



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112297** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)**A61K 39/04** (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)**C12R 1/32** (2006.01)**A61P 43/00**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2013 03087	(74) Представник:	Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190
(22) Дата подання заявки:	16.09.2011	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 9910496 A1, 04.03. 1999 Kaufmann She: "Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response", Journal of internal medicine, vol. 267, no. 4, April 2010, pages 337-353 Kaufmann Stefan H E: "Learning from natural infection for rational tuberculosis vaccine design From basic science to translational research", Human vaccines, vol. 6, no. 8, August 2010, pages 614-618 Eisele et al.: "Induction of antigen specific multifunctional T cells after vaccination with the live recombinant tuberculosis vaccine VPM1002 in a Phase I clinical trial", 2 June 2010, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.egms.de/static/en/meetings/
kit2010/10kit018.shtml">http://www.egms.de/static/en/meetings/ kit2010/10kit018.shtml [retrieved on 2011-12- 09] WO 2006045468 A1, 04.05.2006 Okada Masaji et al: "Tuberculosis vaccine development The development of novel (preclinical) DNA vaccine", Human Vaccines, vol. 6, no. 4, April 2010, pages 297-308 Grode L et al: "Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin", Journal of Clinical Investigation, vol. 115, no. 9, 1 September 2005, pages 2472-2479 WO 2004094469 A1, 04.11.2004 Hannes Schlender: "Novel tuberculosis vaccine in Germany in clinical phase", 11 September 2008, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.eurekaalert.org/pub_releases/2008-
09/haog-ntv091108.php">http://www.eurekaalert.org/pub_releases/2008- 09/haog-ntv091108.php [retrieved on 2011-12- 09]
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.08.2016		
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/384,375		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	20.09.2010		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	27.05.2013, Бюл.№ 10		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.08.2016, Бюл.№ 16		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2011/066131, 16.09.2011		
(72) Винахідник(и): Гроде Леандер (DE)			
(73) Власник(и): ВАКЦІНЕ ПРОЕКТ МАНАГЕМЕНТ ГМБХ, Mellendorfer Strasse 9, 30625 Hannover, Germany (DE)			

(54) РЕКОМБІНАНТНА МІКОБАКТЕРІЯ ЯК ВАКЦИНА ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ НА ЛЮДЯХ**(57)** Реферат:

UA 112297 C2

Винахід стосується вакцини проти туберкульозу для застосування на людях, що містить як активний інгредієнт рекомбінантну клітину бактерій *Mycobacterium*, яка є уреаза-дефіцитною і яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує гібридний поліпептид, який містить (a) антиген бактерій *Mycobacterium*, який містить пептидну послідовність, яка кодується нуклеотидами 121-153 послідовності SEQ ID NO: 1, причому цим антигеном бактерій *Mycobacterium* є Ag85B, або його імуногенний фрагмент, і (b) домен виходу з фаголізосоми, який містить пептидну послідовність, яка кодується нуклеотидами 211-1722 послідовності SEQ ID NO: 1, причому рекомбінантна клітина бактерій *Mycobacterium* являє собою рекомбінантну клітину бактерій *Mycobacterium bovis* датського штаму підтипу Prague, яка не несе гена стійкості до антибіотиків.

Винахід стосується нової рекомбінантної вакцини, що забезпечує захисний імунітет, зокрема, проти туберкульозу, у людей.

У 1993 році Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) оголосила стан із захворюванням на туберкульоз (ТБ) глобальною надзвичайною ситуацією. У світі приблизно 2 мільярди людей інфіковані *Mycobacterium tuberculosis*, патогенним мікроорганізмом, що спричинює туберкульоз [1, 2]. Для усіх існує підвищений ризик розвитку клінічних симптомів захворювання. У більшості людей зараження *Mycobacterium tuberculosis* спочатку стримується захисними силами організму, і згадане зараження залишається прихованим. Тим не менш, приховане зараження туберкульозом здатне до перетворення на активну форму туберкульозу в будь-який час, і особи з активною формою туберкульозу стають джерелами нових інфекцій. В доповіді ВООЗ (2009) повідомлялось про 9,3 мільйона нових випадків захворювання у 2007 році, і цей показник постійно зростає [1]. Щороку від цієї хвороби вмирає близько 1,8 мільйона людей. Таким чином, туберкульоз продовжує залишатися провідною причиною смерті від інфекційних захворювань по всьому світу.

BCG (БЦЖ, бацила Кальметта-Герена), атенуований штам *Mycobacterium bovis*, застосовується як протитуберкульозна вакцина з 1921 року. На сьогоднішній день було введено близько 4 мільярдів доз [3]. Тим не менш, вакцинація БЦЖ є недостатньо ефективною щоб зупинити поширення туберкульозу. БЦЖ може захистити проти (або принаймні зменшити інтенсивність симптомів) важких форм системного туберкульозу у дітей, зокрема менінгіту. БЦЖ не захищає від легеневих та інфекційних форм вказаної хвороби [4]. Це, однак, було б необхідним для припинення передачі хвороби.

Доступними є лише декілька методів антибіотичної терапії. Вони все частіше виявляються неефективними, оскільки все більше і більше пацієнтів інфікуються штамми туберкульозної палички, що мають стійкість до багатьох лікарських засобів [1, 5]. Ситуацію ще більше погіршує розповсюдження нових високопатогенних штамів, наприклад, пекінського штаму *Mycobacterium tuberculosis* (Beijing/W) [6].

Метою цього винаходу є створення безпечної, добре переносної і ефективної вакцини проти туберкульозу, особливо для мешканців ендемічних районів та осіб, що належать до групи підвищеного ризику в неендемічних районах. Ця вакцина повинна замінити застосовувану на цей час вакцину БЦЖ. Нова вакцина повинна бути щонайменше такою ж сильнодіючою, як і існуючий штам, і повинна бути безпечнішою ніж БЦЖ [5, 7].

Mycobacterium tuberculosis і БЦЖ фагоцитуються макрофагами хазяїна. Спрямована міграція антигену бактерій, завдяки його внутрішньофагосомальному знаходженню, здійснюється через шлях головного комплексу гістосумісності (МНС) II. Це призводить до переважної стимуляції CD4⁺ Т-клітин. Тим не менш було показано, що МНС I-рестриковані CD8⁺ цитотоксичні Т-клітини відіграють ключову роль в імунитеті проти *Mycobacterium tuberculosis* [8, 9]. На відміну від *Mycobacterium tuberculosis*, БЦЖ індукує лише слабку стимуляцію CD8⁺ цитотоксичних Т-клітин [2, 3, 10]. У зв'язку з цим для спрямування антигенів бактерій *Mycobacterium* шляхом МНС I було створено рекомбінантний штам БЦЖ, що експресує домен виходу з фаголізосоми [2, 7]. Вказаний штам секритує лістеріолізін (Hly) *L. monocytogenes* [7, 11]. Це надає можливість згаданому штаму ухилятися від фагосом інфікованих клітин-хазяїв шляхом перфорації мембрани фагосоми. Інактивація гена уреазы С була необхідною для забезпечення кислого фагосомального значення рН для оптимальної активності Hly. Перфорація сприяє переміщенню антигена у цитоплазму і полегшує перехресне приміювання через підвищений апоптоз [7, 9]. Цей процес дуже ефективно імітує індукцію імунітету *Mycobacterium tuberculosis*. Згаданий механізм дії, як очікується, уможливить створення ефективною і добре переносною вакцини проти туберкульозу.

Ця ідея була описана в WO99/101496 та в WO 2004/094469, вміст яких включено до цього опису шляхом посилання.

У цьому дослідженні рекомбінантна уреаза-дефіцитна вакцина БЦЖ була вперше застосована на людях. Це дослідження проводили з метою оцінки безпечності, місцевої та системної переносності, а також імуногенності вакцини. Вказане дослідження проводили за планом послідовного підвищення доз у порівнянні з наявною у продажу БЦЖ. Вісімдесят (80) суб'єктів в Німеччині були довільним чином розподілені на 4 групи, кожна з яких складається з 20 людей, з розшаруванням відповідно до анамнезу БЦЖ-вакцинації.

На додаток до стандартного моніторингу безпечності, здійснювали інтенсивний моніторинг безпечності, що включав лабораторні показники, оцінку фізичної безпечності і докладний аналіз ЕКГ.

Предметом цього винаходу є вакцина для застосування на людях, що містить як активний інгредієнт рекомбінантну бактерію *Mycobacterium*, яка є уреаза-дефіцитною і яка містить

молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує гібридний поліпептид, який містить (a) антиген бактерій *Mycobacterium* або його імуногенний фрагмент, і (b) домен виходу з фаголізосоми.

5 Ще одним предметом цього винаходу є спосіб вакцинації людини, який включає введення фармацевтично ефективної дози рекомбінантної бактерії *Mycobacterium*, яка є уреаза-дефіцитною і яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує гібридний поліпептид, який містить (a) антиген бактерій *Mycobacterium* або його імуногенний фрагмент, і (b) домен виходу з фаголізосоми.

10 За варіантом здійснення, якому віддають особливу перевагу, послідовність *ureC* є інактивованою ($\Delta Urec$), наприклад, шляхом конструювання вектора-самогубця, що містить зруйнований геном селекційного маркера ген *ureC*, трансформації клітини-мішені вказаним вектором, і проведення скринінгу для вибору клітин, позитивних на селекційний маркер, що мають негативний з уреази фенотип [12].

