

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

ФЕДОРОВА Екатерина Алексеевна

«СОЗДАНИЕ ИММУНОГЕНОВ ПРОТИВ *Mycobacterium tuberculosis*
НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ»

03.01.04 – Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к.б.н. Духовлинов И.В.

Санкт-Петербург

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление	2
Введение	8
Актуальность	8
Степень разработанности темы исследования	8
Цель и задачи исследования	10
Научная новизна	10
Теоретическая и практическая значимость работы	11
Материалы и методы исследования	11
Объем и структура диссертации	13
Положения, выносимые на защиту	13
Степень достоверности и апробация результатов	13
1. Обзор литературы	15
1.1. Туберкулез: введение в проблематику	15
1.1.1. Историческая справка о туберкулезе	15
1.1.2. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в мире и в России в настоящее время	17
1.1.3. Возбудитель туберкулеза	20
1.1.3.1. Краткая характеристика микобактерий туберкулезного комплекса	20
1.1.3.2. Геном микобактерии туберкулезного комплекса	21
1.1.3.3. Лекарственная устойчивость <i>M. tuberculosis</i>	23
1.1.3.4. Строение клеточной стенки	25
1.1.4. Инфицирование человека <i>M. tuberculosis</i>	27
1.2. Профилактика туберкулеза	28
1.2.1. Историческая справка по методам борьбы с инфекциями	28
1.2.2. Механизм действия вакцин	30
1.2.3. Обоснование выбора стратегии профилактики инфицирования <i>M. tuberculosis</i>	34
1.2.4. Вакцинация против туберкулеза в настоящее время	35
1.2.5. Современный взгляд на вакцинацию против туберкулеза	38
1.2.6. Кандидатные вакцины против туберкулеза, в отношении которых проводят клинические исследования	40
1.2.6.1. Вакцинные кандидаты в III фазе клинических исследований	41
1.2.6.2. Вакцинные кандидаты во II фазе клинических исследований	41
1.2.6.3. Вакцинные кандидаты в I фазе клинических исследований	43
1.2.7. Кандидатные вакцины против ТБ, исследованные на эффективность	44
1.2.8. Обоснование выбора в качестве иммуногенов предложенных молекул	47

1.2.9. Элементы предлагаемых кандидатных вакцин против туберкулеза	53
1.2.9.1. Антигены <i>M. tuberculosis</i>	53
1.2.9.1.1. Белки антигенного комплекса 85	53
1.2.9.1.2. Секреторный белок TB10.4	56
1.2.9.2. Плазмидная ДНК для доставки иммуногена в организм человека	57
1.2.9.3. Адъювант	59
1.2.9.3.1. Флагеллин	59
1.2.9.3.2. CRM197	60
1.2.9.3.3. IL-7	61
1.2.9.3.4. Гидроксид алюминия	62
1.2.9.4. Нормативная документация по исследуемым объектам	63
2. Материалы и методы	65
2.1. Рекомбинантные плазмидные ДНК	65
2.1.1. Плазмидная ДНК pET-28a(+)	65
2.1.2. Плазмидная ДНК pсDNA3.1(+)	66
2.2. Бактериальные штаммы	68
2.3. Лабораторные животные	69
2.4. Препарат вакцины сравнения	70
2.5. Реакции ферментативной модификации ДНК	71
2.5.1. Синтез и амплификация последовательностей генов	71
2.5.2. Реакция гидролиза ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции	72
2.5.3. Реакция лигирования фрагментов плазмидной ДНК	73
2.6. Микробиологические методы	73
2.6.1. Приготовление компетентных клеток <i>E.coli</i> для трансформации	73
2.6.2. Трансформация клеток <i>E.coli</i>	74
2.6.3. Скрининг клонов <i>E.coli</i> на наличие искомой плазмидной ДНК	74
2.6.4. Индукция экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок FlicAg85bTb10, в штамме-продуценте <i>E.coli</i> , индуктор – ИПТГ	75
2.6.5. Автоиндукция экспрессии гибридного гена в штамме-продуценте <i>E.coli</i> , индуктор - 0.2% лактоза (по методу Штудиера)	75
2.6.6. Создание музейных образцов клеток <i>E.coli</i>	76
2.7. Анализ и очистка нуклеиновых кислот	76
2.7.1. Переосаждение плазмидной ДНК	76
2.7.2. Секвенирование фрагментов ДНК	77
2.7.3. Аналитический электрофорез ДНК в агарозном геле	78

