



A61K 9/02 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004126059/15, 25.08.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.08.2004

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2006

(45) Опубликовано: 10.04.2007 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: ДОНИН М. В. и др. Возможность
использования аттенуированных
рекомбинантных штаммов *Salmonella*
enteritidis, продуцирующих НВс-антиген, как
ректальной вакцины в эксперименте. Вестник
Российской академии медицинских наук. 2004,
№6, с.13-15. RU 2201212 С1, 27.03.2003
(описание изобретения). RU 2192277 С1,
10.11.2002. RU 2192886 С1, 20.11.2002. WO (см.
прод.)

Адрес для переписки:

630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-
н, пгт Кольцово, ГНЦ ВБ "Вектор", патентный
отдел, Ю.Н. Мистюрину

(72) Автор(ы):

Карпенко Лариса Ивановна (RU),
Некрасова Надежда Александровна (RU),
Веремейко Татьяна Александровна (RU),
Левагина Галина Михайловна (RU),
Терещенко Тамара Анатольевна (RU),
Малахова Татьяна Валерьевна (RU),
Ильичев Александр Алексеевич (RU),
Масычева Валентина Ивановна (RU),
Игнатъев Георгий Михайлович (RU),
Агафонов Александр Петрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное учреждение
науки "Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии "Вектор"
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека (ФГУН ГНЦ ВБ "ВЕКТОР"
Роспотребнадзора) (RU)

(54) СУППОЗИТОРИИ ДЛЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологии,
биотехнологии и медицине, а именно к созданию
живых вакцин для ректального введения против
вирусных инфекций на основе аттенуированных
рекомбинантных штаммов сальмонелл, несущих
протективные вирусные антигены. Суппозитории
для иммунопрофилактики вирусных инфекций
содержат компоненты в следующем соотношении
на одну свечу массой 2,0 г, мас.-%: суспензия
клеток рекомбинантных аттенуированных штаммов
Salmonella, трансформированных pGEX-2T-TBI,
pcDNA-TCI или pKHBc, несущих гены протективных

вирусных антигенов, и вмешанных в суппозиторную
основу в количестве 10^6 - 10^9 живых клеток - 1%;
жировая основа - 94% и эмульгатор Т-2 - 5%. При
этом в качестве жировой основы может быть
использован твердый кулинарный жир (94%), или
гидролизованное хлопковое масло (94%) или смесь
кулинарного жира "Фритюрный" (60%), масла какао
(24%) и твердого парафина (10%). Применение
суппозиторияев позволяет индуцировать
специфический гуморальный и клеточный
иммунный ответ к соответствующему вирусному
антигену. 3 з.п. ф-лы, 8 табл., 3 ил.

(56) (продолжение):

0014240 A2, 16.03.2000. NARDELLI-HAEFLIGER D. et al. Oral and rectal immunization of adult female
volunteers with a recombinant attenuated *Salmonella typhi* vaccine strain. Infect. Immun. 1996, Dec.,
64 (12), p.5219-5224.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 9/02 (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)**A61K 39/29** (2006.01)**A61K 39/21** (2006.01)**A61P 31/12** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004126059/15, 25.08.2004**(24) Effective date for property rights: **25.08.2004**(43) Application published: **10.02.2006**(45) Date of publication: **10.04.2007 Bull. 10**

Mail address:

630559, Novosibirskaja obl., Novosibirskij r-
n, pgt Kol'tsovo, GNTs VB "Vektor", patentnyj
otdel, Ju.N. Mistjurinu

(72) Inventor(s):

Karpenko Larisa Ivanovna (RU),
Nekrasova Nadezhda Aleksandrovna (RU),
Veremejko Tat'jana Aleksandrovna (RU),
Levagina Galina Mikhajlovna (RU),
Tereshchenko Tamara Anatol'evna (RU),
Malakhova Tat'jana Valer'evna (RU),
Il'ichev Aleksandr Alekseevich (RU),
Masysheva Valentina Ivanovna (RU),
Ignat'ev Georgij Mikhajlovich (RU),
Agafonov Aleksandr Petrovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie
nauki "Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr
virusologii i biotekhnologii "Vektor"
Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere
zashchity prav potebitelej i blagopoluchija
cheloveka (FGUN GNTs VB "VEKTOR"
Rospotrebnadzora) (RU)

(54) **SUPPOSITORY FOR IMMUNOPROPHYLAXIS OF VIRAL INFECTIONS**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology, biotechnology, medicine,
in particular production of living vaccines
against viral infections.

SUBSTANCE: invention relates to living
vaccines for rectal administration against viral
infections based on attenuated recombinant
Salmonella strains bearing protective viral
antigens. Suppository for immunoprophylaxis of
viral infections contains (per one 2 g
suppository, mass %): cell slurry of attenuated

recombinant Salmonella strains transformed with
pGEX-2T-TBI, pcDNA-TCl, or pKHBc bearing gene of
protective viral antigens, mixed with suppository
base in amount of 10^6 - 10^9 living cells 1 %; fatty
base 94 %; and emulsifier T2 5 %. As fatty solid
cooking oil (94 %); or hydrolyzed cotton oil (94
%); or mixture of cooking oil (60 %), Cocoa fat
(24 %), and solid wax (10 %).

EFFECT: agent for inducing of humoral and cell
immune response to respective viral antigen.

8 tbl, 11 ex, 3 dwg

Изобретение относится к микробиологии, биотехнологии и медицине, конкретно к созданию методами генной инженерии живых вакцин против вирусных инфекций на основе аттенуированных рекомбинантных штаммов сальмонелл, несущих протективные вирусные антигены, в виде суппозитория.

5 В настоящее время в мире происходит стремительное распространение ряда вирусных инфекций, перерастающих в эпидемии; это - СПИД, вызываемый вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит В, гепатит С и др. Все эти патогены высоко контагиозны, вирулентны и обладают антигенной изменчивостью.

10 Так как в арсенале медицины на сегодняшний день не имеется достаточно эффективных способов лечения такого рода вирусных инфекционных заболеваний, единственной мерой предотвращения развития инфекций является массовая вакцинация населения.

Главный недостаток существующих вакцин заключается в том, что они способны индуцировать только системный иммунитет. Очевидно, что эффективная противовирусная вакцина должна обеспечивать как системный, так и местный иммунитет слизистой, в области "входных ворот" инфекции.

15 Среди новых перспективных разработок вирусных вакцин в последнее время предпочтение отдается созданию мукозальных вакцин, т.е. препаратов, вводимых на слизистые оболочки. Такие вакцины имеют ряд преимуществ: введение без шприца, например перорально или интраназально; обеспечивается индукция не только системного, но и местного иммунитета, что крайне важно для заболеваний, передающихся половым 20 путем. Главные проблемы создания мукозальных вакцин на основе инактивированных антигенов связаны с тем, что отдельные вирусные белки плохо проникают в клетки слизистой оболочки или деградируют в желудке или кишечнике.