15 Вказаною клітиною, за варіантом, якому віддають перевагу, є клітина *M. bovis*, клітина *M. tuberculosis*, зокрема, атенуйована клітина *M. tuberculosis* або клітина іншої бактерії *Mycobacterium*, наприклад, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. canettii*, *M. marinum* або *M. fortuitum*. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, вказана клітина являє собою рекомбінантну клітину бактерій *M. bovis* (БЦЖ), зокрема, рекомбінантну клітину бактерій *M. bovis* датського штаму підтипу Prague [13]. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, вказана клітина являє собою рекомбінантний датський штам БЦЖ підтипу Prague, що характеризується як *rBCG AUrec: Hly⁺: Hly⁺* (VPM1002).

20 Клітина бактерій *Mycobacterium* за цим винаходом містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, наприклад, молекулу нуклеїнової кислоти, представлену послідовністю SEQ ID NO: 1. Ця молекула нуклеїнової кислоти містить послідовність, що кодує сигнальний пептид (нуклеотиди 1-120), послідовність, що кодує імуногенний домен (нуклеотиди 121-153), послідовність, що кодує пептидний лінкер (нуклеотиди 154-210), послідовність, що кодує фаголізосомальний домен (нуклеотиди 211-1722), додаткову послідовність, що кодує пептидний лінкер (нуклеотиди 1723-1800) і послідовність, що кодує довільний пептид (нуклеотиди 1801-1870). Відповідна амінокислотна послідовність представлена послідовністю SEQ ID NO: 2.

30 Домен, здатний викликати імунну відповідь, вибирають з-посеред імуногенних пептидів або поліпептидів *M. bovis* чи *M. tuberculosis* або з-посеред їхніх імуногенних фрагментів, що мають у довжину щонайменше 6 амінокислот, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше 8 амінокислот. Конкретними прикладами відповідних антигенів є Ag85B (p30) *M. tuberculosis* (Harth et al., 1996), Ag85B (α -антиген) *M. bovis* БЦЖ (Matsuo et al., 1988), Ag85A *M. tuberculosis* (Huygen et al., 1996) та ESAT-6 *M. tuberculosis* (Sorensen et al., 1996, Harboe et al., 1996 і Andersen et al., 1995). За варіантом, якому віддають більшу перевагу, імуногенний домен є похідним антигену Ag85B. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, імуногенний домен містить послідовність від aa.41 до aa.51 з послідовності SEQ ID NO: 2.

40 Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти також містить домен виходу з фаголізосоми, тобто поліпептидний домен, який забезпечує вихід гібридного поліпептиду з фаголізосоми в цитозоль клітин ссавців. За варіантом, якому віддають перевагу, домен виходу з фаголізосоми являє собою домен виходу з фаголізосоми *Listeria*, опис якого наведено у патенті США № 5,733,151, який включено до цього опису шляхом посилання. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, домен виходу з фаголізосоми є похідним гена лістеріолізіну (*Hly*) *L. monocytogenes*. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, домен виходу з фаголізосоми кодується молекулою нуклеїнової кислоти, яку вибирають з-посеред: (a) нуклеотидної послідовності, що містить нуклеотиди 211-1722, як показано в послідовності SEQ ID NO: 1, (b) нуклеотидної послідовності, що кодує ту саму амінокислотну послідовність, що і послідовність з (a), і (c) нуклеотидної послідовності, що гібридується у жорстких умовах з послідовністю (a) або (b).

50 Окрім нуклеотидної послідовності, представлені послідовністю SEQ ID NO: 1, цей винахід також охоплює послідовності нуклеїнових кислот, що гібридизуються з нею. Термін "гібридизація" у цьому винаході вжитий як визначено у Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104). За цим винаходом термін "гібридизація" вжитий, якщо позитивний сигнал гібридизації все ще можна спостерігати після промивання протягом однієї години $1 \times \text{SSC}$ (розчин цитрату і хлориду натрію) і 0,1 % SDS (додецилсульфат натрію) при температурі 55 °C, за варіантом, якому віддають перевагу, при температурі 62 °C, і за варіантом, якому віддають більшу перевагу, при температурі 68 °C, зокрема, протягом 1 години $0,2 \times \text{SSC}$ і 0,1 % SDS при температурі 55 °C, за варіантом, якому віддають перевагу, при температурі 62 °C, і за варіантом, якому віддають більшу перевагу, при

температурі 68 °С. Послідовність, що гібридизується з нуклеотидною послідовністю, представленою послідовністю SEQ ID NO: 1, за таких умов промивання, являє собою нуклеотидну послідовність, що кодує домен виходу з фаголізосоми, якій віддають перевагу за цим винаходом.

5 Нуклеотидну послідовність, що кодує домен виходу з фаголізосоми, як описано вище, можна одержати безпосередньо з мікроорганізму роду *Listeria* або з будь-якого рекомбінантного джерела, наприклад, з рекомбінантної клітини *E. coli*, що містить відповідну молекулу нуклеїнової кислоти *Listeria* або її варіант, як описано вище.

10 За варіантом, якому віддають перевагу, молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує гібридний поліпептид, містить послідовність, що кодує сигнальний пептид. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, вказаною сигнальною послідовністю є сигнальна послідовність, активна в бактеріях *Mycobacteria*, за варіантом, якому віддають перевагу, в *M. bovis*, наприклад, нативна сигнальна послідовність *M. bovis*. Прикладом відповідної сигнальної послідовності, якій віддають перевагу, є нуклеотидна послідовність, що кодує

15 сигнальний пептид Ag85B, яку в послідовності SEQ ID NO: 1 представляють нуклеотиди 1-120. Крім того, бажано, щоб між імунотенним доменом і доменом виходу з фаголізосоми знаходився пептидний лінкер. За варіантом, якому віддають перевагу, вказаний пептидний лінкер має у довжину від 5 амінокислот до 50 амінокислот. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, послідовність, що кодує лінкер, представлена у послідовності SEQ ID NO: 1

20 нуклеотидами 154-210 або відповідною їй послідовністю, з урахуванням виродженості генетичного коду. Нуклеїнова кислота може бути розміщена на рекомбінантному векторі. За варіантом, якому віддають перевагу, вказаним рекомбінантним вектором є прокаріотний вектор, тобто вектор, що містить елементи для реплікації та/або геномної інтеграції в прокаріотних клітинах. За

25 варіантом, якому віддають перевагу, вказаний рекомбінантний вектор несе молекулу нуклеїнової кислоти за цим винаходом, функціонально пов'язану з послідовністю контролю експресії. Вказаною послідовністю контролю експресії за варіантом, якому віддають перевагу, є послідовність контролю експресії, активна в бактеріях *Mycobacteria*, зокрема, в *M. bovis*. Вказаний вектор може бути екстрахромосомним вектором або вектором, прийнятним для

30 інтеграції до хромосоми. Приклади таких векторів відомі фахівцям в цій галузі і наводяться, наприклад, у Sambrook et al., дивись вище.

В певних варіантах здійснення цього винаходу рекомбінантна клітина бактерій *Mycobacterium* може нести ген стійкості до антибіотиків, наприклад, ген стійкості до гігromіцину (Nug). В інших варіантах здійснення винаходу рекомбінантна клітина бактерій *Mycobacterium* не

35 несе гена стійкості до антибіотиків.

За варіантом, якому віддають перевагу, вакцина являє собою живу вакцину для застосування на людях, наприклад, для застосування на мешканцях районів, ендемічних з інфекцій бактерій *Mycobacterium*, наприклад, туберкульозу, або для застосування на особах, що належать до групи підвищеного ризику в неендемічних районах. Вакцина може бути

40 призначеною для введення суб'єкту, якому не вводили штаму бактерій *Mycobacterium*, наприклад, штаму БЦЖ, наприклад, людині, якій раніше не вводили імунотенного штаму бактерій *Mycobacterium*, або людині, яку раніше не вакцинували БЦЖ. Прикладами таких суб'єктів є, наприклад, новонароджені або діти, наприклад, віком до 8 років, наприклад, у районах, ендемічних з інфекцій бактерій *Mycobacterium*, наприклад, туберкульозу, або особи,

45 що належать до групи підвищеного ризику в неендемічних районах. Вакцина є особливо придатною для введення суб'єктам з ВІЛ-позитивними батьками, наприклад, матерями. Вакцину можна вводити суб'єктам, яким не вводили штаму бактерій *Mycobacterium*, наприклад, штаму БЦЖ, у групі населення ендемічній з ВІЛ-інфекції. За іншими варіантами здійснення вакцина може бути призначеною для введення суб'єкту, якому попередньо вводили штаму бактерій

50 *Mycobacterium*, наприклад, штаму БЦЖ, наприклад, дітям віком від 9 років або дорослим, що проживають, наприклад, у районах, ендемічних з туберкульозу, або суб'єктам, попередньо вакцинованим БЦЖ. У таких суб'єктів вакцина за цим винаходом діє як ревакцинація на вже існуючий імунний статус, індукований БЦЖ.

У ще одному варіанті здійснення, якому віддають перевагу, результатом введення вакцини є

55 підвищена гамма-інтерферонова (IFN- γ -) реакція у невакцинованих або попередньо вакцинованих суб'єктів та активація CD4⁺ Т-клітин, зокрема, поліфункціональних CD4⁺ Т-клітин.

