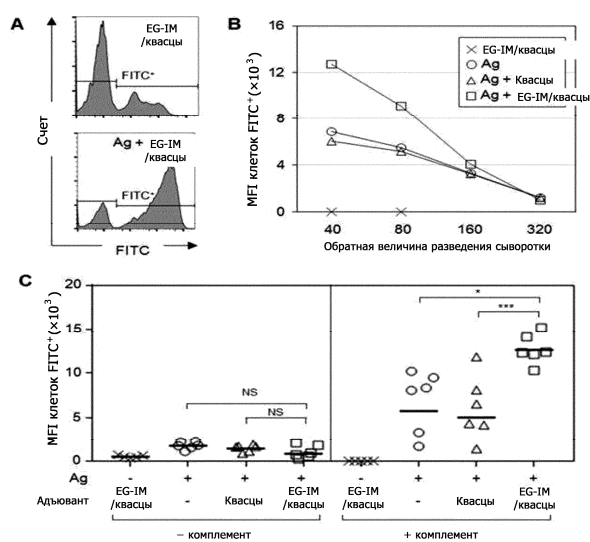
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