Одним из наиболее перспективных векторов доставки мукозальных вакцин являются не 25 патогенные для человека аттенуированные штаммы сальмонелл [1, 2].

Интерес к живым клеткам сальмонелл как к носителю иммуногенных эпитопов инфекционных агентов обусловлен тем, что аттенуированные штаммы этой бактерии способны инвазировать слизистую и некоторое время жить в клетках лимфоидной ткани организма млекопитающих. Клетка-вектор, являясь естественным депо и адъювантом для 30 антигена, представляет его в максимально иммуногенной форме, увеличивает время персистенции и способствует накоплению антигена в иммунокомпетентных клетках.

Известен ряд работ, в которых показано, что рекомбинантные аттенуированные сальмонеллы, продуцирующие антигены ВИЧ, индуцируют высокий системный (гуморальный и клеточный) иммунитет и секреторный иммунитет. Примером могут служить 35 рекомбинантные аттенуированные штаммы *Salmonella enteritidis* E-23 BMC120 [3] и *Salmonella typhimurium* T-10 BMC 160 [4], первый из которых обеспечивает синтез белка gp 120 ВИЧ в клетках млекопитающих, а второй - другого белка-иммуногена ВИЧ - gp 160. Известна живая вакцина против ВИЧ на основе аттенуированного штамма *Salmonella typhimurium* SL-3261 для перорального введения, которая в качестве иммуногенов несет 40 белок обратной транскриптазы и трансактивирующий белок ВИЧ [5]. В описанных работах в качестве антигена используется лишь один или два из фрагментов белков gp 120 или gp 160 или pol, что явно недостаточно для создания эффективной вакцины, поскольку считается, что эффективная вакцина против ВИЧ должна включать эпитопы не только из белка env, но также gag и pol [6].

45 Известен рекомбинантный аттенуированный штамм бактерий *Salmonella enteritidis* E-23/pGEX-2T-TBI, способный продуцировать искусственный белок TBI, содержащий девять Т- и В- клеточных эпитопов ВИЧ, в клетках млекопитающих [7]. Известен также рекомбинантный аттенуированный штамм бактерий *Salmonella typhimurium* SL 7202 pGEX-TBI, способный продуцировать искусственный белок TBI [8].

50 Известен рекомбинантный аттенуированный штамм бактерий *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI [9], способный продуцировать искусственный белок TCI, содержащий множественные (более восьмидесяти) цитотоксические Т-клеточные эпитопы ВИЧ-1, в клетках млекопитающих.

Все описанные штаммы при введении животным индуцируют выраженный специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ к ВИЧ и могут быть использованы для конструирования живой ДНК-вакцины против ВИЧ.

5 Активно идет разработка подходов к созданию живых вакцин и против гепатита В на основе аттенуированных штаммов сальмонелл. В настоящее время проходит клинические
испытания вакцина на основе рекомбинантной сальмонеллы, продуцирующей HBsAg-preS2
[10]. Однако, при иммунизации добровольцев данным рекомбинантным штаммом
сальмонеллы, ответ на preS2 был отмечен только у одного из 13 испытуемых. Одной из
10 причин такого слабого иммунного ответа является тот факт, что preS2-область является
минорной антигенной детерминантой, тогда как главный нейтрализующий эпитоп
содержится в HBsAg.

Известны кандидатные вакцинные штаммы бактерий, сконструированные путем введения
плазмид, кодирующих антигены вируса гепатита В HbsAg и HbcAg в виде химерных белков,
в реципиентные аттенуированные штаммы *Salmonella typhimurium* T-10 и *Salmonella*
15 *typhimurium* SL 7207 [11, 12]. При иммунизации мышей полученными конструкциями
перорально и перректально (водной суспензией клеток рекомбинантных штаммов в виде
клизмы) обнаружены специфические анти- HbsAg и анти-HbcAg IgG в сыворотке крови
животных и специфические анти-вирусные IgA в слизистой кишечника, а также показано
формирование Т-клеточного ответа на антигены вируса гепатита В.

20 Известно, что из водных растворов, введенных в прямую кишку в виде клизмы,
лекарственные вещества всасываются очень быстро. Однако часть из них выводится
обратно вместе с раствором, поэтому общее количество всосавшегося из лекарства
вещества невелико. Эффективность всасывания лекарства значительно возрастает при
использовании суппозиторной формы. Кроме того, используя суппозиторные формы
25 лекарственных препаратов можно обеспечить быструю и массивную или постепенную
доставку лекарственного вещества в кровоток [13].

Преимущество мукозальных вакцин в виде суппозиторий заключается в том, что они
могут обеспечивать безболезненность, простоту введения и способствовать более
стабильной и длительной индукции местного иммунитета, поскольку, размножаясь в
30 организме хозяина, вакцинный штамм стимулирует длительную выработку антител с
развитием резистентности у входных ворот инфекции. Кроме того, при данном подходе не
требуется дорогостоящая стадия очистки антигена.

В связи с вышеизложенным представляется целесообразным разработать подходы к
созданию вакцин против вирусных инфекционных агентов на основе живых клеток
35 рекомбинантных аттенуированных сальмонелл в виде суппозиторий.

Имеются сведения о разработках вакцинных препаратов в виде суппозиторий на
основе инаktivированных микроорганизмов. Такого рода вакцина против урогенитальных
инфекций, состоящая из инаktivированных бактерий, которые происходят из культур
штаммов уropатогенных бактерий видов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*
40 *mirabilis*, *Proteus morganii* и *Streptococcus faecalis*, и полиэтиленгликолевой основы
суппозитория, описана в патенте РФ №2224542, выданном американской фирме Протеин
Экспресс [14]. При этом суппозиторная форма вакцин способствует равномерному
распределению клеток микроорганизмов в лекарственной форме и обеспечивает
стабильность активной субстанции в течение длительного времени.

45 В медицинской практике созданы и используются суппозитории, содержащие живые
микроорганизмы. Это суппозитории, содержащие микроорганизмы нормофлоры человека,
которые применяются при лечении дисбактериозов, воспалительных процессов
дистальных отделов кишечника и полости влагалища [15, 16, 17]. Препараты
суппозиторий содержат микробную массу живых бифидобактерий или лактобактерий в
50 количестве 10^3 - 10^8 клеток на одну дозу [17] либо сухую лиофилизированную биомассу
микроорганизмов [16] и фармацевтически приемлемые добавки. В России производятся
свечи Ацилакт, Бифидин, Лактобактерин (производство ОАО "Биохиммаш"), которые
представляют собой микробную массу живых микроорганизмов, высушенную в среде

культивирования с добавлением сахарозо-желатино-молочной среды и сформированную в медицинских суппозитории.

Однако в литературе не описаны препараты суппозитория, содержащие живые клетки рекомбинантных микроорганизмов, несущих протективные вирусные антигены, предназначенные для вакцинопрофилактики вирусных инфекций.

Технической задачей изобретения является разработка эффективного препарата для иммунопрофилактики вирусных инфекций (противовирусных вакцин) на основе живых рекомбинантных штаммов *Salmonella* в виде суппозитория.