За варіантом, якому віддають перевагу, вакцина являє собою ліофілізат, що містить клітину бактерій *Mycobacterium* і факультативно агенти, наприклад, глюкозу та/або декстран. Факультативно вакцина додатково містить відновлювальну рідину - воду для ін'єкцій або

фізіологічний розчин. За деякими прикладами здійснення, вакцина містить дозу приблизно 10^3 - 10^4 КУО (колонієутворювальних одиниць), приблизно 10^4 - 10^5 КУО або приблизно 10^5 - 10^6 КУО.

Може бути вибраним введення на поверхню слизової оболонки (наприклад, очної, інтраназальної, ротової порожнини, шлунка, кишечника, прямої кишки, вагінальної або сечовивідних шляхів) або парентеральним шляхом (наприклад, підшкірно, внутрішньошкірно, внутрішньом'язово, внутрішньовенно або внутрішньоочеревинно). Особливо переважним є внутрішньошкірне введення.

В певних варіантах здійснення цього винаходу вакцина призначена для введення однією дозою, в тому числі для імунізації суб'єктів, яким не вводили штаму бактерій *Mycobacterium*, або ревакцинацію суб'єктів, яким попередньо вводили штаму бактерій *Mycobacterium*, наприклад, суб'єктів, які були попередньо вакциновані вакциною на основі штаму бактерій *Mycobacterium*, наприклад, нативною вакциною БЦЖ для суб'єктів, які контактували з бактерією *Mycobacterium*, наприклад, патогенною бактерією *Mycobacterium* перед введенням вакцини за цим винаходом. Альтернативно вакцина за цим винаходом може вводиться двома або декількома дозами.

Відповідні дози можуть вводитись з інтервалами від приблизно 1 тижня до 6 місяців або довше. Вакцина за цим винаходом призначена для застосування проти інфекцій бактерій *Mycobacterium*, конкретніше, для застосування проти туберкульозу.

Далі винахід буде додатково проілюстрований наведеними фігурами, лістингами послідовностей та прикладами.

Фіг. 1: Співвідношення між середнім розміром еритеми у досліджуваній групі і днем дослідження.

Фіг. 2: Співвідношення між середнім розміром індурації у досліджуваній групі і днем дослідження.

Фіг. 3: Середні зміни, порівняно з вихідним рівнем, для IFN- γ -peak після стимуляції Ag85B у невакцинованих суб'єктів.

A. PBMC ELISA для IFN- γ ,

B. ELISpot,

C. Аналіз цільної крові (ELISA) на IFN- γ .

Всі аналізи були стимульовані Ag85B, 2 мкг/мл. Група VPM1002 (5×10^5) - стовпчики червоного кольору, група БЦЖ - стовпчики синього кольору.

Стимуляція: Ag 85B, 2 мкг/мл. VPM1002 посилює IFN- γ -реакцію.

Фігура 4: Середні зміни, порівняно з вихідним рівнем, для IFN- γ -реакції після стимуляції Ag85B у попередньо вакцинованих суб'єктів.

A. PBMC ELISA для IFN- γ ,

B. Аналіз цільної крові (ELISA) на IFN- γ .

Всі аналізи були стимульовані Ag85B, 2мкг/мл. Група VPM1002 (5×10^5) - стовпчики червоного кольору, група БЦЖ - стовпчики синього кольору.

Стимуляція: Ag 85B, 2 мкг/мл. VPM1002 посилює IFN- γ -реакцію.

Фігура 5: Зміна, порівняно з вихідним рівнем, одно- і поліфункціональних CD4⁺Т-клітин у невакцинованих суб'єктів.

A. Частота однофункціональних позитивних CD4⁺ Т-клітин (експресія IFN- γ), повторно стимульованих PPD.

B. Частота поліфункціональних CD4⁺ Т-клітин (експресія IFN- γ та IL-2), повторно стимульованих Ag85B.

C. Частота поліфункціональних CD4⁺ Т-клітин (експресія IFN- γ , IL-2 та TNF- α), повторно стимульованих PPD.

D. Повторно стимульовані Ag85B визначали засобами FACS ICS PBMC від дорослих, вакцинованих VPM1002 (червоний колір) або БЦЖ (синій колір).

Послідовність SEQ ID NO: 1: показує нуклеотидну послідовність молекули нуклеїнової кислоти, що кодує антиген бактерій *Mycobacterium* 85B і лістеріозний домен виходу з фаголізосоми.

Послідовність SEQ ID NO: 2: показує відповідну амінокислотну послідовність молекули нуклеїнової кислоти, представленої послідовністю SEQ ID NO: 1.

Приклад

I фаза клінічних випробувань для оцінки безпечності та імуногенності вакцини за цим винаходом (VPM1002) у порівнянні з БЦЖ на здорових чоловіках-волонтерах, поділених на групи у залежності від анамнезу БЦЖ-вакцинації.

1. Характеристика вакцини VPM 1002

VPM1002 являє собою генетично модифіковану вакцину БЦЖ, що є похідною датського штаму БЦЖ *Mycobacterium bovis* підтипу Prague, що характеризується таким чином: rBCG

DureC: Hly⁺: Hlyg⁺. VPM 1002 є доступною у вигляді ліофілізованого осаду живої *Mycobacterium bovis* BCG DureC: Hly⁺: Hlyg⁺. Один флакон містить 5×10^6 КУО (в діапазоні $2-8 \times 10^6$ КУО) VPM1002.

Ген лістеріолізіну (Hly) був включеним до гена уреазу C (ureC), що призвело до ліквідації активності уреазу C і появи активності лістеріолізіну.

VPM1002 є стійкою до гігromіцину (Hlyg). Стійкість до гігromіцину відігравала роль селекційного маркера під час генно-інженерного конструювання штаму, і буде відігравати роль специфічного маркера під час моніторингу генетично модифікованого організму (ГМО) та у процесі виявлення ГМО. VPM1002 є чутливою до антибіотиків, що традиційно використовуються при лікуванні інфекцій бактерій *Mycobacterium*, тобто до ізоніазиду, рифампіцину та етамбутолу.

VPM1002 постачається у вигляді сублімованого (ліофілізованого) осаду, який відновлюється 1 мл H₂O (вода для ін'єкцій). Концентрація після відновлення становить приблизно 5×10^6 КУО. Для введення доз 5×10^3 КУО і 5×10^4 КУО, відновлену суспензію VPM1002 розбавляють 1:100 або 1:10, відповідно, із застосуванням стерильного готового до застосування 0,9 % розчину хлориду натрію.

2. Цілі

Основною метою цього дослідження було визначення безпечності разових доз VPM1002.

Другорядною метою цього дослідження було визначення імуногенності разових доз VPM1002 для вакцинації проти туберкульозу.

3. Методологія (план дослідження):

Це було перше застосування VPM1002 на людях. Дослідження проводили за відкритим, рандомізованим, керованим планом з підвищенням дози для оцінки безпечності та імуногенності разової дози VPM1002.

Одноразовій вакцинації VPM1002 внутрішньошкірним шляхом піддавали суб'єктів, яким або раніше не вводили вакцину БЦЖ, або які були раніше вакциновані (задокументована вакцинація вакциною БЦЖ або наявність рубця після введення БЦЖ і, у обох випадках, слабопозитивна шкірна проба з очищеним білковим дериватом (PPD)). Були досліджені три зростаючі дози VPM1002. Контрольній групі суб'єктів вводили разову дозу вакцини БЦЖ.

Поствакцинальні параметри безпечності уважно відслідковували до 4 год після введення вакцини. Після цього суб'єктів відпускали з клініки, за винятком перших 3-х суб'єктів в кожній групі, що одержувала певну дозу, які залишались у клініці протягом 24 год після вакцинації.

Оцінку параметрів безпечності та фармакодинамічні дослідження проводили до 57 дня і повторили через 6 міс. після вакцинації.

Проміжний аналіз параметрів безпечності провели після одержання результатів 57 дня від перших 3 суб'єктів кожної групи. На підставі цих даних дійшли висновку, що введення VPM1002 у дозах до 5×10^5 КУО є безпечним і добре переносним. На основі вторинних кінцевих точок дослідження імуногенності була здійснена статистична переоцінка розміру вибірки. Результати цього аналізу ($p1 = 0,0119$) показали, що запланований обсяг вибірки з 80 суб'єктів, включених у дослідження, був достатнім. У розширенні обсягу вибірки необхідності не було.

4. Кількість суб'єктів

До цього дослідження планували включити сорок (40) суб'єктів, не вакцинованих БЦЖ, і 40 суб'єктів, попередньо вакцинованих БЦЖ (або PPD-позитивних). Всі 80 суб'єктів, за винятком 1 суб'єкту, який був виключений з групи пацієнтів, яка підлягала подальшому лікарському нагляду, завершили дослідження, як планувалося.

