



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/00 (2024.01); A61K 39/02 (2024.01); A61K 39/07 (2024.01); A61P 31/04 (2024.01); A61K 2039/51 (2024.01); C07K 14/195 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023105282, 07.03.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.03.2023

Дата регистрации:
27.06.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.03.2023

(45) Опубликовано: 27.06.2024 Бюл. № 18

Адрес для переписки:

119234, Москва, ул. Ломоносовский проспект,
27, строение 1, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Фонд
"Национальное интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

АРХИПЕНКО Марина Владимировна (RU),
ГРАНОВСКИЙ Дмитрий Львович (RU),
ЕВТУШЕНКО Екатерина Алексеевна (RU),
КАРПОВА Ольга Вячеславовна (RU),
КИРПИЧНИКОВ Михаил Петрович (RU),
КОНДАКОВА Ольга Александровна (RU),
НИКИТИН Николай Александрович (RU),
РЯБЧЕВСКАЯ Екатерина Михайловна
(RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова" (МГУ)
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Granovskiy D. L. et al. New
formulation of a recombinant anthrax vaccine
stabilised with structurally modified plant viruses
//Frontiers in Microbiology, 2022, 13, p. 1003969.
Thorat A. A., Suryanarayanan R. Characterization
of phosphate buffered saline (PBS) in frozen state
and after freeze-drying //Pharmaceutical research,
2019, 36, p. 1-11. (см. прод.)

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ
РАСТЕНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана группа изобретений, включающая вакцину для профилактики сибирской язвы и способ ее получения. Вакцина содержит в себе rPA83m - модифицированный рекомбинантный протективный антиген *Bacillus anthracis*, структурно модифицированные частицы, образующиеся при нагревании вируса табачной

мозаики (ВТМ), и фосфатно-солевой буфер с pH 7,2-7,6. Изобретение расширяет арсенал вакцин против сибирской язвы, в которых рекомбинантный протективный антиген сибирской язвы не будет терять своих иммуногенных и протективных свойств при хранении. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 10 ил., 5 пр.

(56) (продолжение):

Ryabchevskaya E. M. et al. Designing stable *Bacillus anthracis* antigens with a view to recombinant anthrax vaccine development //Pharmaceutics, 2022, 14(4), p. 806. WO 2017035359 A1, 02.03.2017. US 7261900 B2, 28.08.2007. RU 2270865 C2, 27.02.2006. US 8044189 B2, 25.10.2011.

R U 2 8 2 1 9 1 7 C 1

R U 2 8 2 1 9 1 7 C 1

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 39/07 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C07K 14/32 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 39/00 (2024.01); A61K 39/02 (2024.01); A61K 39/07 (2024.01); A61P 31/04 (2024.01); A61K 2039/51 (2024.01); C07K 14/195 (2024.01)

(21)(22) Application: 2023105282, 07.03.2023

(24) Effective date for property rights:
07.03.2023Registration date:
27.06.2024

Priority:

(22) Date of filing: 07.03.2023

(45) Date of publication: 27.06.2024 Bull. № 18

Mail address:

119234, Moskva, ul. Lomonosovskij prospekt, 27,
stroenie 1, Moskovskij gosudarstvennyj universitet
imeni M.V. Lomonosova, Fond "Natsionalnoe
intellektualnoe razvitie"

(72) Inventor(s):

ARKHIPENKO Marina Vladimirovna (RU),
GRANOVSKIJ Dmitrij Lvovich (RU),
EVTUSHENKO Ekaterina Alekseevna (RU),
KARPOVA Olga Vyacheslavovna (RU),
KIRPICHNIKOV Mikhail Petrovich (RU),
KONDAKOVA Olga Aleksandrovna (RU),
NIKITIN Nikolaj Aleksandrovich (RU),
RYABCHEVSKAYA Ekaterina Mikhajlovna
(RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
universitet imeni M.V.Lomonosova" (MGU)
(RU)

(54) PLANT VIRUS RECOMBINANT ANTHRAX VACCINE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: described is a group of inventions
which includes a vaccine for preventing anthrax and a
method for preparing it. Vaccine contains rPA83m, that
is modified recombinant protective antigen of Bacillus
anthracis, structurally modified particles formed during
heating of tobacco mosaic virus (TMV), and phosphate-

salt buffer with pH 7.2–7.6.

EFFECT: invention extends the range of anthrax
vaccines in which the recombinant protective anthrax
antigen will not lose its immunogenic and protective
properties during storage.

3 cl, 10 dwg, 5 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к иммунологии и биотехнологии, в частности к методам получения иммунобиологических препаратов, а именно вакцины, которая может применяться для профилактики сибирской язвы у людей и животных.

Уровень техники

Сибирская язва - тяжёлое бактериальное заболевание человека и других теплокровных животных (Sternbach, 2003; Turnbull, 2002). Наряду с угрозой вспышек болезни среди населения северных регионов и возможностью использования спор возбудителя в качестве биотеррористического агента серьёзной проблемой являются эпизоотии в популяциях сельскохозяйственных животных в областях таяния вечной мерзлоты. Возбудитель сибирской язвы - грамположительная спорообразующая бактерия *Bacillus anthracis* (сем. *Bacillaceae*, род *Bacillus*). Вирулентные штаммы *B. anthracis* содержат две плазмиды вирулентности: pXO2 и pXO1 (Read T.D. et al., 2003). pXO2 кодирует белки синтеза капсулы, которая обеспечивает невосприимчивость бактерии к фагоцитозу и воздействию системы комплемента плазмы крови. pXO1 кодирует три компонента токсина сибирской язвы: фактор летальности (lethal factor - LF), фактор отёчности (edema factor - EF) и протективный антиген (protective antigen - PA). Именно токсин сибирской язвы, в большом количестве продуцируемый вслед за прорастанием спор бактерии в лимфатических узлах животного, приводит к системным нарушениям в организме хозяина. Патогенными свойствами обладают только LF и EF, а PA является белком-транспортёром, обеспечивающим опосредованный эндоцитозом транспорт LF и EF через мембрану клетки хозяина. Таким образом, патогенный эффект характерен только для так называемых бинарных токсинов: LeTx (летальный токсин, состоит из LF и PA) и EdTx (токсин отёчности, состоит из EF и PA) (Collier, Young, 2003).

Наиболее эффективной мерой профилактики сибирской язвы является вакцинация. Существуют вакцины против сибирской язвы медицинского и ветеринарного назначения. В настоящее время лицензированы два типа вакцин против сибирской язвы, предназначенных для иммунопрофилактики людей: живые аттенуированные вакцины и препараты, основанные на бесклеточных фильтратах культур возбудителя заболевания - *Bacillus anthracis*. Первая группа вакцин включает российские препараты "Вакцина сибиреязвенная живая сухая" (48 ЦНИИ Минобороны России ФГУ (Россия)) и "Вакцина сибиреязвенная комбинированная" (Научно-исследовательский центр (в/часть 23527, г. Киров) 48 ЦНИИ Министерства обороны РФ (Россия)), а также китайскую национальную вакцину (Микшис и др., 2017; WHO, 2012) Обе российские вакцины содержат споры аттенуированного штамма *B. anthracis* STI-1 (pXO1⁺, pXO2⁻). Китайская вакцина основана на авирулентном штамме A16R (pXO1⁺, pXO2⁻) (WHO, 2012). Основным недостатком живых аттенуированных вакцин является наличие у аттенуированных штаммов плазмиды pXO1, кодирующей три компонента токсина сибирской язвы. Экспрессия всех трёх белков-компонентов токсина обуславливает возможность возникновения побочных эффектов при вакцинации. Вакцинация препаратами живых вакцин всегда связана с определёнными рисками. Ко второй группе вакцин относятся препараты Anthrax Vaccine Adsorbed (AVA, BioThrax®, Emergent BioSolutions Inc., США) (Подробное описание препарата: <https://www.fda.gov/media/71954/download>, дата обращения: 22.02.2023) и Anthrax Vaccine Precipitated (AVP, Porton Biopharma Ltd (PBL), UK) (WHO, 2012). Обе вакцины основаны на бесклеточных фильтратах культур неинкапсулированных штаммов *B. anthracis*. При изготовлении AVA (лицензирована в США) используется штамм V770-NP1-R, в качестве адьюванта выступает гель гидроксида алюминия. При изготовлении AVP (лицензирована в США)

используется штамм Sterne 34F2, а в качестве адъюванта - сульфат калия-алюминия (WHO, 2012). Для обоих препаратов характерна низкая иммуногенность, обуславливающая необходимость последовательного введения большого количества доз при вакцинации (5 доз для AVA, 4 для AVP) (WHO, 2012). Кроме того, для AVA характерны: 1) Высокая/ очень высокая частота побочных эффектов (WHO, 2012) и 2) Негативное влияние носителя, геля гидроксида алюминия, на стабильность основного действующего агента бактериальной природы в составе вакцины - протективного антигена сибирской язвы (РА) (Wagner et al., 2012). В свою очередь существенным недостатком AVP является недетерминированный состав итогового препарата.

Основным бактериальным антигеном в составе вакцины является РА - не обладающий патогенными свойствами компонент токсина *B. anthracis*. При этом вакцина содержит неопределенное количество прочих белков *B. anthracis*, в частности, оба патогенных компонента токсина - EF и LF (Modi et al., 2021). Патогенные свойства EF и LF способны проявляться в присутствии РА, при этом позитивный вклад этих белков в протективность вакцины неоднозначен (Dumas et al., 2017a; Dumas et al., 2017b; Modi et al., 2021). В качестве ветеринарной вакцины против сибирской язвы в России применяется “Вакцина против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИВВиМ живая” (ООО “Агровет”, Россия) (ГОСТ Р 52616-2006: <https://docs.cntd.ru/document/1200048392>, дата обращения: 22.02.2023), а в странах Европы и США - Anthrax Spore Vaccine (Colorado Serum Company, USA) (Подробное описание препарата: <https://pipevet.com/pub/media/labels/718.pdf>, дата обращения: 22.02.2023). Их использование также потенциально сопряжено с недостатками, присущими медицинским аттенуированным вакцинам.

Помимо двух подходов к созданию вакцины против сибирской язвы, реализованных в лицензированных препаратах, в настоящее время существует ряд альтернативных принципов дизайна сибиреязвенных вакцин. Современной тенденцией является отказ от использования спор *B. anthracis* в качестве основного иммуногена в составе конечного продукта, при этом приоритет отдаётся рекомбинантным белкам *B. anthracis*. В настоящее время с целью поиска новых компонентов (основы) для потенциальной вакцины ведутся исследования свойств всех продуктов, кодируемых обеими плазмидами вирулентности возбудителя сибирской язвы. Примеры рекомбинантных белков, потенциально пригодных к использованию в качестве основы вакцинных препаратов: 1) Инактивированные РА, EF и LF (WO2003048390A1, 12.06.2003); 2) N-концевой некаталитический домен EF (WO2007011411A2, 25.01.2007).

Наиболее перспективным считается использование рекомбинантного РА (83 кДа) - rРА. РА состоит из четырёх доменов. Антител к РА достаточно для формирования протективного иммунного ответа (Taft et al., 2008). В составе сибиреязвенного токсина РА выполняет функцию транслокации патогенных компонентов (EF и LF) через мембрану хозяйской клетки. Следовательно, в индивидуальной форме он не представляет опасности и не обладает патогенными свойствами. Таким образом, использование вакцин, основанных на индивидуальном рекомбинантном РА, не сопряжено с недостатками, связанными с патогенными свойствами сибиреязвенного токсина. В разработках используется как идентичный нативному РА, так и РА, в первичную последовательность которого внесены аминокислотные замены. Замены могут быть направлены на повышение стабильности белка, его функциональную инактивацию (актуально в случаях, когда разработчики изобретения всё же предпочитают комбинировать РА с EF и LF в одной вакцине), или на соединение последовательности РА с функционально активными белками или доменами другим белков. Также возможно использование отдельных доменов РА. Финальная композиция препарата может

включать: 1) предварительно полученный и очищенный рекомбинантный РА (субъединичные вакцины); 2) векторы, экспрессирующие РА в организме реципиента (бактериальные/вирусные); 3) молекулы ДНК (ДНК-вакцины). Примеры реализации соответствующих подходов:

1. Предварительно полученный и очищенный рекомбинантный РА (субъединичные вакцины): а) Campbell et al., 2007 - вакцина, содержащая полноразмерный гРА дикого типа; б) Gorse et al., 2006 - вакцина, содержащая полноразмерный гРА дикого типа (успешно завершена I фаза клинических испытаний); в) Kang et al., 2019 - рекомбинантная вакцина GC1109 (GC Pharma, Korea), содержит полноразмерный гРА дикого типа (успешно завершена II фаза клинических испытаний); г) CN105749265B, 27.03.2020 - бивалентная вакцина, содержит биологически инактивированные и неспособные к взаимодействию друг с другом гРА и рекомбинантный LF; д) RU2115433C1, 20.07.1998 - вакцина содержит полноразмерный гРА дикого типа в дополнение к спорам *B. anthracis* штамма STI, что позволило повысить эффективность по сравнению с лицензированными живыми вакцинами; е) Flick-Smith et al., 2002 - исследование субъединичной вакцины на основе изолированного рекомбинантного IV домена РА (препарат продемонстрировал протективность). Согласно имеющимся данным, именно IV домен РА содержит основные протективные эпитопы (McComb et al., 2016).