Поставленная задача решается путем разработки технологии получения и состава суппозитория для ректального введения, содержащих аттенуированную живую культуру клеток рекомбинантных штаммов сальмонелл, несущих гены протективных вирусных антигенов, введенных в суппозиторную основу.

Ректальный путь открывает возможность введения в организм лекарственных веществ, разрушающихся в желудке или кишечнике. А для аттенуированных сальмонелл физиологичной является среда с pH 6,8-7,2, таким образом, среда прямой кишки в минимальной степени будет влиять на проявление биологической активности вакцинного штамма.

Для решения поставленной задачи изучена динамика накопления биомасс сальмонелл, несущих протективные антигены ВИЧ и гепатита В, - *Salmonella enteritidis* E-23/ pGEX-2T-TBI, *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI, *Salmonella typhimurium* T-10/pKHBc в процессе ферментации. Показано, что активное деление клеток продолжается до ОП=2,0. При этом плазмиды стабильно сохраняются в штаммах. После культивирования титр клеток сальмонелл в культуральной жидкости должен быть не ниже 10^6 .

В процессе изготовления ДНК-вакцины в виде суппозитория, содержащих живые клетки рекомбинантных штаммов сальмонелл, изучено влияние основы и температуры введения нативной биомассы в суппозиторную основу на жизнеспособность клеток. Показано, что вид основы и природа вспомогательных веществ оказывает существенное влияние на жизнеспособность клеток суппозитория. Из данных, приведенных в Таблице 1, видно, что наилучшую жизнеспособность клеток обеспечивает использование гидрофобных (жировых) основ. В основе гидрофильного типа отсутствуют жизнеспособные клетки. Основы №2 и №6 обладают плохой текучестью. Введение в основу в качестве вспомогательного вещества Твина-80 действует губительно на жизнеспособность клеток сальмонелл в суппозиториях. При изготовлении суппозитория наблюдается отсутствие жизнеспособных клеток при введении клеток в суппозиторную основу при температуре 50°C. Сохраняется же жизнеспособность при внесении клеток в основу при температуре до 45°C.

Таблица 1.

Влияние вида основы и температуры введения нативной биомассы в
суппозиторную основу на жизнеспособность клеток

Обра- Зец	Состав основы	Жизнеспособность клеток при температуре введения биомассы в основу, <i>Salmonella</i>	
		45 C	50 C
1.	ТКЖ Эмульгатор Т2	$7,0 \cdot 10^8$	Отсутствует
2.	Кулинарный жир "Фритюрный" Эмульгатор Т2 Масло какао Парафин	$3,0 \cdot 10^8$	Отсутствует
3.	Твердый кулинарный жир Парафин Эмульгатор Т2	$4,0 \cdot 10^7$	Отсутствует
4.	Твердый кулинарный жир Парафин Твин-80	Отсутствует	Отсутствует
5.	Твердый кулинарный жир ПЭГ-1500 Эмульгатор Т2	$5,0 \cdot 10^8$	Отсутствует
6.	ПЭГ - 1500 ПЭГ - 400	Отсутствует	Отсутствует

В одной дозе препарата (одной суппозитории массой 2 г) содержится $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^9$ живых клеток *Salmonella enteritidis* E-23/pGEX-2T-TBI или *Salmonella enteritidis* E-23/pcBMA-TC1 или *Salmonella typhimurium* T-10/HBc.

Согласно проведенным исследованиям суппозитории готовят на жировой основе, например с использованием кулинарного жира "Фритюрный" или гидролизованного хлопкового масла (ГХМ), или смеси твердого кулинарного жира, масла какао с добавлением твердого нефтяного парафина и эмульгатора Т-2 путем выливания в суппозиторные формы расплавленной массы, содержащей культуры клеток сальмонелл. Оптимальной температурой введения биомассы в суппозиторную основу является температура 39 - 45°C.

Суппозитории для иммунопрофилактики вирусных инфекций содержат компоненты в следующем соотношении на одну свечу массой 2 г, мас. %:

суспензию клеток рекомбинантного аттенуированного штамма *Salmonella*, несущего гены протективного вирусного антигена, в количестве 10^6 - 10^9 живых клеток - 1%; жировую основу - 94% и эмульгатор Т-2 - 5%. При этом в качестве жировой основы может быть использован твердый кулинарный жир (94%), или гидролизованное хлопковое масло (94%), или смесь кулинарного жира "Фритюрный" (60%), масла какао (24%) и твердого нефтяного парафина (10%).

В процессе изготовления вакцины в виде суппозиторий, содержащих клетки рекомбинантных сальмонелл, возникает проблема хранения в течение длительного времени, стандартизации и стабильности биомассы. Необходимым условием является то, что клетки рекомбинантной сальмонеллы должны быть в состоянии активного деления, т.е. в фазе логарифмического роста. Решением этой проблемы является лиофилизация биомассы.

На жизнеспособность микроорганизмов в процессе лиофилизации оказывает существенное влияние состав защитной среды. В экспериментах использовались следующие защитные среды: сахарозо-желатиновая (СЖ), молочно-глюкозная (МГ), сахарозо-желатиновая с тиомочевинной (СЖТ). Образцы биомассы рекомбинантных

штаммов *Salmonella*, лиофилизированные с различными защитными средами, охарактеризованы по жизнеспособности и стабильности. Данные приведены в Таблице 2.

Таблица 2

Жизнеспособность и стабильность биомассы рекомбинантных штаммов <i>Salmonella</i> , лиофилизованной с различными защитными средами						
Наименование биомассы. Защитные среды.	1 месяц		3 месяца		6 месяцев	
	Жизнеспособность	Стабильность	Жизнеспособность	Стабильность	Жизнеспособность	Стабильность
Sal.ent. E23 DNA-TCI Среда СЖ	4,0.10 ⁹	100%	2,1.10 ⁹	100%	2,0.10 ⁸	100%
Sal.ent. E23 DNA-TCI Среда МГ	4,0.10 ⁹	100%	3,3.10 ⁸	100%	2,7.10 ⁸	100%
Sal.ent. E23 DNA-TCI Среда СЖТ	1,8.10 ⁹	100%	6,0.10 ⁸	100%	5,8.10 ⁸	100%
Sal.ent. E23 pKHBc Среда СЖ	4,3.10 ⁹	100%	4,7.10 ⁹	100%	4,0.10 ⁹	100%
Sal.ent. E23 pKHBc Среда МГ	5,3.10 ⁹	100%	4,8.10 ⁹	100%	3,5.10 ⁹	100%
Sal.ent. E23 pKHBc Среда СЖТ	4,0.10 ⁹	100%	3,5.10 ⁹	100%	7,8.10 ⁸	100%

Приведенные в Таблице 2 данные показывают, что лиофилизованная биомасса рекомбинантных сальмонелл хранится без потери клетками жизнеспособности и стабильности в течение 6 месяцев, однако при процессе лиофилизации предпочтительнее использовать среды СЖ или МГ.