	Експериментальні групи								
	Без попередньої БЦЖ-вакцинації або PPD-негативні				З попередньою БЦЖ-вакцинацією або PPD-позитивні				
Оброблювана група	БЦЖ	Група 1	Група 2	Група 3	БЦЖ	Група 1	Група 2	Група 3	Разом
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
Кількість включених суб'єктів	10	10	10	10	10	10	10	10	80
Кількість суб'єктів, що завершили дослідження	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (90)	79 (98,8)
Кількість виключених суб'єктів	0	0	0	0	0	0	0	1 (10)	1 (1,3)
Причина									
Інші причини	-	-	-	-	-	-	-	1(10)	1 (1,3)

Обробка: БЦЖ=5×10⁵ КУО БЦЖ (2-8×10⁵),
 Група 1=5×10³ КУО VPM1002 (2-8×10³),
 Група 2=5×10⁴ КУО VPM1002 (2-8×10⁴),
 Група 3=5×10⁵ КУО VPM1002 (2-8×10⁵)

5 5. Діагноз та основні критерії для включення суб'єктів:

Здорові чоловіки у віці 18-55 років (з включенням крайніх значень), без будь-яких симптомів, фізичних ознак або лабораторних показників, що вказували б на системні порушення або поточне захворювання, і без жодних ознак активної або латентної туберкульозної інфекції (LTBI). Папула при постановці туберкулінової (PPD) проби на вихідному рівні повинна бути <10

10 мм у пацієнтів, попередньо вакцинованих БЦЖ, і < 1 мм у невакцинованих суб'єктів.

6. Експериментальний продукт, доза і спосіб введення, номер партії:

Активним інгредієнтом VPM1002 був штам *Mycobacterium bovis* rBCGΔ::ureC::Hly⁺::Hyg⁺, сублімований та стандартизований за кількістю життєздатних (колонієутворювальних одиниць (КУО)) бактерій *Mycobacterium* на застосування.

15 Дози: 5×10³ КУО VPM1002 (2-8×10³ КУО),
 5×10⁴ КУО VPM1002 (2-8×10⁴ КУО),
 5×10⁵ КУО VPM1002 (2-8×10⁵ КУО).

Приблизно 0,1 мл відновленої і розбавленої суспензії VPM1002 вводили шляхом внутрішньошкірної ін'єкції за допомогою 1 мл шприца, додатково відградуйованого у сотих частках мл (1/100 мл), спорядженого голкою з коротким зрізом (25G/0,50mm або 26G/0,45 мм, довжина 10 мм). Не дозволялось застосування безголкових ін'єкторів або мультиін'єкційного пристрою.

7. Тривалість обробки: Одноразова вакцинація.

8. Контрольна терапія, доза та спосіб введення, номер партії:

25 Вакцина БЦЖ SSI, порошок та розчинник для приготування суспензії для ін'єкцій, Statens Serum Institut, Данія. Після відновлення, 1 доза (0,1 мл) містить:

Mycobacterium bovis БЦЖ (бацила Кальметта-Герена), датський штам 1331, живий атенуований, 2-8×10⁵ КУО.

Введення здійснювали як описано для VPM1002.

30 9. Критерії оцінки: Параметри безпечності:

- частота негативних явищ, часовий профіль негативних явищ, інший профіль негативних явищ,

- оцінка місцевої реакції на місці щеплення і фотодокументування місцевої реакції на місці щеплення (дні 1, 5, 11, 29, 57, через 6 міс.),

35 - стандартні лабораторні параметри безпечності (гематологія, коагуляція, клінічна біохімія, у тому числі ферментів печінки, аналіз сечі),

- квантіфероновий (QuantIFERON) тест на вихідному рівні, на 57 день і через 6 міс.,

- об'єктивне обстеження, включаючи електрокардіограму (ЕКГ), параметри життєво важливих функцій та масу тіла,

40 - рентгенографія грудної клітини,

- ультразвукова візуалізація печінки на початковому рівні, на 57 день і через 6 міс.,

- узагальнена оцінка переносності суб'єктами.

Параметри імуногенності:

- реакція стимуляції лімфоцитів (LST): кількість гамма-інтерферону (IFN-γ)/клітину,

45 - імуноферментний спот-аналіз (ELISpot): кількість IFN-γ-секретуючих мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) на загальну кількість PBMC,

- аналізи цільної крові (WBA): кількість IFN-γ на кількість лімфоцитів,

- внутрішньоклітинне забарвлення цитокінів (ICS) (FACS (клітинний сортер зі збудженням флуоресценції)-аналіз): кількість CD4⁺ і CD8⁺ лімфоцитів, що були xxx-яскраві, xxx-яскраві і xxx-яскраві ("потрійно позитивні клітини"), на загальну кількість лімфоцитів.

50 10. Кінцеві точки дослідження:

Головна кінцева точка:

Оцінка безпечності разової дози VPM1002 за результатами об'єктивного обстеження, визначення параметрів життєво важливих функцій, ЕКГ, УЗД печінки, рентгенографії грудної клітини, лабораторних показників безпечності (в тому числі гематології, коагуляції, клінічної біохімії та аналізу сечі), переносності, реєстрації одночасно застосовуваних лікарських засобів і моніторингу негативних явищ.

Другорядні кінцеві точки: Імуногенність, оцінювана за результатами:

60 - LST туберкуліном (PPD) з подальшим IFN-γ-специфічним твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA) на супернатантах PBMC.

- ELISpot, специфічний для кількості IFN- γ -секретуючих PBMC після стимуляції PPD.
- WBA після стимуляції клітин PPD протягом 3 днів і визначення рівня IFN- γ у плазмі за допомогою ELISA.

Дослідницькі кінцеві точки: Імуногенність, оцінювана за результатами:

5 - FACS-аналізу ICS для IFN- γ , фактора некрозу пухлин (TNF)- α та інтерлейкіна (IL)-2 у CD4⁺ і CD8⁺ лімфоцитів після стимуляції PPD впродовж ночі.

- FACS-аналіз внутрішньоклітинного забарвлювання карбоксифлуоресцеїндіацетатсукцинімідиловими складними ефірами (CFSE) CD4⁺ і CD8⁺ лімфоцитів після стимуляції PPD впродовж ночі.

10 - LST, ELISpot, ICS і WBA для стимуляції сумішшю туберкульозного антигенного (TB-Ag) пептиду 85b.

- визначення концентрації сироваткових антитіл проти PPD або суміші пептиду TB-Ag85B; кількісне визначення підтипів імуноглобуліну (Ig) G цих сироваткових антитіл.

11. Статистичні методи:

15 Для оцінки параметрів безпечності була застосована описова статистика. Для визначення даних з імуногенності були застосовані такі статистичні методики випробувань:

- Критерій Джонкхієра-Терпстри ($\alpha=0,05$) для виявлення залежності "доза-відповідь" підігнаних змін в порівнянні з вихідним рівнем з повторними визначенням у зіставленні з БЦЖ-групою.

20 - Модель лінійної регресії для приведення змін відповідного параметру у порівнянні з вихідним рівнем до окремих випадків після вихідного рівня у відповідність до ймовірно визначених можливих коваріатів і кофакторів експериментального фактора (зворотний вибір).

- Оцінка ефектів обробки (зміни від вихідного рівня) із застосуванням 95 % довірчих інтервалів, як в межах груп, так і при порівнянні груп VPM1002 з групами БЦЖ.

25 - Зворотне видалення статистично незначущих коваріатів/кофакторів у моделях коректувальної регресії.

- критерій χ^2 -квадрат, t-критерій, U-критерій для дослідницьких порівнянь між двома експериментальними групами.

30 - мультиваріатна лінійна регресія замість критерію Джонкхієра-Терпстри для визначення чутливості непараметричного аналізу.

12. Узагальнені дані стосовно експериментальної групи

Всі 80 суб'єктів були включені до групи з перевірки безпечності і до групи, призначеної для здійснення обробки (ITT). Всі 80 суб'єктів надали обґрунтовані і інтерпретовані оцінки для параметрів імуногенності, і не мали суттєвих відхилень від методики проведення досліджень; таким чином, усі суб'єкти були прийнятними для групи з перевірки імуногенності (IM) та групи з методики проведення досліджень (PP).

35 Загальний середній вік становив 33,1 року (середнє значення для різних груп становило від 25,2 року до 38,7 року). Середній зріст дорівнював 179,7 см (у межах від 177,2 см до 181,8 см), середня маса становила 78,8 кг (від 73,0 кг до 82,5 кг) і середній індекс маси тіла (BMI) дорівнював 24,38 кг/м² (від 22,98 кг/м² до 25,78 кг/м²). Відмінності між експериментальними групами вважалися такими, що не мають клінічного значення.

13. Узагальнення фармакодинамічних параметрів:

Другорядна мета цього дослідження полягала у демонстрації імуногенності VPM1002. Ця другорядна мета була досягнута. Результати дослідження показують, що VPM1002 викликає 45 дуже хороші у кількісному і якісному відношеннях клітинні імунні відповіді як в групі невакцинованих, так і в групі попередньо вакцинованих БЦЖ суб'єктів. Усі дані спостережень показують чітку імунну реакцію Th1-типу, індуковану VPM1002. Початкова мета розробки цього конкретного вакцинного штаму VPM1002 полягала у посиленні клітинно-опосередкованої імунної реакції та індукуванні якісно кращих імунних відповідей, ніж БЦЖ. Ці цілі можуть бути 50 досягнуті. Крім того, цей вакцинний штам також демонструє придатність для ревакцинації у разі вже існуючої імунної відповіді, індукованої БЦЖ.