2.7.4. Препаративный электрофорез ДНК и выделение ДНК из агарозного геля	78
2.7.5 Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E.coli</i>	79
2.7.6. Определение концентрации плазмидной ДНК.....	79
2.8. Анализ и очистка рекомбинантных белков	80
2.8.1. Электрофорез белков в денатурирующих условиях по Леммли	80
2.8.2 Определение локализации целевого белка	81
2.8.3. Иммуобилизованная металлоаффинная хроматография.....	81
2.8.4 Гель-фильтрация	82
2.8.5. Определение концентрации белка по методу Бредфорд.....	82
2.8.6. Определение концентрации белка по методу Лоури.....	83
2.8.7. Иммуоферментный анализ.....	83
2.8.7.1. Измерение титров антител	83
2.8.7.2. Измерение концентрации белка.....	84
2.8.8. Вестерн блот	85
2.9. Расчет и анализ с использованием программного обеспечения.....	87
2.9.1. Расчет и анализ белков	87
2.9.2. Расчет и анализ последовательностей ДНК	87
2.9.3. Статистическая обработка результатов исследований.....	88
2.10. Иммунологические методы.....	89
2.10.1. Иммунизация лабораторных животных.....	89
2.10.1.1. Иммунизация мышей	89
2.10.1.2. Иммунизация кроликов	91
2.10.2. Выделение спленоцитов мышей	91
2.10.3. Окрашивание клеточных антигенов.....	92
2.10.4. Анализ с использованием проточного цитофлуориметра.....	93
2.10.5. Оценка протективности по показателям тяжести течения туберкулеза.....	93
2.10.6. Выделение перитонеальных макрофагов.....	95
2.10.7. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.....	95
2.10.8. Получение сывороток	95
3. Результаты и обсуждение	97
3.1. Получение гибридного белка для исследований на лабораторных животных.....	97
3.1.1. Моделирование гибридного белка	97
3.1.2. Получение гена, кодирующего гибридный белок	97
3.1.3. Получение штамма <i>E.coli</i> DH10B/RpET-28a(+) <i>FliCAg85bTb10.4</i>	98
3.1.4. Получение штамма <i>E.coli</i> BL21(DE3)pET-28a(+) <i>FliCAg85bTb10.4</i>	100

3.1.5. Индукция экспрессии гибридного гена	102
3.1.5.1. Индукция экспрессии гибридного гена ИПТГ	102
3.1.5.2. Индукция экспрессии гибридного гена 0,2% лактозой	104
3.1.6. Анализ уровня экспрессии гибридного гена	105
3.1.7. Исследование растворимости гибридного белка	107
3.1.8. Нарботка и очистка гибридного белка.....	109
3.2. Получение плазмидных ДНК для исследований на лабораторных животных	110
3.2.1. Получение генов ag85a и ag85b <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	110
3.2.2. Получение штаммов <i>E.coli</i> DH10B/RpcDNA3.1(+) <i>Ag85a</i> и DH10B/RpcDNA3.1(+) <i>Ag85b</i>	112
3.3. Исследование созданных молекул на лабораторных животных	115
3.3.1. Исследование созданных молекул в модели с использованием <i>M. tuberculosis</i> , устойчивых к противотуберкулезным препаратам	116
3.3.2. Исследование созданных молекул в модели с использованием <i>M. tuberculosis</i> , чувствительных к противотуберкулезным препаратам	121
3.3.2.1. Исследование протективности по показателям тяжести течения туберкулеза, опыт №2	121
3.3.2.2. Исследование протективности по показателям тяжести течения туберкулеза, опыт №3	126
3.3.2.3. Исследование фагоцитоза в культуре перитонеальных макрофагов, опыт №3	131
3.3.2.4. Исследование Т-лимфоцитов, опыт №3.....	135
3.3.2.5. Исследование протективности по показателям тяжести течения туберкулеза, опыт №4	141
3.3.2.6. Исследование Т-лимфоцитов и уровня антител, опыт №5	146
3.3.2.6.1. Исследование субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов	146
3.3.2.6.1. Исследование уровня антител, опыт №5	152
3.3.3. Исследование экспрессии целевого гена при введении плазмидной ДНК, а также антигенности синтезируемого белка, опыт №6.....	159
3.4. Анализ результатов, полученных в моделях с использованием <i>M. tuberculosis</i> , чувствительных и устойчивых к противотуберкулезным препаратам	160
3.4.1. Индекс поражения легких	160
3.4.2. Коэффициент массы легких	161
3.4.3. Коэффициент массы селезенки.....	162
3.4.4. Индекс защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными.....	163