Более того, показано, что суппозитории, изготовленные с использованием лиофилизованной биомассы, могут храниться в течение 6 месяцев при t 4-8 С°, при этом клетки не теряют жизнеспособности и стабильности штамма (см. Таблицу 3).

Таблица 3

Изучение стабильности и жизнеспособности лиофилизированных клеток рекомбинантных штаммов <i>Salmonella</i> в суппозиториях						
Наименование биомассы. Защитные среды.	1 месяц		3 месяца		6 месяцев	
	Жизнеспособность	Стабильность	Жизнеспособность	Стабильность	Жизнеспособность	Стабильность
Sal.ent. E23 DNA-TCI Среда МГ	8,0.10 ⁶	100%	1,0.10 ⁶	100%	1,2.10 ⁶	100%
Sal.ent. E23 pKHBc Среда МГ	3,5.10 ⁸	100%	2,7.10 ⁷	100%	1,5.10 ⁷	100%

В ходе доклинических исследований на мышах и морских свинках показано формирование иммунитета против заражения ВИЧ и гепатита В путем образования в организме животных специфических антител и формирования клона клеток памяти. Максимальное увеличение титра антител достигается на 28 сутки и сохраняется в течение недели при однократной иммунизации. При двукратной иммунизации, проведенной на 28 сутки после первой, максимальный титр антител регистрируется на 42-56 сутки. В проведенных доклинических испытаниях, выполненных в соответствии с Правилами проведения государственных испытаний и регистрации новых медицинских иммунобиологических препаратов (СП 3.3.2.561-96), показано отсутствие выраженных отклонений в состоянии жизненно важных органов, гематологических, морфологических показателях, отсутствие алергизирующей активности, что свидетельствует о безвредности и хорошей переносимости вакцин.

Изобретение иллюстрируется следующими графическими изображениями.

Фиг.1. Анализ системного гуморального ответа к очищенному вирусу ВИЧ-1 сывороток мышей, иммунизированных штаммом *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI по данным ИФА.

■ *S.enteritidis* E-23/pcDNA-TCI

□ *S.enteritidis* E-23

Фиг.2. Анализ системного гуморального ответа к очищенному белку TCI сывороток мышей, иммунизированных штаммом *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI по данным ИФА.

■ *S.enteritidis* E-23/ pcDNA-TCI

□ *S.enteritidis* E-23

Фиг.3 Иммуноферментный анализ к HBcAg сывороток мышей, иммунизированных суппозиториями, содержащими *Salmonella typhimurium* T10 pKHBc.

Для лучшего понимания сущности изобретения ниже следуют примеры его конкретного выполнения.

Пример 1. Культивирование рекомбинантных штаммов сальмонелл. Культивирование рекомбинантных штаммов *Salmonella enteritidis* E-23/pGEX-2T-TBI или *Salmonella*

enteritidis E-23/pcDNA-TCI или *Salmonella typhimurium* T-10/pKHBc проводят на среде ЕВ с ампициллином. Перед культивированием проводят трансформацию клеток сальмонелл путем электропорации. Для этого "ночную" культуру *Salmonella enteritidis* E-23 или *Salmonella typhimurium* T-10 разводят в соотношении 1: 100 L-бульоном и подрашивают в среде LB без ампициллина на качалке при температуре $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ до оптической плотности $D_{550}=0,2$. Клеточную суспензию охлаждают во льду 20 мин и центрифугируют 2 мин при 6000 об/мин. После отмывки водой осадок клеток ресуспендируют в 40 мкл 10%-го раствора глицерина, вносят 1 мкл плазмидной ДНК pGEX-2T-TBI или pcDNA-TCI или pKHBc, инкубируют во льду 2 мин и проводят электрополюцию с использованием прибора "ЭкюБио" ЛТД. Время импульса 4 сек, напряжение 2500 В. После электрополюции в эту же кювету добавляют 300 мкл L-бульона и инкубируют 1 ч при температуре $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Полученные трансформанты высевают на плотную среду L-агар с ампициллином и выращивают в течение суток при температуре $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$. После проверки на наличие плазмиды проведенные клоны штамма-продуцента культивируют на среде LB с ампициллином на термостатированной качалке при температуре $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ с частотой вращения 200 об/мин. Выращивание продолжается 3-4 ч до достижения оптической плотности $D_{550}=2,0$. После культивирования в культуральной жидкости определяют титр клеток, который не должен быть ниже 10^6 . Центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин отделяют биомассу клеток рекомбинантных сальмонелл, которую используют для приготовления суппозитория.

Пример 2. Приготовление суппозитория Сал-ВИЧ "Б", содержащего живые клетки аттенуированного рекомбинантного штамма *Salmonella enteritidis* E-23/pGEX-2T-TBI.

Компоненты основы суппозитория в виде навесок (кулинарный жир "Фритюрный" - 300,0 $\pm$ 1,0 г, эмульгатор Т2 - 25,0 $\pm$ 0,1 г, масло какао - 120,0 $\pm$ 0,1 г и парафин - 50,0 $\pm$ 0,1 г) количественно переносят в стакан вместимостью 1 л, который помещают на водяную баню, нагретую до 75°C , и выдерживают до полного расплавления смеси. Стакан с расплавленной основой помещают в смеситель-гомогенизатор и перемешивают при 200 об/мин до получения однородной массы. Основу охлаждают при постоянном перемешивании до температуры $(39\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Биомассу клеток *Salmonella enteritidis* E-23/pGEX-2T-TBI соединяют с 5 мл стерильной очищенной воды и ресуспендируют до получения однородной суспензии, которую вводят в охлажденную суппозиторную основу, тщательно перемешивая до получения однородной массы. Суппозиторную массу выливают в подготовленные формы и охлаждают при температуре минус $(15\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин.

Пример 3. Приготовление суппозитория Сал-ВИЧ "Д", содержащего живые клетки аттенуированного рекомбинантного штамма *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI.

Компоненты основы суппозитория в виде навесок (твердый кулинарный жир - 470,0 $\pm$ 1,0 г и эмульгатор Т2 - 25,0 $\pm$ 0,1 г) количественно переносят в стакан вместимостью 1 л, который помещают на водяную баню, нагретую до 55°C , и выдерживают до полного расплавления смеси. Стакан с расплавленной основой помещают в смеситель-гомогенизатор и перемешивают при 200 об/мин до получения однородной массы. Основу охлаждают при постоянном перемешивании до температуры $(39\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Биомассу клеток *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI соединяют с 5 мл стерильной очищенной воды и ресуспендируют до получения однородной суспензии, которую вводят в охлажденную суппозиторную основу, тщательно перемешивая до получения однородной массы. Суппозиторную массу выливают в подготовленные формы и охлаждают при температуре минус $(15\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин.

Пример 4. Определение жизнеспособных клеток в суппозиториях.