Стосовно кількості IFN- γ на число лімфоцитів (вторинні кінцеві точки LST і WBA), за даними непараметричної та параметричної статистики спостерігався взаємозв'язок "доза-відповідь" між групами, які одержали VPM1002. В рамках кожної групи середні зміни в порівнянні з вихідним 55 рівнем були найвищими в групі, яка одержувала 5×10^5 КУО VPM1002, і найнижчими в групі, яка одержувала 5×10^3 КУО VPM1002 в усі дні проведення дослідження. Це доводить вплив VPM1002 на реципієнта.

Результати лінійного регресійного аналізу змін вторинних кінцевих точок у порівнянні з вихідним рівнем показали, що вік, маса, загальна кількість PBMC на вихідному рівні і загальна

кількість лімфоцитів на вихідному рівні не справляли статистично значущого впливу на результати.

Стосовно дослідницьких кінцевих точок, у обох групах спостерігався значний вплив на індукцію поліфункціональних CD4⁺ Т-клітин.

5 На закінчення, VPM1002 викликає імунну відповідь Th1-типу шляхом індукування IFN- γ , що не тільки кількісно, але і якісно відрізняється від БЦЖ поліфункціональними Т-клітинами. Ці результати заохочують до подальшого вдосконалення цієї вакцини.

14. Узагальнені дані з перевірки безпечності:

10 Головною кінцевою точкою цього дослідження I фази була оцінка безпечності VPM1002. Дійсно, дослідження не виявило жодних проблем, пов'язаних з безпечністю VPM1002.

Докладно, разова вакцинація VPM1002 у дозі до 5×10^5 КУО добре переносилась. Не було зареєстровано жодного серйозного негативного явища (АЕ).

15 Взагалі, 80,7 % всіх негативних явищ (АЕ) вважались дослідником пов'язаними з експериментальним лікарським засобом (побічні реакції на лікарський засіб (ADR): взаємозв'язок оцінюється як "певний", "ймовірний" і "можливий").

ADR були повідомлені всіма суб'єктами. Майже всі ADR являли собою розлади на місці ін'єкції (98,0 % всіх ADR).

20 Кількість ADR зростала з підвищенням дози. Тим не менш, частота та інтенсивність ADR завжди залишалась прийнятною з медичної точки зору, навіть при найвищій дозі VPM1002 (5×10^5 КУО). Спостерігалась також тенденція до більш високої частоти ADR у суб'єктів з попередньою вакцинацією БЦЖ у порівнянні з відповідними експериментальними групами без попередньої вакцинації БЦЖ (239 ADR проти 204 ADR, відповідно).

25 Всі суб'єкти відчували АЕ. Кількість негативних явищ була схожою у групах БЦЖ і 5×10^5 КУО VPM1002 з суб'єктів, попередньо не імунізованих БЦЖ (76 АЕ і 82 АЕ, відповідно), і нижчою в 2 інших групах (47 АЕ після 5×10^3 КУО VPM1002 і 53 АЕ після 5×10^4 КУО VPM1002). Серед суб'єктів з попередньою вакцинацією БЦЖ, кількість АЕ була найвищою у групи, яка одержувала

5×10^5 КУО VPM1002 (97 АЕ), порівняно з 72 АЕ в групі БЦЖ і 61 АЕ як в групі, що одержувала 5×10^3 КУО, так і в групі, що одержувала 5×10^4 КУО VPM1002.

30 Серед БЦЖ-невакцинованих суб'єктів ADR, які спостерігали у досліджуваних групах, що одержували БЦЖ і VPM1002 в однакових дозах (5×10^5 КУО), мали порівнянну частоту і тяжкість (64 проти 72 після БЦЖ і VPM1002, відповідно). Серед попередньо вакцинованих БЦЖ суб'єктів кількість ADR була дещо вищою у тих з них, які одержали 5×10^5 КУО VPM1002, в порівнянні з 5×10^5 КУО БЦЖ (78 ADR після VPM1002 проти 60 ADR після БЦЖ). Однак інтенсивність ADR була порівнюваною між двома групами, і, при ближчому розгляді, основною підставою для цієї невідповідності, як видається, є трохи більш висока частота викривання виразками місць ін'єкцій після VPM1002 (4 та 8 явищ після БЦЖ і VPM1002, відповідно; діаметром від 1 мм до 8 мм), що пов'язується з відповідними подальшими явищами, а саме, покриттям струпами та злущуванням на місці ін'єкції (6 проти 9 і 4 проти 7 ADR, відповідно, після БЦЖ і VPM1002), всі з яких оцінюються як такі, що мають легку інтенсивність і відіграють роль ще одного показника індукції імуногенності.

Більшість АЕ мала легку інтенсивність (95,3 % всіх АЕ), 25 АЕ (4,6 % всіх АЕ) мали помірну інтенсивність і 1 АЕ (0,1 % усіх АЕ, повідомлених після БЦЖ) мало важку інтенсивність.

Жодного суб'єкту не було виведено з дослідження у зв'язку з АЕ.

Узагальнені дані з кількості негативних явищ та розладів на місці ін'єкції

Система, орган, клас; Термін, якому віддають перевагу	Без попередньої БЦЖ- вакцинації негативні			або PPD-	3 попередньою БЦЖ- вакцинацією або позитивні			PPD-
	БЦЖ	Група 1	Група 2	Група 3	БЦЖ	Група 1	Група 2	Група 3
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)
Підсумково	76 (10, 100)	47 (10, 100)	53 (10, 100)	82 (10, 100)	72 (10, 100)	61 (10, 100)	61 (10, 100)	97 (10, 100)
Загальні розлади та стан на місці введення								
Разом	63 (10, 100)	30 (10, 100)	34 (10, 100)	68 (10, 100)	60 (10, 100)	46 (10, 100)	51 (10, 100)	72 (10, 100)
Відчуття дискомфорту на місці ін'єкції	-	-	-	-	1 (1, 10,0)	-	1 (1, 10,0)	2 (2, 20,0)

Узагальнені дані з кількості негативних явищ та розладів на місці ін'єкції

Система, орган, клас; Термін, якому віддають перевагу	Без попередньої БЦЖ- вакцинації негативні			або PPD-	3 попередньою БЦЖ- вакцинацією або позитивні			PPD-
	БЦЖ	Група 1	Група 2	Група 3	БЦЖ	Група 1	Група 2	Група 3
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)	x(y, z%)
Еритема на місці ін'єкції	11 (10, 100)	10 (10, 100)	10 (10, 100)	10 (10, 100)	10 (10, 100)	10 (10, 100)	10 (10, 100)	10 (10, 100)
Злушчування на місці ін'єкції	3 (3, 30,0)	-	-	7 (7, 70,0)	4 (4, 40,0)	2 (2, 20,0)	4 (4, 40,0)	7 (7, 70,0)
Індурація на місці ін'єкції	12 (10, 100)	13 (8, 80,0)	12 (10, 100)	13 (10, 100)	15 (10, 100)	14 (10, 100)	11 (10, 100)	14 (10, 100)
Біль на місці ін'єкції	3 (3, 30,0)	1 (1, 10,0)	2 (2, 20,0)	4 (4, 40,0)	2 (2, 20,0)	2 (2, 20,0)	-	4 (4, 40,0)
Свербіж на місці ін'єкції	7 (7, 70,0)	2 (2, 20,0)	3 (3, 30,0)	7 (7, 70,0)	7 (7, 70,0)	4 (3, 30,0)	6 (5, 50,0)	7 (7, 70,0)
Струп на місці ін'єкції	9 (6, 60,0)	1 (1, 10,0)	2 (2, 20,0)	9 (8, 80,0)	6 (5, 50,0)	5 (4, 40,0)	8 (7, 70,0)	9 (8, 80,0)
Припухлість на місці ін'єкції	11 (8, 80,0)	2 (2, 20,0)	4 (4, 40,0)	13 (8, 80,0)	10 (6, 60,0)	5 (4, 40,0)	8 (6, 60,0)	11 (9, 90,0)
Виразка на місці ін'єкції	6 (5, 50,0)	1 (1, 10,0)	1 (1, 10,0)	5 (5, 50,0)	4 (4, 40,0)	2 (2, 20,0)	3 (3, 30,0)	8 (8, 80,0)
Абсцес на місці ін'єкції	-	-	-	-	1 (1, 10)	-	2 (2, 20,0)	3 (3, 30,0)
Пустула на місці ін'єкції	1 (1, 10,0)	-	1 (1 10,0)	3 (3, 30,0)	-	-	-	3 (3, 30,0)

Обробка: БЦЖ=5×10⁵ КУО БЦЖ (2-8×10⁵);

Група 1=5×10³ КУО VPM1002 (2-8×10³);

Група 2=5×10⁴ КУО VPM1002 (2-8×10⁴);

5 Група 3=5×10⁵ КУО VPM1002 (2-8×10⁵);

У цілому, кількість суб'єктів з місцевими реакціями і інтенсивність місцевих реакцій зростає із збільшенням дози, і ці показники були порівнянні з групами, які одержували 5×10⁵ КУО БЦЖ і VPM1002. Результати у БЦЖ-невакцинованих суб'єктів і у суб'єктів, попередньо вакцинованих БЦЖ, були як правило схожими; чіткої тенденції до різних місцевих реакцій не спостерігалось. Найбільш вираженими місцевими реакціями були еритема та індурація. Еритема спостерігалась у всіх суб'єктів. Середній розмір еритеми збільшується з дозою. Середній розмір еритеми був схожим після вакцинації 5×10⁵ КУО БЦЖ і VPM1002. У пацієнтів, яким вводили 5×10⁵ КУО VPM1002, середній розмір еритеми був незмінно більшим у попередньо вакцинованих суб'єктів, в той час як середній розмір групи БЦЖ був більшим серед суб'єктів без попередньої вакцинації БЦЖ.