2. Векторы, экспрессирующие РА в организме реципиента (бактериальные/вирусные): а) US7947268B2, 24.05.2011 - оральные живые вакцинные кандидаты на основе гРА дикого типа, вектор - аттенуированные штаммы *Salmonella*; б) Aloni-Grinstein et al., 2005 - в качестве вектора для полноразмерного гРА со стабилизирующей делецией ³¹³FF³¹⁴ использован PXO1⁻, PXO2⁻ штамм *B. anthracis*; в) Duc et al., 2007 - в качестве вектора гРА дикого типа использован *Bacillus subtilis*; г) Mohamadzadeh et al., 2009 - в качестве вектора полноразмерного РА дикого типа использован *Lactobacillus acidophilus*; д) известно использование в качестве вектора для РА с инактивирующими мутациями R178A и K197A дефектного по синтезу LF и EF варианта *B. anthracis* штамма Sterne (CN105797148B, 14.01.2020); е) Galen et al., 2009 - в качестве вектора для гРА дикого типа, слитого с экспортируемым белком ClyA был использован *Salmonella enterica serovar Typhi*; ж) известно использование ДНК-конструкций, кодирующей I домен РА и предназначенной либо для получения и очистки I домена РА после интеграции в хромосому бактерий экспрессионной системы, либо для использования модифицированных бактерий в качестве вектора (RU2622085C2, 09.06.2017); з) Krishnan et al., 2015 - в качестве вектора для гРА дикого типа использован не реплицирующийся аденовирусный вектор пятого серотипа (Ad5). Стоит отметить, что подобные разработки сталкиваются с трудностями, связанными с наличием у большей части населения иммунитета против данного вектора.

3. Молекулы ДНК (ДНК-вакцины) - описаны моно- и бивалентные ДНК вакцины, кодирующие генетически функционально инактивированные гРА или гРА и гLF соответственно (Hermanson et al., 2004). Стоит отметить, что ДНК-вакцины вызывают серьёзные дискуссии в научном сообществе: не определён уровень опасности интеграции вакцинной ДНК в геном, а также не до конца изучено взаимодействие трансформированных вакцинной ДНК Т-лимфоцитов с механизмами иммунной защиты при презентации кодируемых антигенов в составе главных комплексов гистосовместимости (Kofta, Wedrychowicz, 2001).

Среди рассмотренных подходов к созданию вакцин против сибирской язвы субъединичные вакцины на основе гРА являются наиболее перспективным направлением. Основной проблемой при создании подобных препаратов является низкая стабильность гРА. Причиной нестабильности является подверженность гРА протеолизу в сайтах

расщепления фурином (I домен) и химотрипсином (II домен), а также спонтанному дезаминированию по ряду остатков аспарагина (68 остатков подвержены дезаминированию, однако лишь некоторые из них критически важны для стабильности белка вследствие их периода полураспада и влияния на свойства РА) (Powell et al., 2007; Ramirez et al., 2002; Zomber et al., 2005). В литературе подробно описаны методики стабилизации РА путём внесения замен в аминокислотную последовательность белка. В 2018 году Verma и Burns показали, что замена остатков аспарагина 713 и 719 на глутамин оказывает сильный стабилизирующий эффект на гРА, при этом модифицированный белок даже после длительного хранения обеспечивает выработку в организме реципиента антител на том же уровне, что и свежеполученный немодифицированный гРА (Verma, Burns, 2018). В 2002 году Ramirez с соавторами изучали возможность стабилизации гРА путём внесения замен в сайты протеолитического расщепления: в сайте расщепления фурином последовательность ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ была заменена на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷, а в сайте расщепления химотрипсином была произведена делеция ³¹³FF³¹⁴. Также у модифицированного белка Glu308 был заменён на аспарагин (Ramirez et al., 2002). Полученный белок использовали для вакцинации мышей в трёх формах: индивидуальный необработанный гРА, гРА, обработанный небольшим количеством формалина, и гРА в композиции с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта. Во всех трёх случаях иммунизированные мыши продемонстрировали уровень выработки РА-нейтрализующих антител, не отличающийся от такового у мышей, иммунизированных АВА. При этом предлагаемый авторами работы модифицированный гРА характеризуется высокой стабильностью. Методика получения устойчивого к протеолизу гРА с указанными выше заменами для создания вакцинных препаратов запатентована авторами статьи (US20040076638A1, 22.04.2004). В 2022 году впервые в рамках одного варианта модифицированного гРА были совмещены оба типа стабилизирующих замен: инактивация сайтов протеолиза и замена подверженных дезаминированию остатков аспарагина. В последовательности белка, названного авторами работы гРА83m, остатки аспарагина 162, 713, и 719 были заменены на глутамин, последовательность ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ была заменена на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷, а также была произведена делеция ³¹³FF³¹⁴ (Ryabchevskaya et al., 2022). Последовательность белка гРА83m была запатентована авторами работы (RU2789418C1, 02.02.2023).

Негативное влияние геля гидроксида алюминия, наиболее распространённого носителя/адъюванта в составе субъединичных вакцин, на стабильность гРА определяет необходимость поиска альтернативной платформы-носителя для рекомбинантных сибиреязвенных вакцин нового поколения. Примеры разработок систем доставки и адъювантов для гРА в составе субъединичных вакцин:

1) Peachman K.K. et al. - исследованы три подхода: липосомы, содержащие монофосфорил липид А; стабильная наноземulsion липосом “масло-в-воде”; дефектные по белкам hос и soc капсиды бактериофага Т4, инкрустированные белками hос и soc, слитыми с гРА. Все три варианта продемонстрировали эффективность в доклинических испытаниях на белых кроликах (Peachman et al., 2012).

2) Petersen et al. - полиангидридные наночастицы, состоящие из 1,6-бис(п-карбоксифеноксигексана и 1,8-бис(п-карбоксифеноксигексана)-3,6-диоксиоктана в соотношении 80%:20%. Данный носитель обеспечивает *in vivo* депонирование РА с постепенным высвобождением последнего, что позволяет использовать всего одну дозу при вакцинации (Petersen et al., 2012).

3) Manish et al. - вакцинный кандидат на основе 4-го домена РА, инкапсулированного

в полилактид-ко-гликолид (ПЛГА). Частицы продемонстрировали эффективность в доклинических испытаниях на мышах линии Swiss-Webster (Manish et al., 2016; Manish et al., 2013).

4) Malik *et al.* - в данной разработке наночастицы, представляющие собой PA, инкапсулированный в триметил-хитозан, скомбинированы с олигодеоксинуклеотидами CpG-C (ODN 2395) или полиинозин-полицитидиловой кислотой в качестве адъюванта. Показан высокий уровень протективности на мышах линии Balb/C (Malik A et al., 2018).

Недостатками перечисленных разработок являются отсутствие стабилизации гРА путём модификации самого антигена, и в целом какое-либо решение проблемы нестабильности гРА предлагается только в работе Petersen *et al.*

Наиболее близким к заявляемому (прототипом) являются препараты на основе устойчивого к протеолизу модифицированного гРА, аминокислотная последовательность которого включает последовательность нативного протективного антигена *Bacillus anthracis* заменой остатков ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷ в сайте расщепления фурином и делецией остатков ³¹³FF³¹⁴ в сайте расщепления химотрипсином, а также заменой Glu308 на Asp308. Методика получения и очистки, а также варианты конечного вакцинного препарата описаны в патенте US Patent № 20040076638A1, 22.04.2004. Недостатками данной технологии являются наличие у модифицированного гРА сайтов, подверженных к спонтанному дезаминированию, и отсутствие стабилизирующей активности по отношению к гРА у вспомогательных компонентов вакцины.

Технической проблемой по итогам изучения уровня техники является получение эффективной, стабильной при длительном хранении и не содержащей примесей, таких как не предусмотренные в составе препарата бактериальные компоненты, вакцины против сибирской язвы, которая не будет содержать гидроксид алюминия в качестве адъюванта.

Раскрытие изобретения

Техническим результатом является создание вакцины против сибирской язвы, в составе которой рекомбинантный протективный антиген сибирской язвы не будет терять своих иммуногенных и протективных свойств при хранении (как минимум в течение 27 дней при температуре +37°C). Ключевыми отличиями предложенной разработки в сравнении с приведённым прототипом являются: 1) наличие в дополнение к заменам в сайтах протеолиза (замена ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷ и делеция ³¹³FF³¹⁴) ещё и замен наиболее подверженных дезаминированию остатков аспарагина (Asp162, Asp713 и Asp719) на глутамины; 2) наличие платформы-носителя и стабилизатора - сферических частиц (СЧ), полученных в результате термически индуцированной перестройки вируса табачной мозаики.

Поставленная задача решается путём получения вакцинной композиции, состоящей из белка гРА83m и СЧ. Аминокислотная последовательность гРА83m отличается от последовательности нативного PA *Bacillus anthracis* наличием последовательности MRGSHHHHHHGS на N-конце белка и наличием мутаций в сайтах протеолиза (замена ¹⁶⁴NSRKKR¹⁶⁷ на ¹⁶⁴QSSNKE¹⁶⁷ и делеция ³¹³FF³¹⁴) и спонтанного дезаминирования (замена Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ на остатки глутамина). СЧ формируются из вируса табачной мозаики (ВТМ) в результате структурной перестройки, происходящей под воздействием температуры. Массовое соотношение гРА83m и СЧ составляет 1:10 с допустимым отклонением от указанного соотношения до 15%. Предпочтительно, что гРА83m представляет собой белок с молекулярной массой 84 кДа, полученный к бактериальной системе экспрессии *E. coli*. Предпочтительно, что сферические частицы получены путём

структурной перестройки водного раствора вируса табачной мозаики с концентрацией 1-2 мг/мл при температуре $98 \pm 0.5^\circ\text{C}$ и имеют размер 300-600 нм. Предпочтительно, что конечная концентрация рекомбинантного антигена в составе вакцинной композиции составляет $0,1 \pm 0,05$ мг/мл, при этом концентрация PBS является однократной (соответствует физиологической концентрации солей) и pH раствора лежит в диапазоне 7,2-7,6.

Также поставленная задача решается способом получения вышеуказанной вакцины, включающего следующие этапы:

- получение сферических частиц размером 300-600 нм путём двукратной инкубации водного раствора ВТМ с концентрацией 1-2 мг/мл при температуре $98 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в течение $10 \pm 0,5$ минут, с последующим охлаждением при температуре $+4^\circ\text{C}$ в течение 5-10 минут и перемешиванием после каждого нагревания;

- получение белка-антигена сибирской язвы rPA83m в бактериальной системе *E. coli* с последующими очисткой методом металл-хелатной хроматографии на

- Ni^{2+} -нитриллацетатной агарозе, переводом в водный раствор методом диализа и фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм;

- смешение в ламинарном боксе полученных стерильных водных растворов rPA83m и СЧ в массовом соотношении 1:10 (с допустимым отклонением от указанного соотношения до 15%) и добавлением стерильного десятикратного фосфатно-солевого буферного раствора (10xPBS) в количестве, соответствующем 1/10 части конечного объёма раствора вакциной композиции.