Одну суппозиторию весом 2,0 г, содержащую клетки аттенуированного штамма *Salmonella enteritidis* E-23 со встроенной плазмидой pcDNA-TCI или pGEX-2T-TB, размягчают при 37°C в фосфатном буфере до однородного состояния и готовят 10-ти кратные разведения суспензии. Из растворов 6-го, 7-го и 8-го разведения делают высевы по 100 мкл на чашках Петри с L-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина, и

термостатируют сутки при 37°C. По истечении времени проводят визуально подсчет количества колоний на чашках. Количество жизнеспособных колоний рекомбинантных сальмонелл в суппозитории (X) находят по формуле:

$$X = \frac{N \times 10^P}{V_p},$$

где: X - количество жизнеспособных колоний;

N - количество колоний;

10^P - номер разведения;

10 V_p - объем высеваемого разведения, мкл; (100 мкл).

Количество жизнеспособных колоний в суппозитории после подсчета составляет от 10⁶ до 10⁹.

Пример 5. Определение токсичности препаратов суппозиторияев.

Суппозитории весом 100 мг, содержащие от 10⁶ до 10⁹ клеток *Salmonella enteritidis* E-23/pGEX-2T-TBI или *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI вводят не менее чем 5 морским свинкам (весом 250-350 г), однократно в прямую кишку на глубину 0,5-1 см и фиксируют в течение 2-3 мин. В течение первых суток и на протяжении 7 суток после введения суппозиторияев проводят ежедневное визуальное обследование животных, оценивая их внешний вид, подвижность, измеряют массу тела. В течение всего периода наблюдения ни одно животное не погибло, визуально регистрируемых признаков интоксикации и снижения массы тела животных не наблюдалось. Таким образом, предложенный препарат не токсичен и безвреден.

Пример 6. Определение специфической активности суппозиторияев, содержащих *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI

Иммунизация. Для иммунизации используют мышей линии BALB/c, весом 12-15 грамм, которые были получены из вивария ГНЦ ВБ "Вектор". Животные содержались на стандартном рационе.

Иммунизацию животных суппозиториями проводят однократно, перректально (один суппозиторий содержит 10⁸ клеток *S. enteritidis* E-23/pcDNA-TCI). Забор крови производят на 0, 7, 14, 21, 28, 35 сутки после введения сальмонелл.

Иммуноферментный анализ. Специфичность образующихся антител в сыворотках мышей анализируют с помощью ИФА. Для выявления антител против ВИЧ-1 используют очищенный инактивированный вирус ВИЧ-1 и очищенный белок TCI. В каждом эксперименте берут образцы крови от трех животных. После получения сыворотки образцы смешивают, после чего определяют титр специфических антител. Титр определяют как превышение титра сывороток мышей, иммунизированных суппозиториями, содержащими *S. enteritidis* E-23/pcDNA-TCI над титром сывороток мышей, иммунизированных суппозиториями с исходным штаммом *S. enteritidis* E-23. На каждую точку делают два повтора. Результаты представлены на фиг. 1, 2. Начиная с третьей недели после иммунизации мышей суппозиториями *S. enteritidis* E-23/pcDNA-TCI обнаруживается продукция IgG к ВИЧ-1, причем продукция антител остается на высоком уровне на протяжении всего срока наблюдения.

Определение количества CTL лимфоцитов на основе реакции ELISPOT

При постановке реакции ELISPOT на первом этапе проводят сорбцию анти-INF-γ МАТ с концентрацией 5 мкг/мл на лунку 96-луночного планшета ImmunoSpot M200. После инкубации в течение 12 ч при 4°C каждую лунку дважды промывают раствором PBS и блокируют средой RPMI 1640, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, в течение 2 ч. В качестве клеток-эффекторов используют спленоциты иммунизированных животных в концентрации 10⁶ мл. Для стимуляции продукции INF-γ суспензией клеток используют белок TCI (1 мкг/мл) и два пептида: N15 (DRVIEVVQGAYRAIR), N16 (KQIINMWQEVGKAMYA), для оценки неспецифической продукции используют пептид EHEC (отрицательный контроль). Клетки культивируют в присутствии 5% CO₂ при 37°C в течение 24 ч. INF-γ-секретирующие клетки визуализируют, используя 0,5 мкг/мл

биотинилированных анти- INF- γ антитела и 0,25 мкг/мл конъюгата Avidin-HRP. Окрашивание производят добавлением субстратов для пероксидазы (4-хлор-1-нафтол, диаминобензидин фосфат). Реакцию останавливают удалением реагентов, лунки промывают 3 раза дистиллированной водой. Подсчет количества INF- γ -продуцирующих клеток осуществляют с помощью микроскопа. Результаты экспериментов сведены в Таблицу 4.

Таблица 4

Результаты оценки цитотоксических Т-лимфоцитов животных, иммунизированных суппозиториями, содержащими *S. enteritidis* E-23/pcDNA-TCI в ELISPOT

Антиген	Срок от начала иммунизации (сут) / количество INF-гамма-продуцирующих клеток			
	7	10	14	21
TCI	120	230	150	143
P15	110	220	128	125
P16	107	217	129	127
EHES	10	7	5	4

Пример 7. Оценка вируснейтрализующей активности сывороток.

Вируснейтрализующую активность сывороток определяют методом учета ингибирования репродукции вируса ВИЧ-1 по снижению его инфекционного титра. Для этого используют перевиваемые лимфобластоидные клетки человека МТ-4. Клетки культивируют в концентрации $3,0-5,0 \times 10^5$ клеток в 1 мл среды RPMI 1640 с 10% сыворотки эмбрионов коров, 100 мкг/мл гентамицина. В реакции вируснейтрализации используют штамм ВИЧ-1_{899A} (тип Х4, субтип В), полученный из коллекции штаммов вирусов иммунодефицита человека НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Множественность заражения составляет 100 ТЦД₅₀. Сыворотки инактивируют на водяной бане при температуре 56°C в течение 30 мин. В лунки пластиковой 96-луночной панели («Costar», США) вносят по 50 мкл следующих разведений сывороток: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, т.д. и добавляют 50 мкл суспензии вируса. Смесь инкубируют в течение 1 ч при 37°C. После инкубации вносят по 100 мкл взвеси чувствительных клеток МТ-4 в количестве $90-100 \times 10^3$ кл/лунку.

Панель инкубируют при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 98% влажности в течение 5-7 суток до момента учета результатов. В качестве контролей используют: «контроль вируса» - вирус с добавлением среды без сыворотки, «контроль клеток» - клетки в питательной среде, «контроль цитотоксичности сывороток» - клетки + сыворотки. Учет результатов проводят на 5-7 день после начала эксперимента. Ингибирование репродукции вируса оценивают по снижению его инфекционного титра, который определяют по ТЦД₅₀ (50% тканевая цитопатическая доза). Данные по определению нейтрализующих титров антител в сыворотках крови иммунных животных сведены в Таблицу 5.