У ряду суб'єктів з індурацією чітко вираженої дозозалежності не спостерігалось. Середній розмір індурації був найвищим у досліджуваних групах, яким вводили 5×10⁵ КУО БЦЖ або VPM1002. Максимальна індурація спостерігалась в групах, вакцинованих 5×10⁵ КУО БЦЖ, приблизно на 3-5 день, тобто раніше, аніж у групах, вакцинованих 5×10⁵ КУО VPM1002, максимальний розмір в яких було зареєстровано на 11-29 дні. Розмір місцевої індурації є критерієм місцевої клітинної імунної реакції. Характерний часовий профіль в групах VPM1002 відрізняється від часового профілю в групах БЦЖ, що співпадає з даними фармакодинаміки (імуногенності).

Фіг. 1 представляє взаємозв'язок між середнім розміром еритеми у досліджуваній групі і днем дослідження.

Фіг. 2 представляє взаємозв'язок між середнім розміром індурації у досліджуваній групі і днем дослідження.

Загальна переносність майже завжди оцінювалась суб'єктами як добра (42 %) або дуже добра (57 %). Лише 1 суб'єкт (БЦЖ, без попередньої вакцинації) оцінив загальну переносність як погану на 57 день, але вже без подібної оцінки через 6 міс. після вакцинації.

Лабораторні дані не показали клінічно значущих часо- або дозозалежних відмінностей. Деякі суб'єкти мали значення вищі межі норми вже на початковому етапі. У деяких суб'єктів (19 суб'єктів, 13 БЦЖ-невакцинованих суб'єктів і 6 суб'єктів, попередньо вакцинованих БЦЖ)

показник функціонування печінки, особливо ALT (аланінамінотрансфераза), перевищив межу норми. Кількість суб'єктів з аномальними значеннями ALT після вакцинації була найвищою у групі БЦЖ-невакцинованих суб'єктів, які одержали 5×10^5 КУО VPM1002, але більш виражене підвищення спостерігалось у групах з меншою дозою, і ніколи не перевищувало 6-кратної межі норми і знизилось до кінця дослідження.

Параметри життєво важливих функцій і ЕКГ не показали часо- або дозозалежних відмінностей.

При проведенні поствакцинального об'єктивного обстеження, УЗД печінки і рентгенографії грудної клітини жодних клінічно значущих результатів не спостерігалось. Всі квантіферонові тести були негативними.

15. Висновки

Фармакодинаміка (другорядна мета дослідження)

- Другорядна мета дослідження була досягнута.

- VPM1002 демонструє імуногенність, що було виявлено дозозалежною IFN- γ стимуляцією.

Результати показані на Фіг. 3 і Фіг. 4.

- VPM1002 викликає кількісно і якісно відмінну імунну реакцію, ніж БЦЖ.

- VPM1002 діє як ревакцинація на вже існуючий імунний статус, індукований БЦЖ.

- Поліфункціональні CD4⁺ Т-клітини активізувались в усіх групах, які одержували VPM1002 (5×10^5 КУО). Результати показані на Фіг. 5.

Безпечність (основна мета дослідження)

- Основна мета дослідження була досягнута: Одноразова вакцинація VPM1002 у дозі до 5×10^5 КУО була безпечною і добре переносною.

- Негативними явищами, що вважаються пов'язаними з лікарськими засобами, майже завжди були розлади на місці ін'єкції. Кількість АЕ збільшувалась з дозою і була схожою після введення 5×10^5 КУО VPM1002 і контрольної вакцини (БЦЖ) у дозі 5×10^5 КУО.

- Кількість та інтенсивність місцевих реакцій збільшувалась з дозою VPM1002; при найбільшій дозі частота місцевих реакцій була подібною до тієї, що спостерігалась після вакцинації БЦЖ.

- Загальна переносність VPM1002 завжди оцінювалась суб'єктами як хороша або дуже хороша.

- Лабораторні дані, параметри життєво важливих функцій і дані ЕКГ не показали клінічно значущих часо- або дозозалежних відмінностей.

16. Підсумковий висновок

Профіль безпечності VPM1002 був добрим. VPM1002 продемонструвала імуногенність. Імуногенний профіль VPM1002 відрізняється від імуногенного профілю БЦЖ. Співвідношення між благотворною дією та ризиком дозволяє продовжувати клінічну розробку цієї вакцини-кандидата.

Перелік посилань

1. World Health Organization (WHO) (2009). WHO Report 2009 - Global tuberculosis control-epidemiology, strategy, financing. - WHO, Geneva.

2. Andersen P. (2007). Tuberculosis vaccines-an update. Nat. Rev. Microbiol. 5, 484-487.

3. Mittrucker HW, Steinhoff U, Kohler A, Krause M, Lazar D, Mex P, Miekley D, Kaufmann SH. (2007). Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 12434-12439.

4. Young D, Dye C (2006). The development and impact of tuberculosis vaccines. Cell. 124, 683-687.

5. Kaufmann SH. (2007). The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. Nat. Rev. Microbiol. 5, 491-504.

6. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. (2005). Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 2869-2873.

7. Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser Eddine A, Mann P, Goosmann C, Bandermann S, Smith D, Bancroft GJ, Reyrat JM, van Soolongen D, Raupach B, Kaufmann SH. (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. The Journal of Clinical Investigation 115, 2472-2479.

8. Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, Stenger S, Serbina N, Mazzaccaro RJ, Flynn JL, Barnes PF, Southwood S, Celis E, Bloom BR, Modlin RL, Sette A. (2000). Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8⁺ T cells in human tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 12210-12215.

9. Winau F, Weber S, Sad S, deDiego J, Locatelli Hoops S, Breiden B, Sandhoff K, Brinkmann V, Kaufmann SHE, Schaible UE. (2006). Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*. 24, 105-117.
- 5 10. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med.* 9,1039-1046.
11. Hess J, Miko D, Catic A, Lehmensiek V, Russel D, Kaufmann SH. (1998). *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci* 95, 5299-5304.
- 10 12. Reytrat JM, Berthet FX, Gicquel B., (1995) The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92(19):8768-72
- 15 13. Brosch R, Gordon SV, Gamier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007 Mar 27;104(13):5596-601. Epub 2007 Mar 19.

Список послідовностей

<110> Vakzine Projekt Management GmbH

<120> РЕКОМБІНАНТНА МІКОБАКТЕРІЯ ЯК ВАКЦИНА ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ НА ЛЮДЯХ

<130> 49047P WO

<150> US61/384375

<151> 2010-09-20

<160> 2

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1881

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<222> 1..1881

<223> /тип молекули="ДНК"
/примітка="рекомбінантна нуклеїновокислотна молекула"
/мікроорганізм="Штучна послідовність"

<220>

<221> джерело

<222> 1..1881

<223> /тип молекули="ДНК"
/примітка="CDS містять фаголізосомальний домен (нуклеотиди 211-1722) і стоп-кодон (1879-1881)"
/мікроорганізм="Штучна послідовність"

<400> 1

atgacagacg tgagccgaaa gattcgagct tggggacgcc gattgatgat cggcacggca	60
gcggctgtag tccttccggg cctgggtggg ctgcccggcg gagcggcaac cgcgggcgcg	120
ttctcccggc cggggctgcc ggtcgagtac ctgcagtctg caaagcaatc cgctgcaaat	180
aaattgcact cagcaggaca aagcacgaaa gatgcatctg cattcaataa agaaaattca	240
atttcatcca tggcaccacc agcatctccg cctgcaagtc ctaagacgcc aatcgaaaag	300
aaacacgcgg atgaaatcga taagtatata caaggattgg attacataa aaacaatgta	360
ttagtatacc acggagatgc agtgacaaat gtgccgccaa gaaaagggtta caaagatgga	420
aatgaatata ttgttgtgga gaaaaagaag aaatccatca atcaaaataa tgcagacatt	480
caagttgtga atgcaatttc gagcctaacc tatccaggtg ctctcgtaaa agcgaattcg	540
gaattagtag aaaatcaacc agatgttctc cctgtaaaac gtgattcatt aacactcagc	600
attgatttgc caggtatgac taatcaagac aataaaatcg ttgtaaaaaa tgccactaaa	660
tcaaacgtta acaacgcagt aaatacatta gtggaaagat ggaatgaaaa atatgctcaa	720

```

gcttatccaa atgtaagtgc aaaaattgat tatgatgacg aaatggctta cagtgaatca 780
caattaattg cgaaatttgg tacagcatTT aaagctgtaa ataatagctt gaatgtaaAC 840
ttcggcgcaa tcagtgaagg gaaaatgcaa gaagaagtca ttagttttaa acaaatttac 900
tataactgta atgttaatga acctacaaga ccttcagat ttttcggcaa agctgttact 960
aaagagcagt tgcaagcgct tggagtgaat gcagaaaatc ctctgcata tatctcaagt 1020
gtggcgatg gccgtcaagt ttatttgaaa ttatcaacta attcccatag tactaaagta 1080
aaagctgctt ttgatgctgc cgtaagcgga aaatctgtct caggatgatg agaactaaca 1140
aatatcatca aaaattcttc cttcaaagcc gtaatttacg gaggttccgc aaaagatgaa 1200
gttcaaatca tcgacggcaa cctcggagac ttacgcgata ttttgaaaaa aggcgctact 1260
tttaatcgag aaacaccagg agttcccat gcttatataa caaacttcct aaaagacaat 1320
gaattagctg ttattaaaaa caactcagaa tatattgaaa caacttcaa agcttatata 1380
gatggaaaaa ttaacatcga tcactctgga ggatacgtt ctcaattcaa catttcttgg 1440
gatgaagtaa attatgatcc tgaaggtaac gaaattgttc aacataaaaa ctggagcgaa 1500
aacaataaaa gcaagctagc tcatttcaca tcgtccatct atttgccagg taacgcgaga 1560
aatattaatg tttacgctaa agaatgcact ggtttagctt gggaatggtg gagaacggta 1620
attgatgacc ggaacttacc acttggtgaa aatagaaata tctccatctg gggcaccacg 1680
ctttatccga aatatagtaa taaagtagat aatccaatcg aatatgcatt agcctatgga 1740
agtcagggtg atcttaatcc attaatatg gaaatcagca aaatcatttc agctgcagtt 1800
ctttctctt taacatcgaa gctacctgca gagttcgta ggcgcggatc cggaattcga 1860
agcttatcga tgtcgacgta g 1881