Возможность формирования композиций и сохранения белком rPA83m своей антигенной специфичности в их составе подтверждается методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии. Способность СЧ увеличивать стабильность rPA83m при различных температурах ($+37^\circ\text{C}$, $+25^\circ\text{C}$) подтверждается методом электрофоретического анализа в денатурирующих условиях (в присутствии додецилсульфата натрия) в градиентном 8-20% полиакриламидном геле (8-20% ДСН ПААГ). Иммуногенность и протективная активность вакцинных композиций подтверждается на модели морских свинок путем анализа титров антител в сыворотках крови иммунизированных животных методом иммуноферментного анализа, а также путём сравнения данных о выживаемости иммунизированных животных после заражения спорами полностью вирулентного штамма *Bacillus anthracis* 81/1: предложенная вакцина (СЧ+rPA83m) обладает большей иммуногенностью и протективностью по сравнению с препаратом, представляющим собой приготовленную аналогичным образом смесь rPA83m с гидроксидом алюминия. Аналогичным образом подтверждается, что предложенная вакцина защищает лабораторных животных от заражения с эффективностью до 100%, а значительного снижения протективной эффективности не происходит даже после инкубации препарата СЧ+rPA83m в течение 27 дней при $+37^\circ\text{C}$, то есть вакцина сохраняет свои протективные свойства.

Впервые предложено использование СЧ в качестве стабилизатора по отношению к адсорбированному на их поверхности бактериальному белку - рекомбинантному протективному антигену сибирской язвы. Таким образом, в рамках данного изобретения впервые одновременно использованы два подхода к стабилизации rPA - внесение стабилизирующих замен в последовательность белка и использование платформы-стабилизатора. Предложенная разработка является первым примером рекомбинантного вакцинного препарата на основе СЧ, для которого была показана протективность *in vivo*.

Краткое описание чертежей

Изобретение поясняется следующими чертежами.

Фиг. 1 представляет собой визуализацию композиций СЧ-гРА83m и анализ антигенной специфичности гРА83m в составе композиций с СЧ методом иммунофлуоресцентной микроскопии. (А, Б) - Композиции гРА83m+СЧ, проинкубированные с поликлональной антисывороткой к гРА83m в качестве первичных антител и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa 546. В, Г - Композиции гРА83m+СЧ, проинкубированные с химерными рекомбинантными моноклональными нейтрализующими антителами к РА (Панина А.А., Алиев Т.К., Топорова В.А., Шемчукова О.Б., Бикетов С.Ф., Долгих Д.А., Свешников П.Г. Нейтрализующие антитела против компонентов экзотоксина *Bacillus anthracis* // Тезисы докладов V Российского симпозиума «Белки и пептиды». 2011. С. 80) в качестве первичных антител и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором CF™ 488A. (А, В) - Режим флуоресценции. (Б, Г) - Режим фазового контраста.

Фиг. 2 представляет собой сравнение стабильности гРА83m в свободной форме и в составе композиций с СЧ при +37°C. Содержание гРА83m в каждом образце - 1 мкг. Соотношение масс гРА83m/СЧ составляло 1:10. Для каждой контрольной точки представлены относительные средние значения (количество повторностей $n = 5$) содержания полноразмерного белка в образцах индивидуального гРА83m (красный график), и в составе композиций гРА83m+СЧ (синий график). Оценку стабильности для всех проинкубированных образцов проводили с помощью электрофоретического анализа в 8-20% ДСН ПААГ. Для каждого образца среднее значение содержания полноразмерного белка, определённое путем сравнения с двумя соответствующими референсными образцами (пробы, инкубация которых не проводилась), использовали для построения графика и сравнения групп. Планки погрешностей отражают 95% доверительный интервал.

Фиг. 3 представляет собой сравнение стабильности гРА83m в свободной форме и в составе композиций с СЧ при +25°C. Представлено два независимых эксперимента по оценке стабильности при +25°C: с 0 по 63 день (А) и с 77 по 231 день (Б). Содержание гРА83m в каждом образце - 1 мкг. Соотношение масс гРА83m/СЧ составляло 1:10. Для каждой контрольной точки представлены относительные средние значения (количество повторностей $n = 5$, за исключением дней 21, 91, 175 и 203 для гРА83m и дня 175 для гРА83m+СЧ, в которые количество повторностей было $n = 4$, 4, 3, 3 и 4 соответственно), Красный график - содержание полноразмерного белка в образцах индивидуального гРА83m. Синий график - содержание полноразмерного белка в препаратах композиций гРА83m+СЧ. Оценку стабильности для всех проинкубированных образцов проводили с помощью электрофоретического анализа в 8-20% ДСН ПААГ. Для каждого образца среднее значение содержания полноразмерного белка, определённое путем сравнения с двумя соответствующими референсными образцами, использовали для построения графика и сравнения групп. В качестве референсных образцов были использованы препараты гРА83m и гРА83m+СЧ, с которыми инкубация не проводилась. Планки погрешностей отражают 95% доверительный интервал.

Фиг. 4 представляет собой сравнение стабильности гРА83m в свободной форме и в составе композиций с СЧ при +4°C. Содержание гРА83m в каждом образце - 1 мкг. Соотношение масс гРА83m/СЧ составляло 1:10. Для каждой контрольной точки представлены относительные средние значения (количество повторностей $n = 5$, за исключением дня 72 для гРА83m и дня 264 для гРА83m+СЧ, в которые количество повторностей было $n = 4$ и 3 соответственно) содержания полноразмерного белка в образцах индивидуального гРА83m (красный график), и композиций гРА83m+СЧ (синий

график). Оценку стабильности для всех проинкубированных образцов проводили с помощью электрофоретического анализа в 8-20% ДСН ПААГ. Для каждого образца среднее значение содержания полноразмерного белка, определённое путем сравнения с двумя соответствующими неинкубированными референсными образцами (кроме дня 5 228 для гРА83m+СЧ, в этом случае использовали только один референсный образец), использовали для построения графика и сравнения групп. Планки погрешностей отражают 95% доверительный интервал.

Фиг. 5 представляет собой визуализацию композиций СЧ-гРА83m и анализ антигенной специфичности гРА83m в составе композиций с СЧ после инкубации при +37°C в течение 10 40 дней методом иммунофлуоресцентной микроскопии. (А, Б) - Композиции гРА83m+СЧ, проинкубированные с поликлональной антисывороткой к гРА83m в качестве первичных антител и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa 546. (В, Г) - Композиции гРА83m+СЧ, проинкубированные с химерными рекомбинантными моноклональными нейтрализующими антителами к РА (Панина 15 А.А., Алиев Т.К., Топорова В.А., Шемчукова О.Б., Бикетов С.Ф., Долгих Д.А., Свешников П.Г. Нейтрализующие антитела против компонентов экзотоксина *Bacillus anthracis* // Тезисы докладов V Российского симпозиума «Белки и пептиды». 2011. С. 80) в качестве первичных антител и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором CF™ 488A. (А, В) - Режим флуоресценции. (Б, Г) - Режим фазового 20 контраста.

На **Фиг. 6** представлен график иммунизации и описание групп морских свинок, участвующих в эксперименте по оценке иммуногенности и протективности вакцинной композиции гРА83m+СЧ в сравнении с индивидуальным гРА83m и смесью гРА83m с гидроксидом алюминия, как не подвергавшихся инкубации, так и после хранения при 25 +37°C в течение 27 дней.

Фиг. 7 представляет собой сравнение иммуногенности вакцинной композиции гРА83m+СЧ с индивидуальным гРА83m и смесью гРА83m с гидроксидом алюминия на морских свинках. (А) - Сравнение иммуногенности неинкубированных препаратов. (Б) - Сравнение иммуногенности препаратов, подвергшихся инкубации при +37°C в течение 30 27 дней. (В) - Сравнение иммуногенности препарата гРА83m + Al(OH)₃ до и после инкубации. Инкубированные препараты обозначены как «инк.». ● - титр сыворотки, полученный от каждого отдельного животного; ■ - медиана. Титры сывороток оценивали методом непрямого ИФА (концентрация антигена на планшете - 10 мкг/мл). Р-value были рассчитаны с использованием теста Краскела-Уоллиса с апостериорным 35 критерием Данна для множественных сравнений (А, Б) или критерием Уилкоксона-Манна-Уитни для сравнения двух групп (В). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Фиг. 8 представляет собой сравнение титров антител к гРА83m и СЧ вырабатывающихся у морских в ответ на иммунизацию неинкубированными (А) и инкубированными при +37°C в течение 27 дней (Б) вакцинными композициями на 40 гРА83m+СЧ. ● - титр сыворотки, полученный от каждого отдельного животного; ■ - медиана. Титры сывороток оценивали методом непрямого ИФА (концентрация антигена на планшете - 10 мкг/мл). Р-value были рассчитаны с использованием критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. ****P < 0,0001.

На **Фиг. 9** представлена динамика массы морских свинок в группах 45 иммунизированных не подвергавшимися инкубации препаратами гРА83m (А), гРА83m+СЧ (Б), гРА83m+Al(OH)₃ (В) и СЧ (Ж), а также препаратами гРА83m (Г), гРА83m+СЧ (Д) и гРА83m+Al(OH)₃ (Е), проинкубированными при +37°C в течение 27 дней по

сравнению с контрольной группой животных иммунизированных фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Инкубированные препараты обозначены как «инк.». Для всех групп морских свинок, иммунизированных препаратами, содержащими гРА83m количество животных $n=10$; для групп, иммунизированных СЧ или PBS количество животных $n=5$. Животных иммунизировали подкожно дважды с интервалом в 28 дней. Схема исследования представлена на фигуре 6. Массу вакцинированных морских свинок анализировали с интервалом в 3 дня. Для построения графика использовали средний вес морских свинок для каждой группы. Планки погрешностей отражают 95% доверительный интервал.

На **Фиг. 10** представлено сравнение протективности препаратов, содержащих гРА83m на морских свинках после второго заражения спорами сибирской язвы штамма *B. anthracis* 81/1 (25000 спор/животное). Оценивалась протективность препаратов, не подвергавшихся инкубации (интактных) (А), и инкубированных («инк.») при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 27 дней (Б). (А) - кривые выживаемости морских свинок в группах, вакцинированных интактными препаратами гРА83m ($n = 10$), гРА83m+СЧ ($n = 10$), гРА83m+Al(OH)₃ ($n = 8$), СЧ ($n = 4$) или PBS ($n = 3$). (Б) - кривые выживания групп морских свинок, в группах, вакцинированных препаратами гРА83m инк. ($n = 10$), гРА83m+СЧ инк. ($n = 9$), гРА83m+Al(OH)₃ инк. ($n = 9$), СЧ ($n = 4$) или PBS ($n = 3$). З - количество животных подвергшихся повторному заражению. В - количество животных, выживших после повторного заражения.

Осуществление изобретения

В соответствии с настоящим изобретением вакцина для профилактики сибирской язвы представляет собой модифицированный рекомбинантный полноразмерный протективный антиген гРА83m, который отличается от нативного РА *Bacillus anthracis* тем, что содержит ряд мутаций повышающих его стабильность и СЧ в качестве платформы и дополнительного стабилизатора для антигена сибирской язвы. Мутации, внесённые в последовательность гРА83m, не приводят к существенному изменению его антигенных свойств и не ограничивают его протективный потенциал.

Выбор РА в качестве основного антигенно активного компонента вакцины против сибирской язвы обусловлен тем, что, во-первых, РА безопасен в отсутствии других компонентов токсина (Collier et al., 2003), а, во-вторых, антител вырабатывающихся к РА достаточно для формирования полноценного протективного иммунитета (Little et al., 1997; Clement et al., 2010). Использование рекомбинантного гРА, получаемого в экспрессионной системе *E. coli*, позволяет полностью исключить возможность контаминации препарата какими-либо другими компонентами *Bacillus anthracis*, которые могут обуславливать повышенную реактогенность. В свою очередь нестабильность гРА является серьезной проблемой разработки рекомбинантных вакцинных препаратов на его основе (Ramirez et al., 2002; Powell et al., 2007). Выбор именно модифицированного гРА83m связан с тем, что в его аминокислотной последовательности наиболее подверженные дезаминированию остатки Asp713 и Asp719 заменены за устойчивые к дезаминированию глутамины, и наряду с этим отсутствуют функционально активные сайты протеолиза фурином и химотрипсином, что суммарно приводит его существенной стабилизации (RU2789418C1, 02.02.2023).

Наиболее часто в существующих и разрабатываемых вакцинах против сибирской язвы в качестве адьюванта используют гидроксид алюминия (Kondakova et al., 2019). Однако присутствие гидроксида алюминия в составе вакцинного препарата негативно сказывается на стабильности гРА, что приводит к снижению иммуногенности и способность индуцировать выработку нейтрализующих антител (Wagner et al., 2012;

D'Souza et al., 2013).