Таблица 5

Нейтрализующая активность сывороток

группы животных	Срок от начала иммунизации (сут) и Титры нейтрализующих антител			
	0	7	14	21
Сыворотка мышей, иммунизированных суппозиториями <i>S. Enteritidis</i> E-231 pcDNA-TCI	0	1:20	1:80	1:640
Сыворотка мышей, иммунизированных суппозиториями <i>S. Enteritidis</i> E-23	0	0	0	0

Данные, представленные в Таблице 5, свидетельствуют о том, что образующиеся после введения суппозиториями *S. enteritidis* E-231 pcDNA-TCI антитела обладают вируснейтрализующей активностью.

Таким образом, суппозитории, содержащие *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCI при введении животным индуцирует выраженный специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ к ВИЧ-1. Предложенные суппозитории могут быть использованы в

качестве живой ДНК- вакцины против ВИЧ-1.

Пример 8. Определение специфической активности суппозитория, содержащих *Salmonella typhimurium* T10 pKHBc.

Иммунизация. Для иммунизации используют мышей линии BALB/c, весом 12-15 грамм, полученных из вивария ГНЦ ВБ "Вектор". Животные содержались на стандартном рационе.

Иммунизацию мышей проводят введением суппозитория перектально, двукратно с интервалом 3 недели. Доза *S. typhimurium* T10 pKHBc составляет 10^7 клеток на суппозиторий. Забор крови производят через 14, 21, 28, 36 и 44 дней после первого введения сальмонелл.

Иммуноферментный анализ. Специфичность образующихся антител в сыворотках мышей анализируют с помощью ИФА. Для выявления антител против HBcAg используют очищенный рекомбинантный HBcAg. В каждом эксперименте берут образцы от трех животных. Эти образцы смешивают, после чего определяют титр специфических антител. Титр определяют как превышение титра сывороток мышей, иммунизированных суппозиториями, содержащими *Salmonella typhimurium* T10 pKHBc, над титром сывороток мышей, иммунизированных суппозиториями с исходным штаммом *Salmonella typhimurium* T10. На каждую точку делают два повтора. Результаты представлены на фиг.3.

Реакция бласттрансформации. Реакцию бласттрансформации спленоцитов проводят через 81 день после первого введения сальмонелл по ранее описанной методике [18]. В качестве специфического антигена используют HBcAg, в качестве неспецифического антигена - вирус энтерита норки. В лунку планшета вносят по 100 мкл каждого компонента. Концентрация антигенов равна 2 мкг/мл. В качестве митогена используют конканавалин А (производства "Sigma", США) в концентрации 5 мкг/мл. Клетки, стимулированные антигенами, инкубируют в течение 78 ч. За 18 ч до окончания срока инкубации вносят ^3H -тимидин (Санкт-Петербург) в дозе 2 мКи на лунку. Клеточный ответ оценивают по показателю индекса стимуляции, который характеризует отношение пролиферации спленоцитов, индуцированных специфическими антигенами к спонтанной пролиферации спленоцитов (Таблица 6). Формирование клона спленоцитов, сенсibilизированных к HBcAg, регистрируется в группе животных, иммунизированных суппозиториями с *S. typhimurium* T10/pKHBc. Индекс стимуляции в группе *S. typhimurium* T10/pKHBc достоверно превосходит таковой как в контрольной группе *S. typhimurium* T10, так и при стимуляции спленоцитов гетерологичным антигеном - вирусом энтерита норки. Способность спленоцитов отвечать на стимуляцию HBcAg на 81-й день от начала иммунизации *S. typhimurium* T10/pKHBc свидетельствует о формировании специфической клеточной памяти.

Таблица 6			
Пролиферативная активность спленоцитов мышей, иммунизированных суппозиториями, несущими рекомбинантные сальмонеллы (индекс стимуляции) на 81 день после начала иммунизации			
	Антиген	Антиген	Митоген
Группа животных	HBcAg	Вирус энтерита норки	Конканавалин А
<i>S. typhimurium</i> T-10	1,0	0,9	7,4
<i>S. typhimurium</i> T-10/pKHBc	3,3	1,0	7,5

Приведенные данные свидетельствуют о том, что суппозитории, содержащие *Salmonella typhimurium* T10/pKHBc, при введении животным индуцируют выраженный специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ к HBcAg. Предложенные суппозитории могут быть использованы в качестве живой вакцины против гепатита В.

Пример 9. Приготовление суппозитория из лиофилизированной биомассы аттенуированного рекомбинантного штамма *Salmonella typhimurium* T-10/pKHBc.

Компоненты основы суппозитория в виде навесок подготавливают, как описано в Примерах 2 или 3. Стакан с расплавленной основой помещают в смеситель-гомогенизатор и перемешивают при 200 об/мин до получения однородной массы. Основу охлаждают при постоянном перемешивании до температуры $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$. Флаконы (2-3 флакона) с лиофилизированной биомассой *Salmonella typhimurium* T-10/pKHBc (титр жизнеспособных

клеток должен быть 10^9 - 10^{11} КОЕ/мл) вскрывают в асептических условиях и тщательно растирают таблетки до получения сыпучего порошка без комочков. Таким образом, впервые получены суппозитории для иммунопрофилактики вирусных инфекций, содержащие живые аттенуированные рекомбинантные штаммы сальмонелл, несущие протективные вирусные антигены, индуцирующие при введении животным выраженный специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ к соответствующему вирусному антигену, которые могут быть использованы в качестве живых противовирусных вакцинных препаратов.

Пример 10. Определение специфической активности суппозитория, содержащих *Salmonella enteritidis* E23/pGEX-2T-TBI.

Рекомбинантный штамм *Salmonella enteritidis* E23/pGEX-2T-TBI продуцирует полиэпитопный белок gst-TBI, состоящий из В- и Т-клеточных эпитопов ВИЧ-1 [8].

Иммунизация. Для иммунизации используют мышей линии BALB/c, весом 12-15 грамм, полученных из вивария ГНЦ ВБ "Вектор". Животные содержались на стандартном рационе.

Иммунизацию мышей проводят введением суппозитория перектально. Доза *Salmonella enteritidis* E23/pGEX-2T-TBI составляет 10^9 клеток на суппозиторий. В качестве положительного контроля животных иммунизируют белком gst-TBI с ПАФ (полный адъювант Фрейнда) внутримышечно однократно. Забор крови производят через 2, 6 и 12 недель после введения сальмонелл.