```

<210> 2

<211> 626

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> Джерело

<222> 1..626

<223> /тип молекули="білок"

/примітка="Амінокислотна послідовність, що відповідає послідовності SEQ ID NO: 1."

/мікроорганізм="Штучна послідовність"

<400> 2

```

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met
1           5           10          15

```

```

Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
          20          25          30

```

```

Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val
35          40          45

```

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


```

Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val
355                               360                               365

Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn Ile Ile Lys
370                               375                               380

Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu
385                               390                               395                               400

Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys
405                               410                               415

Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr
420                               425                               430

Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn
435                               440                               445

Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile
450                               455                               460

Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp
465                               470                               475                               480

Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys
485                               490                               495

Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser
500                               505                               510

Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu
515                               520                               525

Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg
530                               535                               540

Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr
545                               550                               555                               560

Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala
565                               570                               575

Leu Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile
580                               585                               590

Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu Thr Ser Lys Leu
595                               600                               605

Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met
610                               615                               620

Ser Thr
625

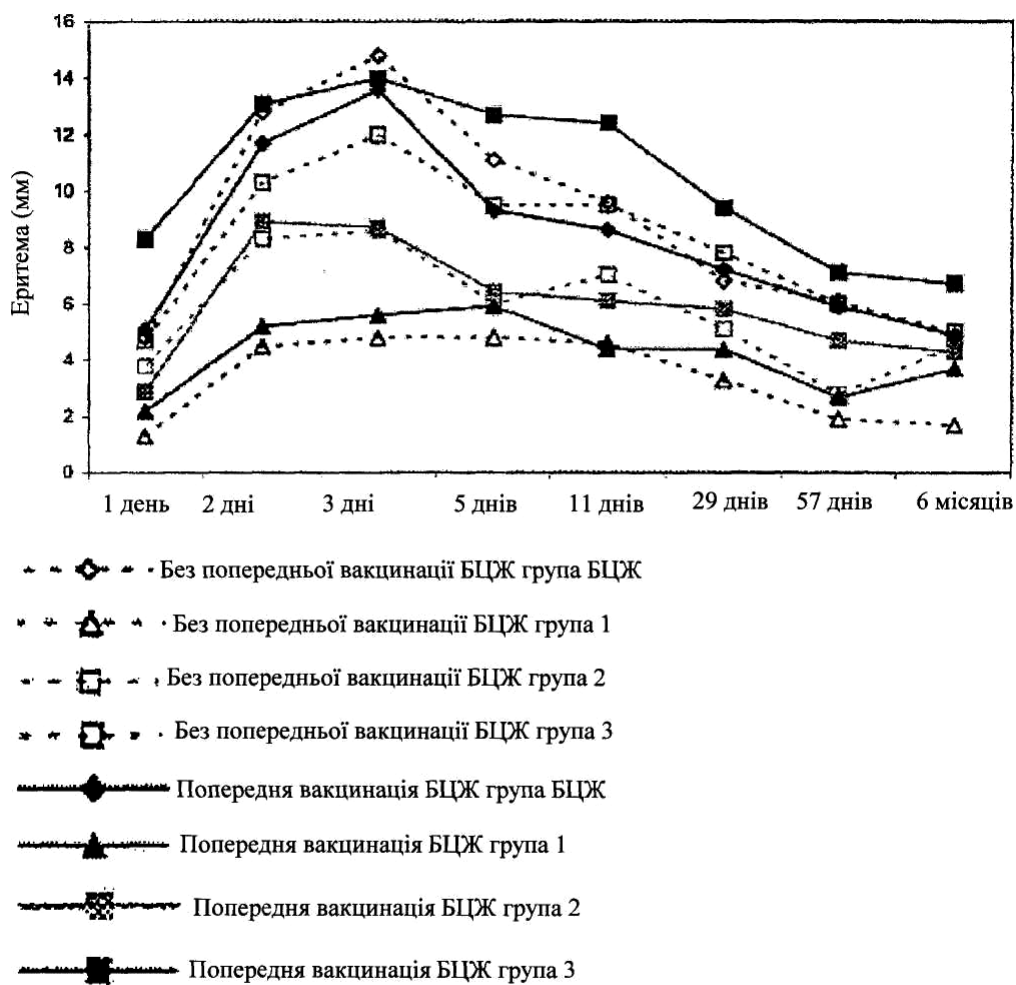
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Вакцина проти туберкульозу для застосування на людях, що містить як активний інгредієнт рекомбінантну клітину бактерій *Mycobacterium*, яка є уреаза-дефіцитною і яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує гібридний поліпептид, який містить (а) антиген бактерій *Mycobacterium*, який містить пептидну послідовність, яка кодується нуклеотидами 121-153 послідовності SEQ ID NO: 1, причому цим антигеном бактерій *Mycobacterium* є Ag85B, або