3.5. Анализ результатов, полученных в модели с использованием микобактерий, чувствительных к противотуберкулезным препаратам	164
3.5.1. Влияние добавления адъювантов на показатели тяжести течения инфекции	164
3.5.2. Показатели фагоцитоза в культуре перитонеальных макрофагов	166
3.5.3. Субпопуляционная структура Т-лимфоцитов и способность к синтезу интерферона гамма при стимуляции гибридным белком.....	168
3.5.3.1. Субпопуляционная структура Т-лимфоцитов.....	169
3.5.3.2. Синтез интерферона гамма Т-лимфоцитами	173
3.5.4. Оценка гуморального ответа на разработанные молекулы	177
4. Заключение	180
Выводы	188
Список сокращений и условных обозначений	189
Список литературы	195
Список иллюстративного материала.....	215
Перечень рисунков.....	215
Перечень таблиц.....	221
Приложения	222
1. Аминокислотная последовательность белка FliCAg85bTb10.4.....	222
2. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок FliCAg85bTb10.4	224
3. Хроматограмма ДНК, кодирующей белок FliCAg85bTb10.4	225
3.1. прочитано с использованием прямого праймера (фрагмент)	225
3.2. прочитано с использованием обратного праймера (фрагмент)	227
4. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, выявленных в результате секвенирования, относительно рассчитанной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок FliCAg85bTb10.4 (референсной).....	229
5. Хроматограммы спектра белков анализируемых проб при индукции ИПТГ и 0,2% лактозой синтеза белка FliCAg85bTb10.4.....	233
6. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Ag85a <i>M.tuberculosis</i>	235
7. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Ag85b <i>M.tuberculosis</i>	236
8. Хроматограмма ДНК, кодирующей белок Ag85a <i>M.tuberculosis</i>	237
8.1. прочитано с использованием прямого праймера (фрагмент)	237
8.2. прочитано с использованием обратного праймера (фрагмент)	239
9. Хроматограмма ДНК, кодирующей белок Ag85b <i>M.tuberculosis</i>	241
9.1. прочитано с использованием прямого праймера (фрагмент)	241
9.2. прочитано с использованием обратного праймера (фрагмент)	243

10. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, выявленных в результате секвенирования, относительно рассчитанной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Ag85a (референсной).....	245
11. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, выявленных в результате секвенирования, относительно рассчитанной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Ag85b (референсной)	248
12. Графики распределения популяций Т-лимфоцитов, опыт 5.....	251
12.1. Подготовка к анализу групп.....	251
12.2. Графики распределения популяций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов.....	253
12.2.1. Группа интактных животных	253
12.2.2. Группа контроля заражения	254
12.2.3. Группа БЦЖ, введенной по стандартной методике.....	255
12.2.4. Группа «гибридный белок в/м»	256
12.3. Графики распределения популяций CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ	257
12.3.1. Группа интактных животных	257
12.3.2. Группа контроля заражения	258
12.3.3. Группа БЦЖ, введенной по стандартной методике.....	259
12.3.4. Группа «гибридный белок в/м»	260
12.4. Графики распределения популяций CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ	261
12.4.1. Группа интактных животных	261
12.4.2. Группа контроля заражения	262
12.4.3. Группа БЦЖ, введенной по стандартной методике.....	263
12.4.4. Группа «гибридный белок в/м»	264