Сферические частицы (СЧ) образуются в результате термически индуцированной структурной перестройки ВТМ (RU2441667C1, 10.02.2012). Ранее для них было показано, что они способны формировать иммуногенные композиции с антигеном интереса (RU2440140C1, 20.01.2012) и усиливать иммунный ответ на этот антиген (RU2442604C1, 20.02.2012). В рамках данного изобретения для СЧ была продемонстрирована способность оказывать стабилизирующее воздействие на rPA83m в составе композиций rPA83m+СЧ (пример 2). СЧ образуются из вируса растения в результате термического воздействия, в процессе которого происходит стерилизация препарата. СЧ безопасны для млекопитающих, что было продемонстрировано в ряде различных исследований (Bruckman et al., 2014; Nikitin et al., 2018a; Nikitin et al., 2018b), среди которых исследования острой и субхронической токсичности на мышах, крысах и кроликах, а также исследования иммунотоксичности. Таким образом, включение в состав вакцины СЧ в качестве носителя и стабилизатора рекомбинантного антигена сибирской язвы представляется весьма перспективным. Более того, стоимость получения СЧ невысока, ввиду того, что ВТМ накапливается в заражённом растении в больших количествах (10 г на 1 кг листьев), а процесс выделения вируса прост, более того в процессе получения СЧ происходит стерилизация препарата. Таким образом, предложенная технология обеспечивает низкую себестоимость производства вакцины, а стабильность вакцинного препарата при температурах до +37°C позволяет избежать необходимости жёсткого соблюдения условий холодовой цепи, что может позволить снизить затраты на транспортировку. Важно отметить, что предложенная вакцина на основе СЧ и rPA83m обладает высоким профилем безопасности ввиду отсутствия в её составе ослабленного/инактивированного патогена или компонентов, полученных из фильтратов культур *Bacillus anthracis*.

Конкретные примеры осуществления изобретения приведены для предоставления специалистам полного описания его реализации и не ограничивают предполагаемый авторами разработки объем изобретения.

Изобретение осуществляется следующим способом.

Суспензию частиц ВТМ в воде в концентрации 1-2 мг/мл подвергают кратковременной (10±0,5 минут) термической обработке при температуре 98±0.5°C, затем охлаждают, тщательно перемешивают и подвергают повторной термической обработке аналогичным образом, в результате чего происходит формирование белковых частиц сферической формы размером около 300-600 нм в диаметре.

СЧ, образовавшиеся в результате такой обработки, используют в качестве носителя и стабилизатора для модифицированного рекомбинантного антигена сибирской язвы rPA83m. rPA83m получают посредством экспрессии в культуре клеток *E. coli* с последующими очисткой методом аффинной хроматографии, переводом в водный раствор методом диализа и фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм. Для получения вакцины, СЧ смешивают с антигеном вируса краснухи в массовом соотношении 10:1 (с допустимым отклонением от указанного соотношения до 15%) в фосфатно-солевом буферном растворе, с концентрацией солей соответствующей физиологической и pH=7,2-7,6. При образовании вакцинных композиций rPA83m+СЧ белок не изменяет своих специфических антигенных и иммуногенных свойств.

Анализ вакцинных композиций, а также стабильности и антигенных свойств rPA83m в их составе осуществляют с использованием следующих методик: метод непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии и метод электрофореза в 8-20% ДНС ПААГ. Эффективность вакцины исследуется на лабораторных животных. Оценка

иммуногенности проводится путём определения титров антител к rPA83m и СЧ в сыворотках крови иммунизированных животных с помощью метода непрямой твердофазного иммуноферментного анализа. Для исследования протективности вакцинного препарата используется полностью вирулентный штамм *Bacillus anthracis* 81/1.

Сущность изобретения поясняют следующие примеры, не ограничивая его.

Пример 1

Получение композиций СЧ+rPA83m

1) **Получение СЧ.** Методом термической перестройки из вирионов ВТМ получены частицы сферической формы. Раствор ВТМ с концентрацией 2 мг/мл разливали по 0,5 мл в стандартные 1,5 мл полипропиленовые пробирки (Greiner bio-one, 616 201), после чего пробирки переносили в термостат Термит (ДНК-Технология, Россия), температура в котором составляла 98°C, инкубировали 10 минут, после чего пробирки охлаждали в течение 20 минут при +4°C. Затем раствор перемешивали с помощью мини-центрифуги-вортекса Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия), после чего проводили повторную инкубацию при 98°C в течение 10 минут. Формирование СЧ фиксировали визуально по изменению мутности раствора. Полученные СЧ были проанализированы методом электронной микроскопии и методом электрофоретического анализа в 8-20% ДСН ПААГ. Средний размер СЧ, измеренный при анализе электронных микрофотографий с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН, США), составил 435±85 (среднее ± стандартное отклонение, n = 100).

2) **Получение rPA83m.** Рекомбинантный антиген, представляющий собой модифицированный протективный антиген *Bacillus anthracis*, содержащий следующие мутации:

1) Замена ¹⁶⁴NSRKRR¹⁶⁷ на ¹⁶⁴QSSNKE¹⁶⁷ в сайте протеолиза фурином и делеция ³¹³FF³¹⁴ в сайте расщепления химотрипсином;

2) Замена подверженных спонтанному дезаминированию остатков Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ на остатки глутамина;

3) Наличие последовательности MRRGSHNNNNHGS на N-конце белка;

был экспрессирован в клетках *E. coli* штамма SG13009. Для культивирования бактериальных клеток была использована среда 2YT (1,6% триптон, 1% дрожжевого экстракт, 0,5% NaCl), содержащая селективные антибиотики - ампициллин и канамицин в концентрациях 100 мкг/мл и 50 мкг/мл соответственно. До индукции экспрессии целевого белка путем добавления изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (до конечной концентрации 2mM) клетки растили при температуре 37°C, а после добавления ИПТГ при температуре 20°C. Накопленный rPA83m был экстрагирован из бактериальных клеток в денатурирующих условиях и очищен методом аффинной металл-хелатной хроматографии на Ni²⁺-нитрилацетатной агарозе. Белок переводили в водный раствор методом диализа против деионизированной воды Milli-Q в диализных мешках с размером пор 12-14 кДа, диаметр 16 мм (каталожный номер 44145, «Servapor», Германия) в течение 4 часов со сменой воды каждый час. Затем водный раствор белка подвергали центрифугированию при 16000g и стерилизовали супернатант путём фильтрации с помощью шприцевых фильтрующих насадок CHROMAFIL® CA-20/25(S, 729024).

3) **Получение вакцины.** Вакцинная композиция представляет собой смесь СЧ и rPA83m, приготовленную на фосфатно-солевом буфере PBS. Смешение стерильных водных растворов rPA83m и СЧ было проведено в ламинарном боксе Mars 1500 (ScanLaf, Дания).

Стерилизация водного раствора гРА83m происходила за счёт фильтрации через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм, а стерилизация препарата СЧ происходила в процессе его получения за счёт нагревания до 98°C. гРА83m и СЧ смешивали в массовом соотношении 1:10 и добавляли стерильный десятикратный фосфатно-солевой буферный раствор (10xPBS) в количестве, соответствующем 1/10 части конечного объёма раствора вакциной композиции. Итоговая концентрация рекомбинантного антигена в составе вакцинной композиции составили 0,1 мг/мл, а концентрация СЧ соответственно 1 мг/мл. Состав буферного раствора (1xPBS) для вакцинной композиции был следующим: (7мМ Na₂HPO₄; 1,5мМ K₂HPO₄; 137мМ NaCl; 2,7мМ KCl; pH 7,2).

Антигенные свойства гРА83m в составе композиций с СЧ были изучены с использованием иммунофлуоресцентного анализа (Фиг. 1). Для этого суспензию композиций гРА83m+СЧ наносили на покровные стекла, предварительно покрытые формваром. Инкубировали с блокирующим раствором (PBS с 1% бычьим сывороточным альбумином, содержащий 0,05% твин-20) в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем стёкла обрабатывали первичными антителами в разведении 1:100, приготовленном на блокирующем растворе. Использовали два варианта антител: мышьяная поликлональная антисыворотка к гРА83m, а также химерные рекомбинантные моноклональные антитела, обладающие нейтрализующей активностью (Панина и др., 2011). Инкубировали в течение часа. Не связавшиеся антитела удаляли раствором для отмывки (PBS с 0,25% БСА, содержащий 0,05% твин-20) на качалке PSU-10i (Biosan, Латвия) 3 раза по 5 минут (80 об/мин). Наносили вторичные антитела, в случае поликлональной мышьяной сыворотки использовали антитела к иммуноглобулинам мышья, конъюгированные с флуорофором Alexa 546 («Invitrogen», США) (разведение 1:200 на блокирующем растворе), в случае первичных химерных моноклональных антител использовали антитела к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с флуорофором CFTM 488A («Merk», Германия) (разведение 1:100 на блокирующем растворе). Инкубировали 1 час, после чего не связавшиеся антитела удаляли раствором для отмывки 3 раза по 5 минут на качалке. Затем раствор для отмывки заменяли на PBS и инкубировали при покачивании ещё 5 минут, после чего споласкивали стекла Milli-Q. Покровные стекла с препаратами монтировали поверх предметных стёкол. Между предметным стеклом и препаратом наносили фотозащитную добавку 1,4 диазобицикло-[2,2,2]октан, и затем анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа «Axiovert 200M» (Carl Zeiss, Германия), снабжённого интегрированной камерой «ORCAII-ERG2» (Hamamatsu, Япония).

Наличие в режиме флуоресценции сигнала (Фиг. 1 А и В), соответствующего положению СЧ, наблюдаемых в режиме фазового контраста (Фиг. 1 Б и Г) указывает на то, что гРА83m способен образовывать композиции с СЧ и сохраняет свои антигенные свойства в составе этих композиций. Взаимодействие с моноклональными антителами свидетельствует о том, что соответствующий им нейтрализующий эпитоп экспонирован и доступен для взаимодействия с антителами в составе полученных композиций гРА83m+СЧ.

Пример 2

Изучение влияние СЧ на стабильность гРА83m в составе вакцинной композиции гРА83m+СЧ

Стабильность композиций СЧ-гРА83m в сравнении со стабильностью гРА83m в свободной форме исследовалась при температурах +37°C, +25°C и +4°C. Температура +37°C выбрана с целью моделирования ускоренного старения препаратов. Выбор комнатной температуры (+25°C) также связан с тем, что подобные температурные

значения могут достигаться при нарушении холодовой цепи при транспортировке и хранении вакцинных препаратов. +4°C соответствует стандартным температурам хранения вакцин.

5 Препараты rPA83m и композиций rPA83m+СЧ инкубировались в соответствующих температурных условиях. Инкубация проводилась в объёме 10 мкл в растворе 1xPBS. Концентрация rPA83m составляла 0,1 мкг/мкл. Композиции rPA83m+СЧ были
10 приготовлены в массовом соотношении СЧ к rPA83m, равном 10:1, соответствующем таковому в составе вакцинной композиции. В эксперименте при +37°C оценка степени деградации белка производилась каждые 3 дня, при +25°C - каждые 7 или 12 дней, при +4°C - каждые 14 дней. Эксперименты были проведены в пяти аналитических повторностях, по истечению соответствующего времени инкубации препараты хранились при температуре -70°C. Относительное содержание полноразмерной формы rPA83m, содержащегося в препаратах как индивидуального rPA83m, так и композиций rPA83+СЧ в каждый день эксперимента для каждой аналитической повторности было
15 рассчитано относительно не подвергавшихся инкубации контрольных образцов, содержащих 1 мкг белка rPA83m. Контрольные образцы rPA83m и rPA83m+СЧ хранились при температуре -70°C. Расчёт проводился с помощью программы Image Lab системы гель-документирования ChemiDoc XRS+ («Bio-RAD», США). По пяти аналитическим повторностям были определены средние геометрические значения содержания
20 полноразмерного rPA83 в каждый из дней эксперимента.

На основании этих данных были построены графики динамики деградации rPA83m при +37°C (Фиг. 2), +25°C (Фиг. 3) и +4°C (Фиг. 4).

Для каждого дня была исследована статистическая значимость различий в стабильности между rPA83m в свободной форме и в композиции с СЧ. Для этого данные
25 по содержанию rPA83m в препаратах свободного rPA83m и композиций с rPA83m+СЧ в пяти аналитических повторностях сравнивались с помощью теста Уилкоксона-Манна-Уитни с уровнем значимости $p=0,05$ с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 9.1.0. (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, USA)).