- 10 його імуногенний фрагмент, і (b) домен виходу з фаголізосоми, який містить пептидну послідовність, яка кодується нуклеотидами 211-1722 послідовності SEQ ID NO: 1, причому

- рекомбінантна клітина бактерій *Mycobacterium* являє собою рекомбінантну клітину бактерій *Mycobacterium bovis* датського штаму підтипу Prague, яка не несе гена стійкості до антибіотиків.
2. Вакцина за п. 1, призначена для введення суб'єкту, якому не вводили штам бактерій *Mycobacterium*.
- 5 3. Вакцина за п. 2, призначена для введення новонародженому.
4. Вакцина за п. 1, призначена для введення суб'єкту, якому попередньо вводили штам бактерій *Mycobacterium*.
5. Вакцина за будь-яким з пп. 1-4, що являє собою ліофілізат, факультативно разом з відновлювальною рідиною.
- 10 6. Вакцина за будь-яким з пп. 1-5, яка містить дозу приблизно 10^3 - 10^4 КУО, приблизно 10^4 - 10^5 КУО або приблизно 10^5 - 10^6 КУО.
7. Вакцина за будь-яким з пп. 1-6 для внутрішньокірного введення.
8. Вакцина за будь-яким з пп. 1-7 для введення разовою дозою.
9. Вакцина за будь-яким з пп. 1-7 для введення двома або більше дозами.
- 15 10. Вакцина за будь-яким з пп. 1-9 для активації поліфункціональних CD4⁺T-клітин.
11. Спосіб вакцинації людини проти туберкульозу, який включає введення фармацевтично ефективної дози рекомбінантної клітини бактерій *Mycobacterium*, яка є уреаза-дефіцитною та не несе гена стійкості до антибіотиків, і яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує гібридний поліпептид, який містить (а) антиген бактерій *Mycobacterium*, який містить
- 20 пептидну послідовність, яка кодується нуклеотидами 121-153 послідовності SEQ ID NO: 1, причому цим антигеном бактерій *Mycobacterium* є Ag85B, або його імуногенний фрагмент, і (b) домен виходу з фаголізосоми, який містить пептидну послідовність, яка кодується нуклеотидами 211-1722 послідовності SEQ ID NO: 1, причому рекомбінантна клітина бактерій *Mycobacterium* являє собою рекомбінантну клітину бактерій *Mycobacterium bovis* датського
- 25 штаму підтипу Prague.

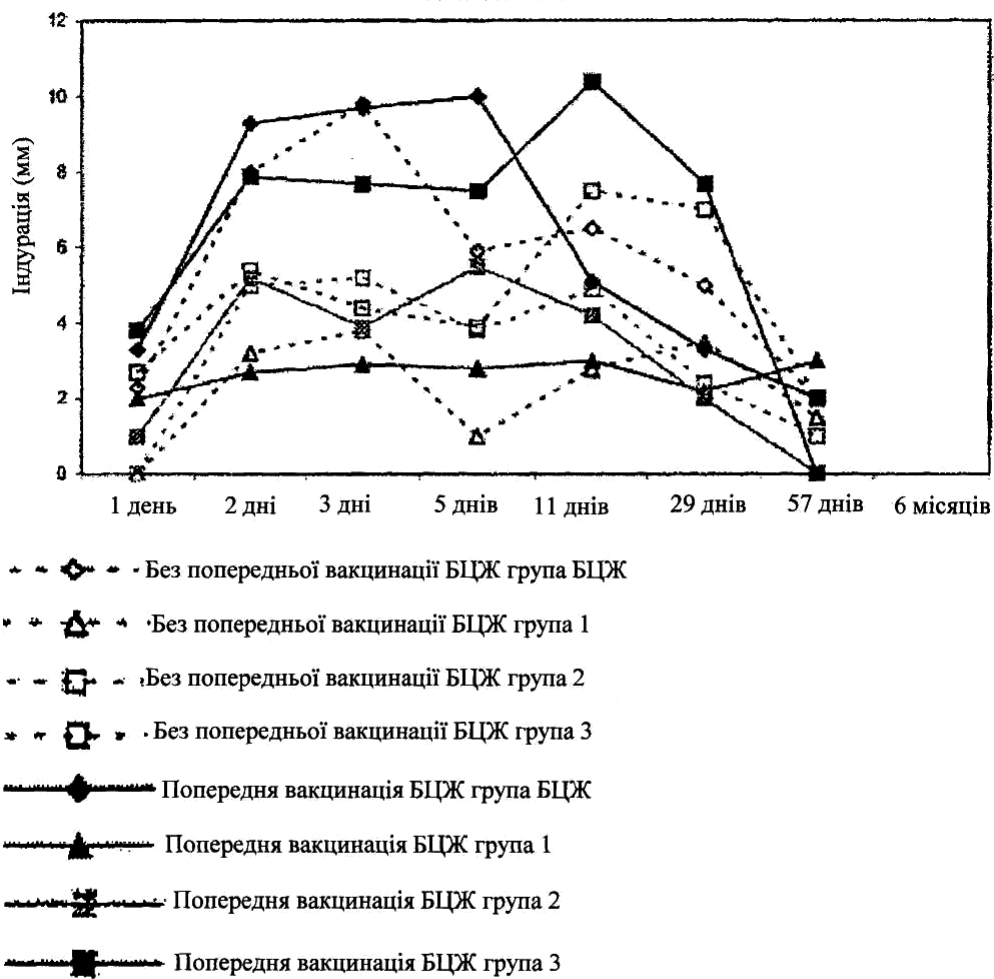
Співвідношення між середнім розміром еритеми у досліджуваній групі і днем дослідження



Обробка: БЦЖ=5×10⁵ КУО БЦЖ (2-8×10⁵),
 Група 1=5×10³ КУО VPM1002 (2-8×10³),
 Група 2=5×10⁴ КУО VPM1002 (2-8×10⁴),
 Група 3=5×10⁵ КУО VPM1002 (2-8×10⁵)

Фіг. 1

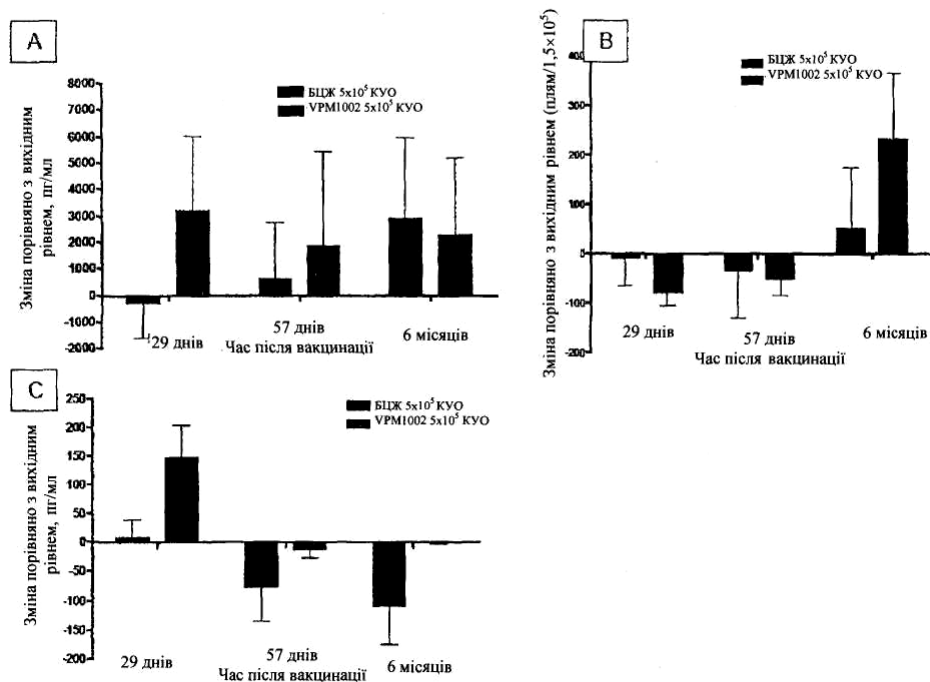
Співвідношення між середнім розміром індурації у досліджуваній групі і днем дослідження



Обробка: БЦЖ= 5×10^5 КУО БЦЖ ($2-8 \times 10^5$),
 Група 1= 5×10^3 КУО VPM1002 ($2-8 \times 10^3$),
 Група 2= 5×10^4 КУО VPM1002 ($2-8 \times 10^4$),
 Група 3= 5×10^5 КУО VPM1002 ($2-8 \times 10^5$)

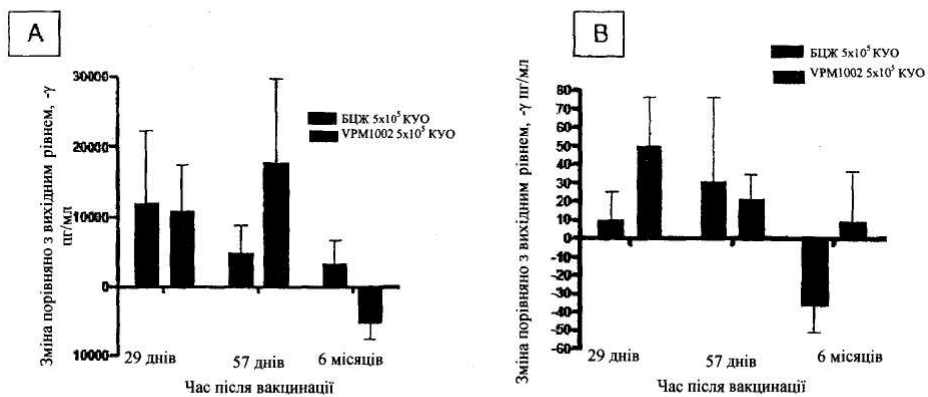
Фіг. 2

Середні зміни, порівняно з вихідним рівнем, для IFN- γ -реакції після стимуляції Ag85B у невакцинованих суб'єктів



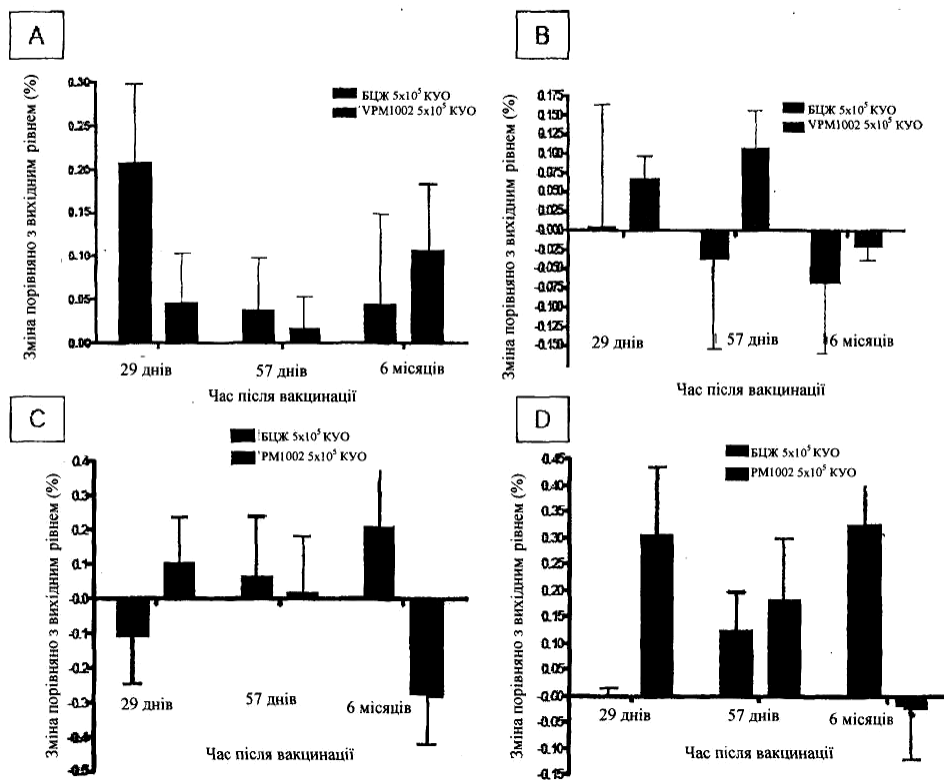
Фіг. 3

Середні зміни, порівняно з вихідним рівнем, для IFN- γ -реакції після стимуляції Ag85B у попередньо вакцинованих суб'єктів



Фіг. 4

Зміна, порівняно з вихідним рівнем, одно- і поліфункціональних CD4⁺ Т-клітин у невакцинованих суб'єктів



Фіг. 5

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601