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Туберкулез (от лат. *tuberculum* - бугорок) – широко распространенное в мире инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое различными видами микобактерий, как правило, *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) [1]. Туберкулез обычно поражает легкие, реже затрагивая другие органы и системы. Бактерии *M.tuberculosis* передаются воздушно-капельным путем при разговоре, кашле и чихании больного. Возникновение заболевания высоко вероятно в случае длительного контакта с носителем активной формы заболевания в закрытом помещении. За год человек, больной туберкулезом, может инфицировать до 10-15 других людей, с которыми он имеет тесные контакты [2].

Туберкулез является инфекционным заболеванием, вызывающим наибольшее количество случаев с летальным исходом. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2015 г. в мире 10,4 млн. человек заболели туберкулезом, а 1,8 млн. умерли от этой болезни [3]. Лечение туберкулеза осложняется тем, что широко распространены штаммы микобактерий, устойчивые к противотуберкулезным препаратам (ПТП), вызывающие туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). В связи с этим перспективным подходом в борьбе с данным заболеванием является профилактика.

На сегодняшний день единственной зарегистрированной и применяемой вакциной для профилактики туберкулеза в России и за рубежом является вакцина BCG, полученная из аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis* и впервые введенная человеку в 1921 г.. Ограниченная эффективность вакцинации BCG и побочные эффекты обуславливают острую потребность в разработке эффективных и безопасных средств для профилактики туберкулеза. Согласно докладу ВОЗ по туберкулезу 2014 г., новая вакцина, которая поможет предотвратить передачу туберкулеза среди подростков и взрослых в развивающихся странах, будет самым экономически эффективным инструментом в смягчении эпидемии [4].

Степень разработанности темы исследования

По настоящее время детей во всем мире в странах, где ситуация с туберкулезом непростая, прививают вакциной, получаемой на основе аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis*

BCG. Данная вакцина содержит живые микобактерии, которые при введении в организм трансформируются в L-формы и могут длительно, 5—7 лет, сохраняться в организме.

Современные вакцины конструируют по принципам большей безопасности, чем БЦЖ. В настоящее время проводят клинические и доклинические исследования в отношении ряда вакцинных кандидатов, также разрабатываются новые вакцинные кандидаты. Однако, спустя практически 100 лет, важно внедрить в практику вакцину, вызывающую формирование стойкого протективного иммунитета, также обладающую максимальной степенью безопасности и низкой себестоимостью.

Все виды вакцин, не содержащих живые микроорганизмы, являются более безопасными не только из-за отсутствия рисков инфицирования, но и из-за отсутствия рисков развития побочных явлений у людей с мутациями в генах, обуславливающих строение молекул, ключевых для корректного функционирования иммунной системы. Также известно, что белок Hsp65 микобактерий туберкулезного комплекса имеет гомологию с молекулами, представленными в суставах [5], и вызывает формирование адьювантного артрита [6]. Это не позволяет использовать вакцины, его содержащие, то есть как ослабленные штаммы, живые, либо убитые микобактерии, так и лизаты, а также генно-инженерные вакцины, содержащие данный белок.

Самый безопасный вариант – использование вакцин на основе белков и/или ДНК. Достоинства таких вакцин заключаются в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок и/или ДНК, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные молекулы, которые могли бы вызвать нежелательные эффекты в организме введения. Однако их эффективность варьирует и обуславливается массой факторов, одним из самых важных из которых является подбор компонентов. Кроме того, максимально низкой себестоимостью может обладать такая вакцина с минимальным количеством компонентов, а также вакцины на основе плазмидной ДНК.