Иммуноферментный анализ. Специфичность образующихся антител в сыворотках мышей анализируют с помощью ИФА. Для выявления антител против ВИЧ-1 используют очищенный рекомбинантный белок gst-TBI и лизат ВИЧ-1_{899A} (тип Х4, субтип В), полученный из коллекции штаммов вирусов иммунодефицита человека НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН. В каждом эксперименте берут образцы от трех животных. Эти образцы смешивают, после чего определяют титр специфических антител. На каждую точку делают два повтора. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 Развитие ВИЧ-специфического гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных клетками рекомбинантной сальмонеллы, продуцирующей TBI						
Группа	2-я неделя титр		6-я неделя титр анти-TBI		12-я неделя титр анти-TBI	
	Анти - TBI	Анти-ВИЧ-1	анти-TBI	анти-ВИЧ-1	анти-TBI	Анти-ВИЧ-1
Белок gst-TBI	1:600	1:300	1:3650	1:1200	1:2150	1:600
<i>S. enteritidis</i> E23/ pGEX-2T-TBI rectal	1:300	1:100	1:1450	1:600	1:800	1:400
<i>S. enteritidis</i> E23 rectal (contr)	1:100	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50

Реакция бласттрансформации. Реакцию бласттрансформации спленоцитов проводят через 6 недель после введения сальмонелл по ранее описанной методике [18]. В качестве специфического антигена используют gst-TBI и лизат ВИЧ-1 в качестве неспецифического антигена - вирус энтерита норки. В лунку планшета вносят по 100 мкл каждого компонента. Концентрация антигенов равна 2 мкг/мл. В качестве митогена используют конканавалин А (производства "Sigma", США) в концентрации 5 мкг/мл. Клетки, стимулированные антигенами, инкубируют в течение 78 ч. За 18 ч до окончания срока инкубации вносят ^3H -тимидин (Санкт-Петербург) в дозе 2 мКи на лунку. Клеточный ответ оценивают по показателю индекса стимуляции, который характеризует отношение пролиферации спленоцитов, индуцированных специфическими антигенами, к спонтанной пролиферации спленоцитов (Таблица 8). Формирование клона спленоцитов, сенсibilизированных к gst-TBI, регистрируется в группе животных, иммунизированных суппозиториями с *S. enteritidis* E23/pGEX-2T-TBI. Индекс стимуляции в группе *S. enteritidis* E23/pGEX-2T-TBI достоверно превосходит таковой как в контрольной группе *S. typhimurium* 7207, так и при стимуляции спленоцитов гетерологичным антигеном - вирусом энтерита норки. Способность спленоцитов отвечать на стимуляцию gst-TBI на 6 неделе от начала иммунизации с *S. enteritidis* E23/pGEX-2T-TBI свидетельствует о формировании специфической клеточной памяти.

Индукция Т-клеточного ответа. Индекс стимуляции

Таблица 8

Группа животных, иммунизированных рекомбинантной сальмонеллой	Лизат ВИЧ-1	gst-TBI	антиген вируса энтерита норок	ConA
S. enteritidis E23/pGEX-2T- TBI rectal	3,4	3,5	1,1	7,9
S. enteritidis E23 rectal(contr)	1,1	1,2	1,2	7,9

Примечание. В каждом эксперименте брали клетки от 3-х животных. Погрешность определения индекса стимуляции не более 0,1.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что суппозитории, содержащие с S. enteritidis E23/pGEX-2T-TBI, при введении животным индуцируют выраженный ВИЧ-1 специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Пример 11. Приготовление суппозитория Сал-ВИЧ "Д", содержащего живые клетки аттенуированного рекомбинантного штамма *Salmonella enteritidis* E-23/pсDNA-TCI.

Компоненты основы суппозитория в виде навесок (гидролизованное хлопковое масло (ГХМ) - $425,0 \pm 1,0$ г и эмульгатор Т2 - $25,0 \pm 0,1$ г) количественно переносят в стакан вместимостью 1 л, который помещают на водяную баню, нагретую до 55°C , и выдерживают до полного расплавления смеси. Стакан с расплавленной основой помещают в смеситель-гомогенизатор и перемешивают при 200 об/мин до получения однородной массы. Основу охлаждают при постоянном перемешивании до температуры $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$. Биомассу клеток *Salmonella enteritidis* E-23/pсDNA-TCI вводят в охлажденную суппозиторную основу порциями при перемешивании, суспендируют до получения однородной суспензии. Суппозиторную массу выливают в подготовленные формы и охлаждают при температуре минус $(15 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 60 мин. Количество жизнеспособных колоний в суппозитории после подсчета составляет от $1,1 \times 10^6$ до 4×10^8 .

Таким образом, впервые получены суппозитории для иммунопрофилактики вирусных инфекций, содержащие живые аттенуированные рекомбинантные штаммы сальмонелл, несущие протективные вирусные антигены, индуцирующие при введении животным выраженный специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ к соответствующему вирусному антигену, которые могут быть использованы в качестве живых противовирусных вакцинных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Международная заявка WO №98/48026, кл. C12N 15/74, опублик. 1998 г.
2. Международная заявка WO №0014240, кл. C12N 15/31, опублик. 2000 г.
3. Патент РФ №2192277, кл. A61K 39/12, опублик. БИ №31 за 2002 г.
4. Патент РФ №2192886, кл. A61K 39/19, опублик. БИ №32 за 2002 г.
5. Патент РФ №2223784, кл. A61K 39/385, опублик. БИ №4 за 2004 г.
6. Eroshkin A.M., Karginova E.A., Gileva I.P. et al. Design of four-helical protein as a candidate for HIV vaccine. // Protein Engineering-1995 - 8 - p.167-173.
7. Некрасова Н.А., Игнатьев Г.М., Агафонов А.П., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Исследование системного и мукозального иммунного ответа при иммунизации мышей кандидатной ВИЧ-1 вакциной. // Сибирский медицинский журнал. - 2004. - Т.19. - С.60-62.
8. Карпенко Л.И., Игнатьев Г.М., Агафонов А.П., Порываева В.А., Лебедев Л.Р., Веремейко Т.А., Некрасова Н.А., Климов Н.А., Козлов А.П., Ильичев А.А. Конструирование и исследование антигенных свойств рекомбинантного штамма сальмонеллы, продуцирующей белок TBI. // Вопросы вирусологии - 2002 - N.2 - С.25-28.
9. Заявка на патент РФ №2003111095/13 от 17.04.2003 г. "Рекомбинантная плазмидная ДНК pсDNA-TCI, обеспечивающая экспрессию искусственного гена TCI в клетках эукариот, и рекомбинантный аттенуированный штамм бактерий *Salmonella enteritidis* E-23/pсDNA-TCI как кандидат для конструирования живой ДНК-вакцины против ВИЧ".
10. Nardelli-Haeftiger D., Kraehenduhl J.P, et al. Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated *Salmonella typhi* vaccine strain. Infect. Immun. - 1996 - v.64 - p.5219-5224.
11. Патент РФ №2216590, кл. C12N 1/21, опублик. БИ №32 за 2003 г.
12. Карпенко Л.И., Игнатьев Г.М., Кожина Е.М. и др. Получение и исследование рекомбинантных штаммов *Salmonella typhimurium* SL 7207, продуцирующих HbcAg HbcAg-

HBs. Вопросы вирусологии - 2000 - №2 - с.43-46.

13. Gregg M.R., Jack D.B., Smith S.R., Kendall M.J. The pharmacokinetics of oxprenolol following oral and rectal dosing-a comparison of delivery systems and routes of administration. // J Clin Pharm Ther. 1987 Apr; 12 (2): 91-9.