Исходя из графика, представленного на фигуре 2, видно, что начиная с первых дней
30 инкубации при +37°C, в составе композиций с СЧ rPA83m существенно более стабилен, чем в свободной форме. В каждой контрольной точке различия в относительном содержании полноразмерной формы rPA83m в препаратах индивидуального белка и композиций rPA83m+СЧ статистически значимы (p -value $<0,05$). По итогу 33 дней инкубации в свободной форме осталось 6% недеградированного белка rPA83m, а в
35 составе композиций rPA83m+СЧ - 30%.

Стабильность при +25°C первоначально исследовалась в течение 63 дней с интервалом 7 дней (Фиг. 3А). После анализа полученных данных был проведён дополнительный эксперимент при той же температуре, так как уровень деградации белка, достигнутый на 63-й день оказался недостаточным. Второй эксперимент при +25°C длился 231 день;
40 образцы были анализировали с интервалом в 14 дней, начиная с 77-го дня эксперимента (Фиг. 3Б). По данным, представленным на фигуре 3, видно, что и при +25°C rPA83m в составе композиций с СЧ демонстрирует более высокий уровень стабильности, чем в свободной форме. По результатам статистического анализа, выполненного с использованием теста Уилкоксона-Манна-Уитни, было показано, что различия в
45 стабильности статистически значимы (p -value $<0,05$) во все дни, кроме дня 21, 49 и 119.

Таким образом, как при +37°C, так и при +25°C белок rPA83m демонстрирует высокий уровень стабильности, который существенно увеличивается в составе композиций rPA83m+СЧ.

Анализ, проводившийся в течение 276 дней, не выявил различий между стабильностью гРА83m в составе композиций гРА83m+СЧ и гРА83m в индивидуальной форме при температуре +4°C (Фиг. 4). Это позволяет предположить, что при данных температурных условиях 276-дневной инкубации недостаточно для выявления стабилизирующего эффекта, который СЧ оказывают на гРА83m. Тем не менее, тот факт, что относительное содержание полноразмерного белка не опускалось ниже 60% ни в препаратах композиций гРА83m+СЧ, ни в препаратах индивидуального гРА83m, указывает на их высокую стабильность при обычной температуре хранения вакцин.

Пример 3

гРА83m сохраняет свои антигенные свойства в составе вакцинной композиции гРА83m+СЧ после инкубации при +37°C в течение 40 дней

Сохранение антигенных свойств гРА83m в составе вакцинных композиций после хранения было подтверждено с помощью метода флуоресцентной микроскопии. По аналогии со свежеприготовленными композициями, композиции гРА83m+СЧ подвергшиеся инкубации при +37°C в течение 40 дней были исследованы как описано в примере 1. Для анализа антигенной специфичности рекомбинантного белка сибирской язвы были использованы мышьяная поликлональная антисыворотка к гРА83m (Фиг.5 А и Б) и моноклональные антитела к РА, обладающие нейтрализующей активностью (Фиг.5 В и Г). Исходя из фигуры 5 видно, что в обоих случаях отчетливо детектируется флуоресцентный сигнал, соответствующий сигналу флуорофора, конъюгированного с используемыми вторичными антителами. Распределение флуоресценции (Фиг. 5 А и В) соответствует положению СЧ в режиме фазового контраста (Фиг.5 Б и Г). Это подтверждает то факт, что гРА83m, адсорбированный на поверхности СЧ сохраняет способность взаимодействовать как с поликлональной антисывороткой, так и с моноклональными антителами после хранения при +37°C как минимум в течение 40 дней.

Пример 4

Вакцинная композиция гРА83m+СЧ индуцирует выработку высокого титра антител к антигену сибирской язвы, при этом значимого снижения иммуногенности не происходит даже после хранения препарата при +37°C

Иммуногенность вакцины гРА83m+СЧ была исследована на морских свинках. Помимо этого, была проведена оценка иммуногенности вакцинного препарата гРА83m+СЧ, инкубированного в течение 27 дней при +37°C (в целях моделирования ускоренного старения). Для сравнительного изучения влияния СЧ на иммуногенность вакцинного кандидата (как интактного, так и после хранения) была проведена иммунизация препаратами индивидуального гРА83m и гРА83m в смеси с гидроксидом алюминия (гРА83m +Al(OH)₃). Гидроксид алюминия - адъювант, который используется чаще всего в составе вакцин против сибирской язвы. Ранее было показано, что Al(OH)₃ снижает стабильность гРА при хранении (Wagner et al., 2012). Фигура 6 представляет собой схему проведения эксперимента. Морских свинок породы Агути иммунизировали подкожно дважды с интервалом в 28 дней. Кровь брали из краевой ушной вены через 20 дней после второй иммунизации. Исследование включало шесть экспериментальных групп по десять животных (5 самок и 5 самцов) в каждой. Во всем случаях количество гРА83m на одну дозу вакцины было одинаковым и составляло 30 мкг. Для вакцинных композиций массовое соотношение гРА83m:СЧ составляло 1:10. Содержание адъюванта сравнения (гидроксида алюминия) по массе соответствовало содержанию СЧ в составе вакцинной композиции.

Животных групп 1 и 4 иммунизировали гРА83m (30 мкг), групп 2 и 5 - композициями

гРА83m+СЧ (30 мкг гРА83m + 300 мкг СЧ), групп 3 и 6 - гРА83m + Al(OH)₃ (30 мкг гРА83m + 300 мкг Al(OH)₃). Для иммунизации животных из групп 1, 2 и 3 были использованы препараты, не подвергавшиеся инкубации, которые были заморожены сразу после приготовления и хранились при -20°C. Животных из групп 4, 5 и 6 иммунизировали препаратами, которые инкубировались в течение 27 дней при +37°C и затем были заморожены при -20°C. Две контрольные группы состояли из пяти животных, которых иммунизировали либо только СЧ (300 мкг на животное) (группа 7) или только фосфатно-солевым буфером PBS (группа 8). Все препараты были приготовлены на основе PBS, объем одной дозы во всех случаях составлял 0,3 мл.

Титры антител в сыворотках иммунизированных животных определяли с помощью твердофазного непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Измерение титра антител проводилось, как минимум, в трех повторностях; титры отдельных сывороток представляют собой геометрическое среднее всех повторностей. Для всех групп определяли медиану титров антител. Парные сравнения осуществляли с помощью теста Уилкоксона-Манна-Уитни, а для множественного сравнения применяли тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна. Фигура 7 представляет собой графическое отображение результатов анализа титров антител и сравнения групп, выполненное с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 9.1.0 (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, United States).

Для образцов сывороток, полученных от животных, иммунизированных не инкубированными образцами, между экспериментальными группами не было выявлено различий между отдельными экспериментальными группами (тест Данна, сравнение всех групп со всеми). Однако только для 1 и 2 групп, но не для группы 3, были выявлены достоверные отличия значений титров к гРА83m от таковых, определённых для сывороток животных контрольных групп, иммунизированных СЧ (7-я группа, медиана титра $1,8 \times 10^3$) или PBS (8-я группа, медиана титра $1,77 \times 10^3$). Для инкубированных препаратов индивидуального гРА83m и композиций гРА83m+СЧ были получены аналогичные результаты. Титры антител, после иммунизации инкубированными препаратами гРА83m (группа 4, медиана титра $2,23 \times 10^6$) или гРА83m+СЧ (группа 5, медиана титра $2,21 \times 10^6$), статистически значимо не различались и были значительно выше, чем титры в контрольных группах (группы 7 и 8). В случае инкубированных препаратов также была выявлена достоверная разница между титрами антител к гРА83m в группе гРА83m+СЧ (группа 5, медиана титра $2,21 \times 10^6$) и гРА83m+Al(OH)₃ (группа 6, медиана титра $2,16 \times 10^5$) (тест Краскелла-Уоллиса с апостериорным сравнением Данна всех групп со всеми) (Фиг. 7). У животных иммунизированных препаратом гРА83m+Al(OH)₃, подвергшимся инкубации при +37°C в течение 27 дней, титры антител оказались в 10 раз ниже, чем у животных иммунизированных препаратом гРА83m+СЧ, подвергшимся инкубации в аналогичных условиях. Достоверной разницы между титрами сывороток в группе 6 (гРА83m+Al(OH)₃) и в контрольных группах 7 или 8, при множественном сравнении обнаружено не было. Попарное сравнение с помощью теста Уилкоксона-Манна-Уитни не показало статистически значимого изменения титров IgG, вырабатываемыми после иммунизации инкубированными препаратами гРА83m или гРА83m+СЧ по сравнению с соответствующими интактными препаратами. Тем не менее, следует отметить, что в случае иммунизации инкубированными препаратами дисперсия титров сывороток к гРА83m была значительно меньше в группе 5 (гРА83m+

СЧ), чем в группе 4 (rPA83m в отсутствии СЧ) (F-test p-value = 0.0033).

Для интактного и инкубированного препаратов rPA83m+Al(OH)₃ парное сравнение с помощью теста Уилкоксона-Манна-Уитни выявило значительное снижение титров антител, в случае иммунизации препаратом, хранившимся при +37°C. Медиана значений титров антител к rPA83m в сыворотках животных после иммунизации инкубированным препаратом была в 5,65 раз ниже. Показанная низкая иммуногенность препарата rPA83m+Al(OH)₃, наряду с ранее продемонстрированным негативным влиянием Al(OH)₃ на стабильность rPA (Wagner et al., 2012), позволяют предположить, что гидроксид алюминия не является оптимальным для вакцины, содержащей rPA83m.

Таким образом, продемонстрировано, что препараты rPA83m+СЧ и rPA83m индуцируют высокие титры антител к антигену сибирской язвы, а и их иммуногенность не снижается даже после хранения при +37°C в течение как минимум 27 дней (условия ускоренного старения). Титры антител в сыворотках крови животных после иммунизации rPA83m+СЧ значительно превосходят титры, индуцируемые препаратом rPA83m в смеси с гидроксидом алюминия после хранения препаратов в аналогичных условиях.

Сыворотки, полученные после иммунизации животных, были также проанализированы методом ИФА с целью выяснения соотношения титров антител, вырабатываемых на целевой антиген - rPA83m и на СЧ (Фиг. 8). ИФА проводили аналогичным образом, в качестве антигена использовали rPA83m и СЧ в концентрации 10 мкг/мл. Показано, что титры антител к целевому антигену были в 150 раз и в 94 раза выше, чем к СЧ, при иммунизации интактными (группа 2) (Фиг. 8 А) и инкубированными (группа 5) (Фиг. 8 Б) препаратами rPA83m+СЧ соответственно. Таким образом, продемонстрировано, что большая часть антител вырабатывается на антиген rPA83m, а не на СЧ. Это подтверждает перспективность применения СЧ для презентации антигена rPA83m и в качестве стабилизирующего компонента при хранении в составе кандидатной вакцины против сибирской язвы.

Помимо этого, для каждой из групп 1-7 было проведено сравнение изменения среднего веса с подобным изменением, наблюдаемым в контрольной группе 8 (PBS) (Фиг. 9). Исходя из графиков, представленных на фигуре 9 видно, что введение всех вышеописанных препаратов не оказывает существенного влияния на динамику веса лабораторных животных. Все животные из экспериментальных групп в течение эксперимента прибавляли в весе аналогично животным, которым вводился фосфатно-буферный раствор. Данный факт свидетельствует в пользу отсутствия токсичности вакцинных композиций и их компонентов, что также остаётся неизменным даже после хранения при +37°C как минимум в течение 27 дней.

Пример 5

Вакцинная композиция rPA83m+СЧ защищает морских свинок от заражения полностью вирулентным штаммом *Bacillus anthracis* 81/1, при этом значимого снижения протективности не происходит даже после хранения препарата при +37°C

Протективная эффективность кандидатного вакцинного препарата rPA83m+СЧ была исследована на морских свинках, которые являются общепринятой моделью для оценки эффективности вакцин против сибирской язвы и рекомендованы Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США для оценки потенциала таких вакцин (21 CFR 620.23). Для заражения животных был использован высоковирулентный штамм *Bacillus anthracis* 81/1, содержащий обе плазмиды вирулентности pXO1+ и pXO2+.