На данный момент разработано множество вакцинных кандидатов против туберкулеза на основе веществ разной природы, однако таковые, соответствующие указанным выше критериям, немногочисленны. Известно порядка 10 аналогов, над которыми работали исследователи из Китая, Дании, США, Великобритании, Швеции - Li Z. и другие [7], Aagaard C. и другие [8], [9], [10–13], Heath A., De L. [14], Turin E. и другие [15].

Тем не менее, на данный момент не известен безопасный генно-инженерный препарат, содержащий компоненты, активирующие разные звенья иммунной защиты с формированием устойчивого протективного иммунитета к туберкулезной инфекции. Данная работа направлена на поиск решения данной проблемы.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования было создание рекомбинантных иммуногенов против *Mycobacterium tuberculosis*.

Задачи:

1. Разработка молекул для индукции специфичного иммунного ответа против *M. tuberculosis*.
2. Создание штаммов-продуцентов таких молекул.
3. Оптимизация экспрессии гена, кодирующего гибридный белок.
4. Получение высокоочищенного препарата гибридного белка и/или генетических конструкций.
5. Исследование иммуногенности и протективности разработанных молекул на модели туберкулезной инфекции у лабораторных животных (мышей).

Научная новизна

Впервые смоделирован и получен гибридный белок FlicAg85bTb10, для которого впервые продемонстрирована иммуногенность и протективность в отношении *M.tuberculosis*, в модели генерализованного туберкулеза на лабораторных животных. Выявлено, что домены в составе данного гибридного белка активны. Впервые создан штамм-продуцент на основе клеток *Escherichia coli* (*E.coli*) и разработан оптимальный протокол получения и очистки данного белка. Аналогичные действия впервые совершены для плазмидных ДНК pcDNA3.1(+)*ag85a* и pcDNA3.1(+)*ag85b*. Выявлено, что полученная генетическая конструкция способна обеспечивать синтез целевого гена в клетках млекопитающего.

Впервые получены композиция, содержащая плазмидные ДНК pcDNA3.1(+)*ag85a* и pcDNA3.1(+)*ag85b* (далее – «плазмидные ДНК»), композиция, дополнительно содержащая гибридный белок FlicAg85bTb10 (далее – «гибридный белок + плазмидные ДНК»), данное решение описано в евразийской заявке на изобретение №201791906, дата подачи 24.09.2017 г., по которой также ожидаем получить патент), композиция, содержащая данный гибридный белок и адьювант CRM197 (далее – «гибридный белок + CRM197»). Впервые совместно использованы разработанный гибридный белок и IL-7 (далее – «гибридный белок + IL-7»). Данные комбинации молекул использованы впервые в качестве действующего вещества кандидатной вакцины против туберкулеза, причем продемонстрированы их иммуногенность и протективность в отношении *M.tuberculosis* в модели генерализованного туберкулеза на лабораторных животных.

Впервые исследована и продемонстрирована эффективность указанных выше комбинаций молекул, а также разработанного гибридного белка в отношении как чувствительных, так и устойчивых к ПТП штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ).

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены результаты, позволяющие позиционировать разработанные белковые и генетические молекулы на основе белков МБТ как перспективные для создания вакцин на их основе для профилактики туберкулеза, причем обусловленного как чувствительными к ПТП МБТ, так и устойчивыми. Результаты проведенных исследований позволяют также предположить, что созданные молекулы можно использовать в качестве возможных кандидатов также для терапии туберкулеза.

Разработанный гибридный белок, его применение для борьбы с туберкулезом и штамм-продуцент, раскрытые также в патенте на изобретение РФ №2615440, отмечены наградами двух международных салонов изобретений в 2017 г. - серебряной медалью XX Московского международного Салона изобретений и инновационных технологий «Архимед-2017» и главным призом международного жюри XIII Международного салона изобретений и новых технологий «Новое время», Севастополь 2017. Такие награды вручают за самые перспективные в промышленном применении экспонаты [16].