14. Патент РФ №2224542, кл. А61К 39/116, опубл. БИ №6 за 2004 г.

15. Патент РФ №2185842, кл. А61К 35/74, опубл. БИ №21 за 2002 г.

16. Патент РФ №2228738, кл. А61К 9/02, опубл. БИ №15 за 2004 г.

17. Патент РФ №2073520, кл. А61К 35/74, опубл. БИ №5 за 1997 г.

18. Хоробрых В.В., Пронин А.В., Киркин А.Ф., Санин А.В. Методы постановки реакции бласттрансформации в микромодификации // Иммунология. - 1983. - №3. - С.76-79.

Формула изобретения

1. Суппозитории для иммунопрофилактики вирусных инфекций, содержащие аттенуированную живую культуру клеток рекомбинантных штаммов *Salmonella*, трансформированных рGEX-2T-TBI, рсDNA-TCI или рKHBc, несущих гены протективных вирусных антигенов, гидрофобную суппозиторную основу и эмульгатор Т2 при следующем соотношении компонентов на одну свечу массой 2 г, мас. %:

Суспензия живых клеток в количестве $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^9$	1
Гидрофобная суппозиторная основа	94
Эмульгатор Т2	5

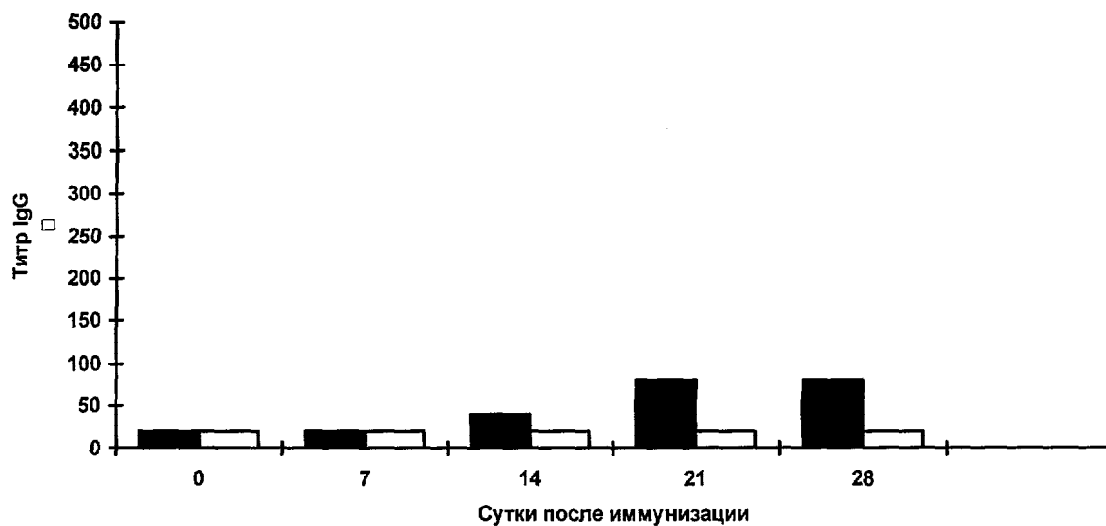
2. Суппозитории по п.1, отличающиеся тем, что в качестве аттенуированной живой культуры клеток рекомбинантных штаммов сальмонелл содержат лиофилизированную биомассу рекомбинантных микроорганизмов.

3. Суппозитории по п.1, отличающиеся тем, что в качестве гидрофобной суппозиторной основы содержат твердый кулинарный жир (ТКЖ) или гидролизованное хлопковое масло (ГХМ) при следующем соотношении компонентов, мас. %:

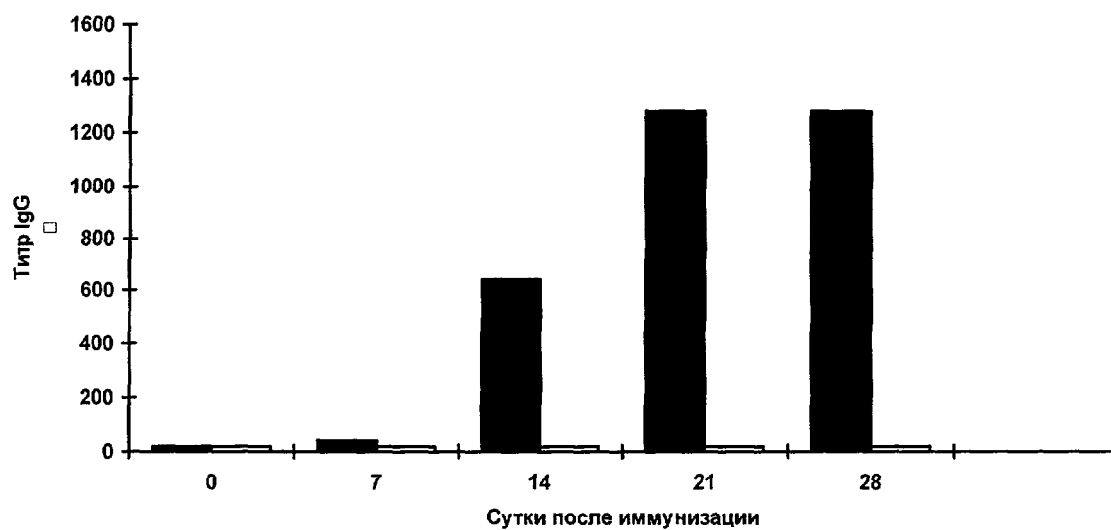
Суспензия живых клеток в количестве $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^9$	1
ТКЖ или ГХМ	94
Эмульгатор Т2	5

4. Суппозитории по п.1, отличающиеся тем, что в качестве гидрофобной основы содержат смесь кулинарного жира "Фритюрный", масло какао и твердый парафин при следующем соотношении компонентов, мас. %:

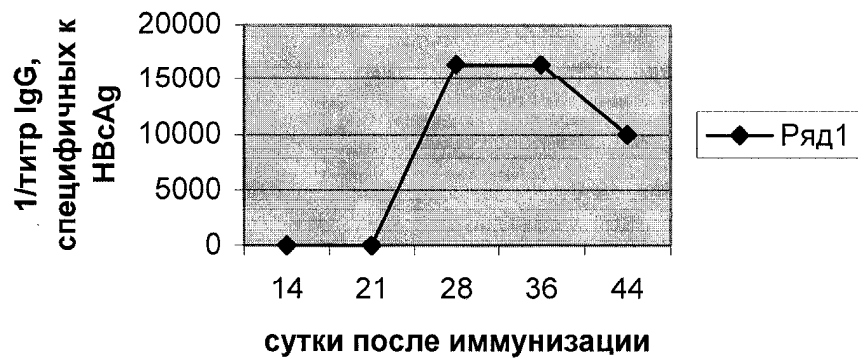
Суспензия живых клеток в количестве $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^9$	1
Кулинарный жир "Фритюрный"	60
Масло какао	24
Твердый парафин	10
Эмульгатор Т2	5



Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3