Изучение протективности проводили на морских свинках, иммунизированных дважды с интервалом 28 дней в рамках того же эксперимента, в котором изучалась иммуногенность. Исследование включало шесть экспериментальных групп (группы 1-

6) и две контрольных (группы 7 и 8). Подробное описание групп животных, состав препаратов для иммунизации и схема иммунизации представлены на фигуре 6 и подробно описаны в примере 5. Заражение животных в экспериментальных и контрольных группах проводили через 21 день после второй иммунизации путем подкожного введения 2 500 спор на животное. Показано, что через 20 дней после первого заражения уровень смертности был низким и не превышал 10% в группах, иммунизированных интактными препаратами (группы 1-3), 20% в группах, иммунизированных инкубированными препаратами (группы 4-6) и не превышал 40% в контрольных группах (7-8). Для сравнения различий в выживаемости между различными группами использовали тест Гехана-Бреслоу-Уилкоксона с поправкой Холма-Бонферрони на нежественные сравнения. Для проведения статистического анализа данные по выживаемости в контрольных группах 7 и 8 были объединены. Статистическая обработка результатов и построение графиков проводилось с помощью программы GraphPadPrism 9.1.0 (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, США). Не было обнаружено статистических различий в выживаемости между любой из групп морских свинок, иммунизированной интактными или инкубированными препаратами гРА83m (группы 1, 4), гРА83m+СЧ (группы 2, 5), и гРА83m+Al(OH)₃ (группы 3, 6) и контролем.

В связи с этим, второе заражение спорами было проведено через 20 дней после первого заражения. Все выжившие морские свинки (группа 1 - все, группа 2 - все, группа 3 - 8, группа 4 - все, группа 5 - 9, группа 6 - 9, группа 7 - 4, группа 8 - 3) были подвергнуты повторному заражению тем же штаммом в десятикратно увеличенной дозе (25 000 спор на животное). После повторного заражения наблюдение за животными проводили в течение 20 дней. Кривые выживаемости морских свинок в каждой из групп представлены на фигуре 10. Статистический анализ достоверности различий в выживаемости животных в разных группах проводили аналогично анализу после первого заражения, в качестве группы отрицательного контроля использовали объединённые данные для групп 7 и 8. Согласно результатам статистического анализа, выживаемость морских свинок в группах, иммунизированных индивидуальным гРА83m (группа 1) или композициями гРА83m+СЧ (группа 2) были значительно выше, чем выживаемость морских свинок в объединённой контрольной группе. В то же время, не было выявлено статистически значимых различий в выживаемости морских свинок, иммунизированных гРА83m+Al(OH)₃ (группа 3), и в контрольной группе. Более того, выживаемость морских свинок в группе 2 была значительно выше, чем у морских свинок в группе 3. То есть протективность вакцины гРА83m+СЧ значительно превышает протективность смеси гРА83m с гидроксидом алюминия.

Сравнение выживаемости морских свинок после иммунизации неинкубированным и инкубированным препаратом гРА83m не выявило существенных различий между показателями выживаемости в группах 1 и 4, группах 2 и 5, или групп 3 и 6. То есть высокий протективный потенциал предложенного вакцинного препарата сохраняется даже после инкубации при +37°C как минимум в течение 27 дней.

Литература

Ссылки на патенты:

1. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Архипенко М.В., Чирков С.Н. Новый тип частиц-носителей (платформ) для получения активных комплексов // RU patent № 2441667C1, 10.02.2012.

2. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Чирков С.Н., Шевелева А.А. Иммуногенная композиция, содержащая чужеродные антигены на поверхности сферических носителей, полученных при термической

денатурации спиральных вирусов // RU patent № 2440140C1, 20.01.2012.

3. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Чирков С.Н., Шевелева А.А. Способ усиления иммунного ответа // RU patent № 2442604C1, 20.02.2012.

5 4. Грановский Д.Л., Евтушенко Е.А., Иванов П.И., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Кондакова О.А., Никитин Н.А., Рябчевская Е.М. Стабильный рекомбинантный протективный антиген для вакцины против сибирской язвы // RU patent № 2789418C1, 02.02.2023.

10 5. Летаров А.В., Эпова Е.Ю., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Иванов П.А., Трифан В.Н., Мельник Н.В., Лайпанов Б.К., Белякова А.В., Леонович О.А., Бирюкова Ю.К., Зылькова М.В., Самуйлеко А.Я. ДНК-конструкция, кодирующая модифицированный вариант протективного антигена *Bacillus anthracis* // RU Patent №2622085C2, 09.06.2017.

15 6. Садовой Н.В., Кравец И.Д., Селиваненко Г.М., Харечко Г.С., Садовая Е.А., Васильев П.Г., Литусов Н.В., Елагин Г.Д., Супотницкий М.В. Вакцина сибиреязвенная комбинированная // RU Patent № 2115433C1, 20.07.1998.

7. Baillie L. W. J. Salmonella based oral vaccines for anthrax // US Patent № 7947268B2, 24.05.2011.

8. Bhatnagar R., Gupta P., Batra S., Chauhan V., Singh A., Ahuja N., Kumar P. A process for the preparation of a non-toxic anthrax vaccine // WO Patent № 2003048390A1, 12.06.2003.

20 9. Pichichero M. E., Zeng M. N-fragment of edema factor as an antigen for immunization against anthrax // WO Patent № 2007011411A2, 25.01.2007.

10. Shiloach J., Leppla S., Ramirez D., Schneerson R., Robbins J. Methods for preparing bacillus anthracis protective antigen for use in vaccines // US Patent № 20040076638A1, 22.04.2004.

25 11. 梁旭东, 朱进, 卢金星. Bivalent anthrax vaccine // CN patent №105749265B, 27.03.2020.

12. 梁旭东, 朱进, 卢金星. Nontoxic anthrax live vaccine and nontoxic anthrax strain// CN patent №105797148B, 14.01.2020.

Непатентная литература:

30 13. Микшис Н.И., Попова П.Ю., Семакова А.П. и Кутырев В.В. Лицензированные сибиреязвенные вакцины и экспериментальные препараты на стадии клинических исследований // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. № 4. С. 112-126.

35 14. Панина А.А., Алиев Т.К., Топорова В.А., Шемчукова О.Б., Бикетов С.Ф., Долгих Д.А., Свешников П.Г. Нейтрализующие антитела против компонентов экзотоксина *Bacillus anthracis* // Тезисы докладов V Российского симпозиума «Белки и пептиды». 2011. С. 80.

40 15. Aloni-Grinstein, R., Gat, O., Altboum, Z., Velan, B., Cohen, S., Shafferman, A. Oral spore vaccine based on live attenuated nontoxinogenic *Bacillus anthracis* expressing recombinant mutant protective antigen // Infection and immunity. 2005. V. 73. № 7. P. 4043-4053.

16. Bruckman M., Randolph L., VanMeter A., Hern S., Shoffstall A., Taurog R., Steinmetz N.F. Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and-spheres in mice // Virology. 2014a. V. 449. P. 163-173.

45 17. Campbell J. D., Clement K.H., Wasserman S.A., Donegan S., Chrisley L., Kotloff, K. L. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a recombinant protective antigen anthrax vaccine given to healthy adults // Human vaccines. 2007. V. 3. № 5. P. 205-211.

18. Clement K.H., Rudge T.L. Jr., Mayfield H.J., Carlton L.A., Hester A., Niemuth N.A., Sabourin C.L., Brys A.M., Quinn C.P. Vaccination of rhesus macaques with the anthrax vaccine

adsorbed vaccine produces a serum antibody response that effectively neutralizes receptor-bound protective antigen in vitro // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010. V. 17. № 11. P. 1753-1762.

19. Collier R.J., Young J. A.T. Anthrax toxin // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003. V. 19. № 1. P. 45-70.

5 20. D'Souza A.J.M., Mar K.D., Huang J., Majumdar S., Ford B.M., Dyas B., Ulrich R.G., Sullivan V.J. Rapid deamidation of recombinant protective antigen when adsorbed on aluminum hydroxide gel correlates with reduced potency of vaccine // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2013. V. 102. № 2. P. 454-461.

21. Duc L.H., Hong H.A., Atkins H.S., Flick-Smith H.S., Durrami Z., Pijkema S., Titball R.W.,
10 Cutting S.M. Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen // *Vaccine*. 2007. P. 25. № 2. P. 346-355.

22. Dumas E.K., Garman L., Cuthberston H., Charlton S., Hallis B., Engler R.J.M., Choudhari S., Picking W.D., James J.A., Farris A.D. Lethal factor antibodies contribute to lethal toxin neutralization in recipients of anthrax vaccine precipitated // *Vaccine*. 2017a. V. 35. № 26. P.
15 3416-3422.

23. Dumas E.K., Gross T., Larabee J., Pate L., Cuthberston H., Charlton S., Hallis B., Engler R.J.M., Collins L.C. Jr., Spooner C.E., Chen H., Ballard J., James J.A., Farris A.D. Anthrax vaccine precipitated induces edema toxin-neutralizing, edema factor-specific antibodies in human recipients // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2017b. V. 24. № 11.

24. Flick-Smith H.C., Walker N.J., Gibson P., Bullifent H., Hayward S., Miller J., Titball R.W.,
20 Williamson E.D. A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection // *Infection and immunity*. 2002. V. 70. № 3. P. 1653-1656.

25. Galen J.E., Chinchilla M., Pasetti M.F., Wang J.Y., Zhao L., Arciniegua-Martinez I., Silverman
25 D.J., Levine M.M. Mucosal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing protective antigen of 88 anthrax toxin (PA83) primes monkeys for accelerated serum antibody responses to parenteral PA83 vaccine // *The Journal of Infectious Diseases*. 2009. V. 199. P. 326-335.

26. Gorse G.J., Keitel W., Keyserling H., Taylor D.N., Lock M., Alves K., Kenner J., Deans
30 L., Gurwith M. Immunogenicity and tolerance of ascending doses of a recombinant protective antigen (rPA102) anthrax vaccine: a randomized, double-blinded, controlled, multicenter trial // *Vaccine*. 2006. V. 24. №. 33- 34. P. 5950-5959.

27. Hermanson G., Whitlow V., Parker S., Tonsky K., Rusalov D., Ferrari M., Lalor P., Komai M., Mere R., Bell M., Brenneman K., Mateczun A., Evans T., Kasslow D., Galloway D., Hobart
35 P. A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. V. 101. № 37. P. 13601-13606.

28. Kang C.K., Kim N.H., Kim C.J., Rhie G.E., Jo S. K., Ahn M., Kang J., Choe P.G., Park W.B., Kim N.-J., Oh, M. D. Immunogenicity and safety of a novel recombinant protective antigen
40 anthrax vaccine (GC1109), a randomized, single-blind, placebo controlled phase II clinical study // *Vaccine*. 2019. V. 37. №. 29. P. 3820-3824.

29. Kofta W., Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages // *Veterinary parasitology*. 2001. V. 100. № 1-2. P. 3-12.

30. Kondakova O.A., Nikitin N.A., Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Atabekov J.G.,
45 Karpova, O.V. Vaccines against anthrax based on recombinant protective antigen: problems and solutions // *Expert review of vaccines*. 2019. V. 18. №. 8. P.813-828.

31. Krishnan V., Andersen B.H., Shoemaker C., Sivko G.S., Tordoff K.P., Stark G.V., Zhang J., Feng T., Duchars M., Roberts M.S. Efficacy and immunogenicity of single-dose AdVAV

intranasal anthrax vaccine compared to anthrax vaccine absorbed in an aerosolized spore rabbit challenge model // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2015. V. 22. № 4. P. 430-439.

32. Little S.F., Ivins B.E., Fellows P.F., Friedlander A.M. Passive protection by polyclonal antibodies against *Bacillus anthracis* infection in guinea pigs // *Infection and Immunity*. 1997. V. 65. P. 5171-5175.

33. Malik A., Gupta M., Mani R., Gogoi H., Bhatnagar R. Trimethyl Chitosan Nanoparticles Encapsulated Protective Antigen Protects the Mice Against Anthrax // *Frontiers in Immunology*. 2018. V. 9. P. 562.

34. Manish M., Bhatnagar R., Singh S. Preparation and Characterization of PLGA Encapsulated Protective Antigen Domain 4 Nanoformulation // *Methods in Molecular Biology*. 2016. V. 1404. P. 669-681.

35. Manish M., Rahi A., Kaur M., Bhatnagar R., Singh S. A single-dose PLGA encapsulated protective antigen domain 4 nanoformulation protects mice against *Bacillus anthracis* spore challenge // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. P. 61885.

36. McComb R.C., Martchenko M. Neutralizing antibody and functional mapping of *Bacillus anthracis* protective antigen-the first step toward a rationally designed anthrax vaccine // *Vaccine*. 2016. V. 34. № 1. P. 13-19.