Результаты исследования создают основу для дальнейшего изучения данных молекул в аспекте профилактики и лечения туберкулеза, в том числе применения совместно с адьювантами.

Материалы и методы исследования

В работе использовали плазмидные ДНК pET-28a(+) (Novagen, США) для экспрессии целевого гена в клетках *E.coli*, pcDNA3.1(+) (Invitrogen, США) для экспрессии целевого гена в клетках млекопитающих.

Для проведения генно-инженерных работ использовали клетки *E.coli* DH10B/R (Gibco BRL, США), для экспрессии рекомбинантного гена - клетки *E.coli* BL21 Star (DE3).

Для моделирования устойчивого к ПТП туберкулеза использовали культуру клинического изолята *M.tuberculosis* № 9660 из коллекции ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России с МЛУ: изониазид – 1 мкг/мл; рифампицин – 40 мкг/мл; этамбутол – 2 мкг/мл; стрептомицин – 10 и 50 мкг/мл; канамицин – 30 мкг/мл. Для моделирования чувствительного к ПТП туберкулеза использовали культуру чувствительного к существующим ПТП стандартного тест-штамма *M.*

tuberculosis Erdman, полученного из «НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича».

Исследования кандидатных иммуногенов проводили на самках белых мышей неинбредных линий, весом 18-20 г, возраст 6-8 недель (Питомник лабораторных животных «Рапполово»), а также самках мышей линии BALB/c, весом 18-20 г, возраст 9-12 недель (Питомник лабораторных животных «Рапполово»).

В качестве препарата сравнения использовали коммерческую вакцину для профилактики туберкулеза БЦЖ, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения, производства Филиал "Медгамал" ФНИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи (Россия).

Исследованы кандидатные вакцины «гибридный белок», «плазмидные ДНК (ДНК)», «гибридный белок + плазмидные ДНК (ДНК)», «гибридный белок + IL-7», «гибридный белок + CRM197», названные согласно действующему веществу. Количественный состав ингредиентов таких кандидатных вакцин приведен в таблице 3.

В качестве растворителей в вакцинных кандидатах использовали физиологический раствор, либо фосфатно-солевой буфер.

В составе части вакцинных кандидатов использовали адъювант гидроксид алюминия. Антигены, адсорбированные на адъювантах на основе алюминия, приводят к формированию более сильного иммунного ответа, по сравнению с растворимыми антигенами [17]. Также в качестве дополнительных адъювантов в одном из опытов были использованы рекомбинантные белки CRM197 и IL-7.

В работе использовали следующие методы:

биохимические

- реакции ферментативной модификации ДНК (ПЦР, рестрикция, лигирование),
- анализ и очистка ДНК (пересадение, секвенирование, аналитический и препаративный электрофорез, выделение из клеток *E.coli*, определение концентрации),
- анализ и очистка рекомбинантных белков (электрофорез по Леммли, определение локализации, иммобилизованная металлоаффинная хроматография, гель-фильтрация, определение концентрации, иммуноферментный анализ, вестерн блот),
- расчет и анализ с использованием специализированного для биохимических данных программного обеспечения,

микробиологические

- (трансформация клеток *E.coli*, скрининг, индукция экспрессии гена, создание музейных образцов клеток),

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ

- работа с лабораторными животными (иммунизация мышей, кроликов),
- работа с материалом животных (оценка по показателям тяжести течения туберкулеза, выделение спленоцитов, перитонеальных макрофагов, получение сывороток),
- работа с клетками (окрашивание клеточных антигенов, анализ на проточном цитофлуориметре, оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, списка иллюстративного материала и приложений. Работа изложена на 264 страницах машинописного текста, иллюстрирована 66 рисунками, 3 таблицами и 12 приложениями. Список литературы содержит 279 литературных источников.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанные молекулы – гибридный белок и плазмидные ДНК – индуцируют формирование специфичного протективного иммунного ответа в модели генерализованного туберкулеза на лабораторных животных.
2. Разработанные молекулы эффективны против туберкулеза, вызываемого как чувствительными, так и устойчивыми к ПТП штаммами МБТ, в модели генерализованного туберкулеза на лабораторных животных.
3. Разработанные молекулы возможно получать в необходимом количестве и с требуемым качеством с использованием созданных штаммов-продуцентов и подобранных условий наработки и очистки.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается выполненными наблюдениями, проиллюстрированными множественным фактическим материалом – рисунками (в том числе электрофореграммами, диаграммами), 66 шт., и таблицами, 3 шт., последовательностями аминокислот и нуклеотидов, 4 шт., хроматограммами, 40 шт., графиками, 72 шт.; комплексным анализом полученных результатов с привлечением широкого арсенала средств, в том числе статистической обработки данных.

Материалы диссертации представлены на восьми конференциях: европейская конференция «Antibiotic Resistance and Infection Control (ARIC)», г. Каунас, Литва, 2011 г.; I международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, г. Новосибирск, 2014; международная конференция «ГМО: история, достижения, социальные и экологические риски», г. Санкт-Петербург, 2014 г.; 18-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2014 г.; XV Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», г. Санкт-Петербург, 2015 г.; международная научно-практическая конференция «ВИЧ-ассоциированный туберкулез: эпидемиологические, клинические и социальные аспекты», г. Гродно, Белоруссия, 2015 г.; 21-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2017 г., LXXI Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017, г. Минск, Белоруссия. По теме диссертации опубликовано 6 статей, 1 патент на изобретение, 5 заявок на изобретение и 10 тезисов докладов. Принято участие и выиграны призы по данному патенту на двух международных салонах изобретений - XX Московском международном Салоне изобретений и инновационных технологий «Архимед-2017» и XIII Международном салоне изобретений и новых технологий «Новое время», Севастополь 2017.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Туберкулез: введение в проблематику

1.1.1. Историческая справка о туберкулезе

Туберкулез является заболеванием, поражающим человека с очень давних времен. На костных останках людей каменного века (около 5000 лет до н. э.) и египетских и перуанских мумиях обнаружены изменения, которые с уверенностью можно отнести к последствиям заболевания туберкулезом [18,19]. Сведения о данном заболевании содержатся в древнеиндийских сборниках – ведах, относящихся к III тысячелетию до н.э.. Первое описание данного заболевания выявлено в документах древнего Вавилона, относящихся ко II тысячелетию до н. э., симптомов и способов лечения – в трудах Гиппократ, 5-4 век до н. э., упоминание о его контагиозности – в трудах Аристотеля, 4 век до н. э., мыслей о невидимых возбудителях лихорадочных болезней из испорченного воздуха – в трудах Авиценны, 10-11 век н.э., причем он считал, что туберкулез передается по наследству, об инфекционной природе – в работе «О контагии, контагиозных болезнях и лечении» Джироламо Фракасторо, середина 16 века н.э. [19,20].

В России болезни с симптомами туберкулеза упоминаются в летописях и рукописных учебниках, в 16 веке их называли «злая сухота», в 17 веке — «болезнь сухотения» и «скорби чахотка», в 18 веке — «легочная чахотка». Это заболевание ранее называли «чахоткой», или «сухоткой», так как больные под влиянием хронического течения болезни «чахли», «увядали», «истощались» [19].

Несмотря на то, что туберкулез поражал людей с древних времен, он был достаточно редким заболеванием до периода средневековья. В тот период происходило бурное развитие городов, повышалась плотность населения, что сопровождалось распространением заболевания, - данный период называли эпидемией «Большой белой чумы», ведь каждый четвертый случай смерти был связан с данным заболеванием. К концу 19 века данная эпидемия охватила всю Западную Европу. В это же время эпидемия туберкулеза бушевала и в царской России, смертность была крайне высокой, наравне с самыми высокими показателями в Европе. В те времена, в основном, данное заболевание поражало представителей низших слоев населения [18].