37. Modi T., Gervais D., Smith, S., Miller J., Subramaniam S., Thalassinou K., Shepherd A. Characterization of the UK anthrax vaccine and human immunogenicity // *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2021. V. 17. № 3. P. 747-758.

38. Mohamadzadeh M., Duong T., Sandwick S. J., Hoover, T., Klaenhammer T.R. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. V. 106. № 11. P. 4331-4336.

39. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018a. V. 97. P. 127-133.

40. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Yurkova M.S., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment // *Data in Brief*. 2018b. V. 21. P. 1504-1507.

41. Peachman K.K., Li Q., Matyas G.R., Shivachandra S.B., Lovchik J., Lyons R.C., Alving C.R., Rao V.B., Rao M. Anthrax vaccine antigen-adjuvant formulations completely protect New Zealand white rabbits against challenge with *Bacillus anthracis* Ames strain spores // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. V. 19. № 1. P. 11-16.

42. Petersen L.K., Phanse Y., Ramer-Tait A.E., Wannemuehler M.J., Narasimhan B. Amphiphilic polyanhydride nanoparticles stabilize *Bacillus anthracis* protective antigen // *Molecular Pharmaceutics*. 2012. V. 9. № 4. P. 874-882.

43. Powell B.S., Enama J.T., Ribot W.J., Webster W., Little S., Hoover T., Adamovicz J.J., Andrews G.P. Multiple asparagine deamidation of *Bacillus anthracis* protective antigen causes charge isoforms whose complexity correlates with reduced biological activity // *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007. V. 68. № 2. P. 458-479.

44. Ramirez D.M., Leppla S.H., Schneerson R., Shiloach J. Production, recovery and immunogenicity of the protective antigen from a recombinant strain of *Bacillus anthracis* // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002. V. 28. № 4. P. 232-238.

45. Read T.D., Peterson S.N., Tourasse, N., Baillie L.W., Paulsen I.T., Nelson K.E., Tettelin H., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill S.R., Holtzapple E.K., Okstad O.A., Helgason E., Rilstone J., Wu M., Kolonay J.F., Beanan M.J., Dodson R.J., Brinkac L.M., Gwinn M., DeBoy R.T., Madpu R.,

- Daugherty S.C., Durkin A.S., Haft D.H., Nelson W.C., Peterson J.D., Pop M., Khouri H.M., Radune D., Benton J.L., Mahamoud Y., Jiang L., Hance I.R., Weidman J.F., 94 Berry K.J., Plaut R.D., Wolf A.M., Watkins K.L., Nierman W.C., Hazen A., Cline R., Redmond C., Thwaite J.E., White O., Salzberg S.L., Thomason B., Frieland A.M., Koehler T.M., Hanna P.C., Kolsto A.-
 5 B., Fraser C.M. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria // *Nature*. 2003. V. 423. № 6935. P. 81-86.
46. Ryabchevskaya E.M., Granovskiy D.L., Evtushenko E.A., Ivanov P.A., Kondakova O.A., Nikitin N.A., Karpova O.V. Designing stable *Bacillus anthracis* antigens with a view to recombinant anthrax vaccine development // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. № 4. P. 806.
- 10 47. Sternbach G. The history of anthrax // *The Journal of emergency medicine*. 2003. V. 24. № 4. P. 463-467.
48. Taft S.C., Weiss A.A. Neutralizing activity of vaccine-induced antibodies to two *Bacillus anthracis* toxin components, lethal factor and edema factor // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008. V. 15. № 1. P. 71-75.
- 15 49. Turnbull P.C.B. Introduction: anthrax history, disease and ecology // *Anthrax*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2002. P. 1-19.
50. Verma A., Burns D.L. Improving the stability of recombinant anthrax protective antigen vaccine // *Vaccine*. 2018. V. 36. № 43. P. 6379-6382.
51. Wagner L., Verma A., Meade B.D., Reiter K., Narum D.L., Brafy R.A., Little S.F., Burns
 20 D.L. Structural and immunological analysis of anthrax recombinant protective antigen adsorbed to aluminum hydroxide adjuvant // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. V. 19. №. 9. P. 1465-1473.
52. WHO (World Health Organization) Information sheet observed rate of vaccine reactions anthrax vaccines to humans. 2012. [Электронный ресурс] URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/pvg/global-vaccine-safety/anthrax-vaccine-rates-information-sheet.pdf?sfvrsn=984c7d5_4&download=true (дата обращения 15.02.2023).
- 25 53. Zomber G., Reuveny S., Garti N., Shafferman A., Elhanany E. Effects of spontaneous deamidation on the cytotoxic activity of the *Bacillus anthracis* protective antigen // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. V. 280. № 48. P. 39897-39906.

30

(57) Формула изобретения

1. Вакцина для профилактики сибирской язвы, включающая: 1) rPA83m - модифицированный рекомбинантный протективный антиген *Bacillus anthracis* в концентрации $0,1 \pm 0,05$ мг/мл и 2) структурно-модифицированные частицы, образующиеся
 35 при нагревании вируса табачной мозаики (ВТМ); взятые в массовом соотношении частицы:антиген - 1:10 с допустимым отклонением от указанного соотношения 15% и 3) фосфатно-солевой буфер с pH 7,2-7,6.

2. Вакцина по п. 1, характеризующаяся тем, что модифицированный рекомбинантный протективный антиген *Bacillus anthracis* содержит мутации, повышающие его
 40 стабильность: замена $^{164}\text{NSRKKR}^{167}$ на $^{164}\text{QSSNKE}^{167}$, делеция $^{313}\text{FF}^{314}$ и замена Asn^{713} и Asn^{719} на остатки глутамина.

3. Способ получения вакцины по п. 1, включающий следующие этапы: 1) получают структурно-модифицированные частицы путём двукратной инкубации водного раствора
 45 вируса табачной мозаики с концентрацией 1-2 мг/мл при температуре $98 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение $10 \pm 0,5$ минут с последующим охлаждением при $+4^\circ\text{C}$ в течение 5-10 минут и перемешиванием после каждого нагревания с получением частиц размером 300-600 нм; 2) получение в культуре клеток *E. coli* рекомбинантного белка-антигена сибирской язвы rPA83m, аминокислотная последовательность которого отличается от

последовательности нативного протективного антигена *Bacillus anthracis* наличием последовательности MRGSHHHHHHGS на N-конце белка, что необходимо для обеспечения возможности его хроматографической очистки, и следующими модификациями, повышающими его стабильность: замена ¹⁶⁴NSRKKR¹⁶⁷ на ¹⁶⁴QSSNKE¹⁶⁷, делеция ³¹³FF³¹⁴ и замена Asn713 и Asn719 на Gln713 и Gln719; 3) смешение полученных СЧ и гРА83m в массовом соотношении 10:1 с допустимым отклонением от указанного соотношения до 15% в фосфатно-солевом буфере с рН 7,2-7,6, при этом концентрация гРА83m в составе вакцинной композиции составляет 0,1±0,05 мг/мл.

10

15

20

25

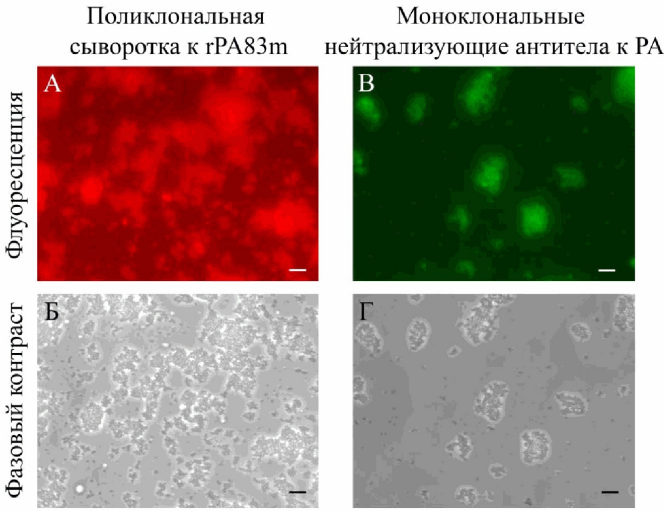
30

35

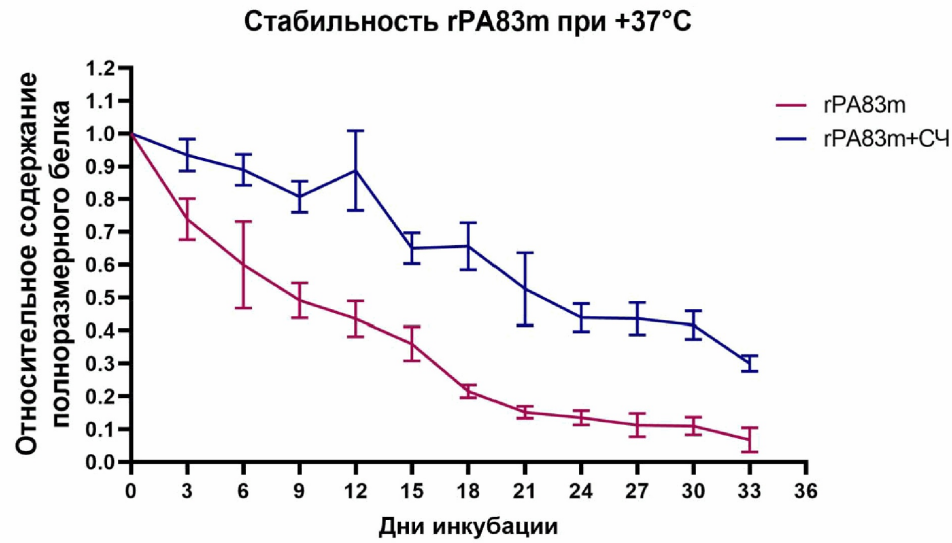
40

45

1

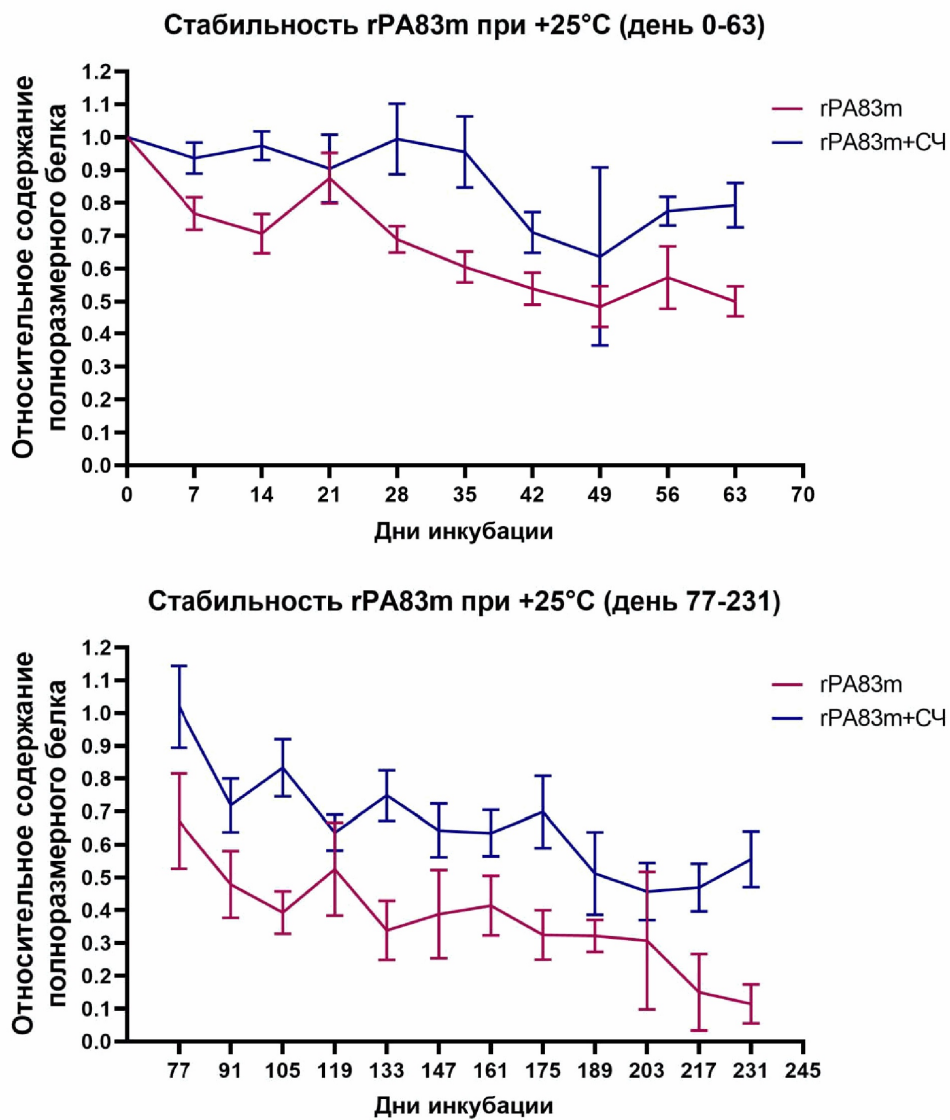


Фиг. 1

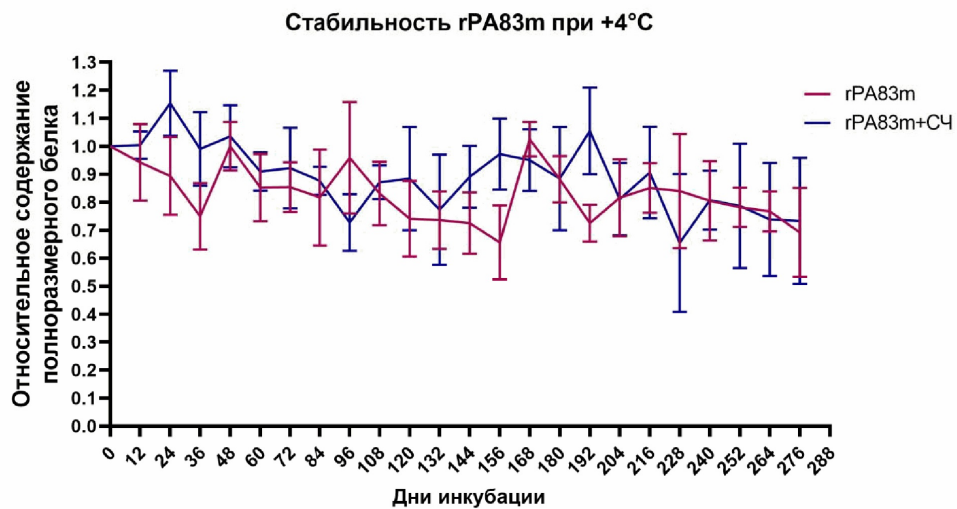


Фиг. 2

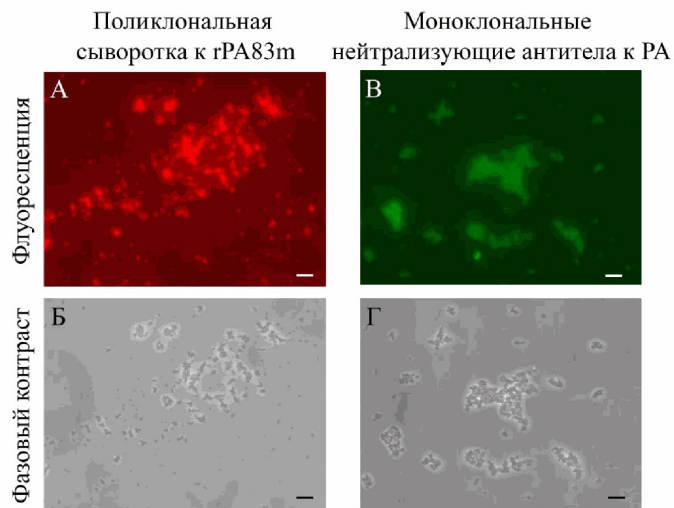
2



Фиг. 3



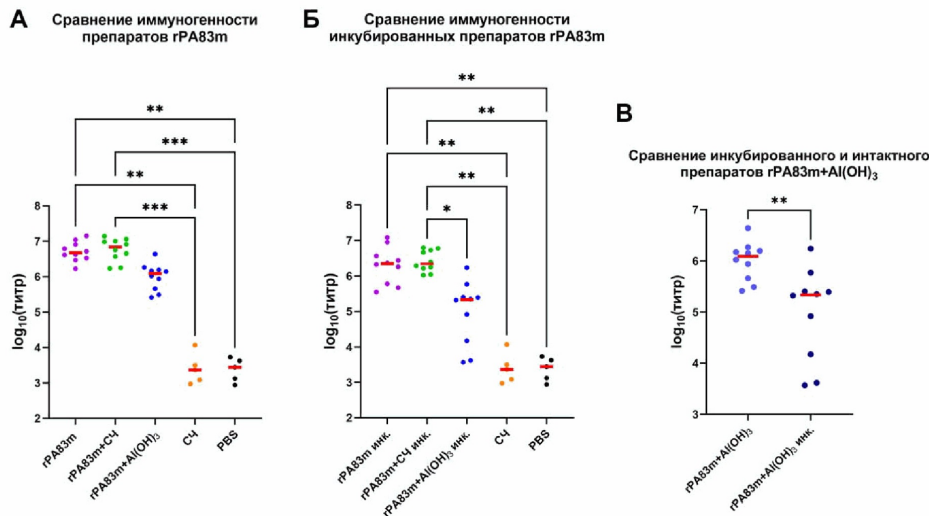
Фиг. 4



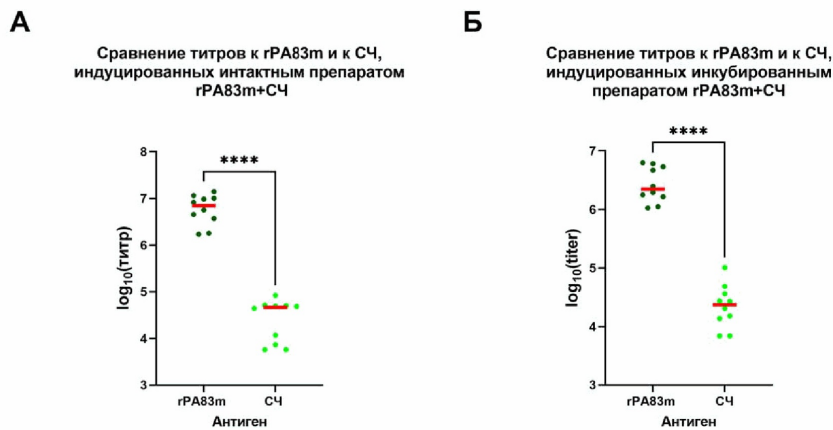
Фиг. 5



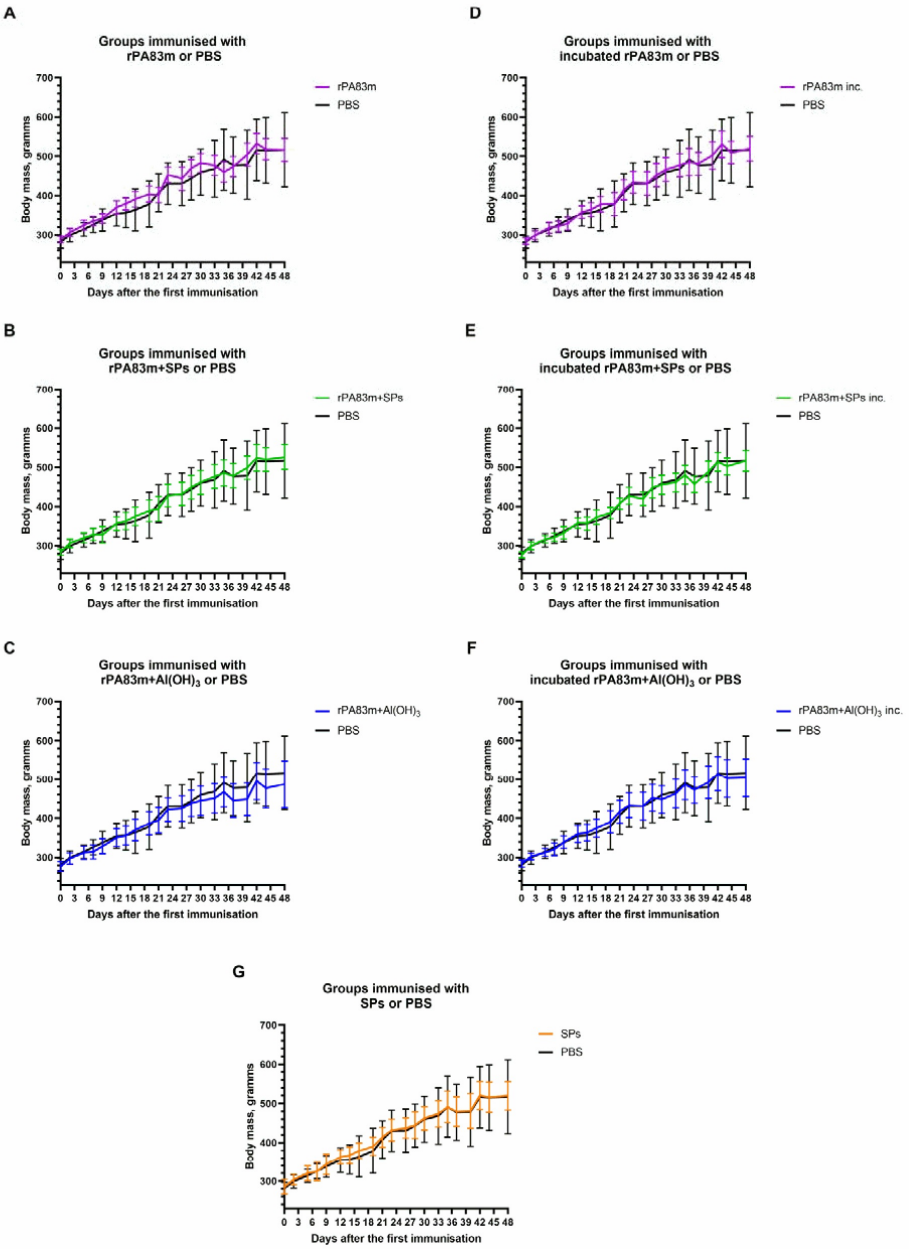
Фиг. 6

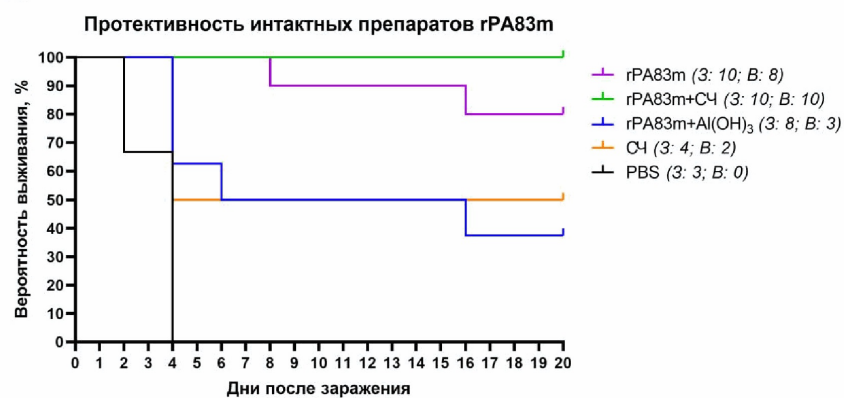
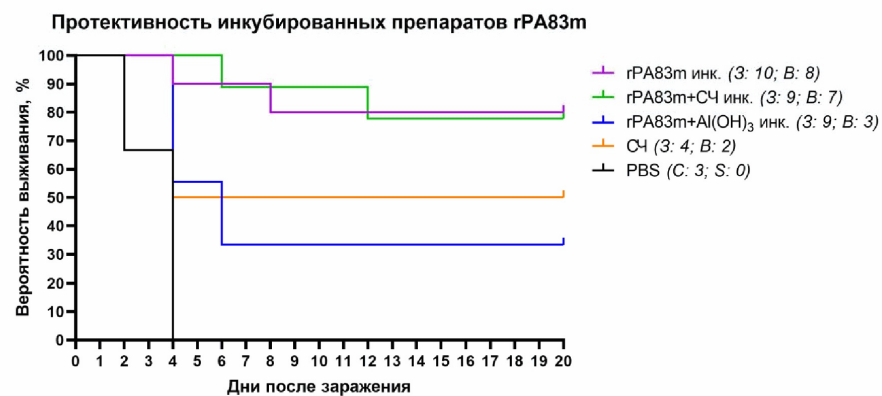


Фиг. 7



Фиг. 8



А**Б**

Фиг. 10