В тот же период, в 19 веке, началось и активное изучение данного заболевания. Так, в 1821 г. Т.Г. Лазннек заключил, что многообразные формы данного заболевания имеют одно происхождение и предложил называть чахотку туберкулезом, от латинского термина *tuberculum*

– бугорок [20]. Однако он отрицал воспалительное происхождение бугорков, относя туберкулез к опухолевым болезням [19]. Ко второй половине 19 века исследователем Вильмен были проведены опыты, в результате которых им было высказано мнение о том, что туберкулез вызывается микроорганизмами. В 1882 г. Р. Кох сообщил об открытии «туберкулезной палочки»: ему удалось и увидеть данный микроорганизм под микроскопом, и выделить его в чистой культуре из инфекционного материала, за что был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине. 10 апреля 1882 г. в журнале *Berliner Klinische Wochenschrift* была опубликована его статья «Этиология туберкулёза», в которой представлены всесторонняя характеристика «бациллы Коха», её характерные морфологические, культуральные и патогенные свойства. Основные положения этой статьи сохранили своё значение до настоящего времени. Между тем, Кох был мономорфистом и сторонником постоянства микробных видов [20]. Однако позднее для данных бактерий была установлена морфологическая изменчивость, например, было выявлено, что они могут иметь мицелиеподобные формы, от чего «бациллы Коха» стали называть микобактериями туберкулеза, от греческого «микес» — гриб.

Дальнейшие исследования в конце 19 века - начале 20 века, в особенности Риволта, Вебера, Болингера и Рабиновича позволили понять, что возбудители туберкулеза млекопитающих и птиц различаются. Понятие о разных видах возбудителя туберкулеза было впервые выдвинуто Н.Ф. Гамалея: возбудители туберкулеза птиц и человека отнесены им к разным видам бактерий, вызывающих туберкулез [20]. В это же время Кохом была получена водно-глицериновая вытяжка из туберкулезных культур, действующим началом которой были белковые дериваты туберкулезной палочки, на ее основе был получен препарат «туберкулин» [19], который с тех пор используется в диагностике туберкулеза.

В 1919 году Кальметт и Герен показали, что возможно создать специфичный искусственный иммунитет с помощью ослабленного, но частично потерявшего вирулентность штамма микобактерий, - на основе полученного ими штамма была создана первая, впервые введенная новорожденному ребенку в 1921 г., и до сих пор используемая в мире вакцина, названная в их честь, - BCG (*bacilli Calmette-Guerin* - бациллы Кальметта-Герена) [19], русское обозначение которой - БЦЖ.

До 1943 г., когда Ваксманом был получен первый высокоэффективный противотуберкулезный антибиотик стрептомицин, за который он был награжден Нобелевской премией [2], эффективные средства лечения туберкулеза были не известны человечеству. С этого момента стали разрабатываться противотуберкулезные препараты (ПТП), стали разрабатываться эффективные схемы лечения. Однако данный процесс продолжается и по сей день. Это обусловлено тем, что микобактерии туберкулеза обладают самым широким диапазоном изменчивости биологических свойств (плеоморфизмом) из всех известных возбудителей

инфекционных заболеваний [20]. Так, в настоящее время лечение туберкулеза осложняется развитием устойчивости микобактерий к ПТП, причем в России число пациентов с туберкулезом, не поддающимся лечению рядом ПТП, является одним из самых высоких в мире [21].

1.1.2. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в мире и в России в настоящее время

В 2015 г. в мире было зарегистрировано 10,4 млн. новых случаев заболевания туберкулезом, число смертей от туберкулеза составило 1,4 млн, и еще 0,4 млн человек умерло от туберкулеза, будучи длительно больными ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) [3]. Россия входит в число 22 стран с наиболее высоким бременем данного заболевания [21] - стран, в которых выявлено более 80% зарегистрированных случаев заболеваемости туберкулезом в мире [3,22], - и в тройку стран с самым высоким числом случаев заболеваемости туберкулезом, наряду с Китаем и Индией [22]. Более того, к концу 2015 года в России не были достигнуты 2/3 целей, поставленных Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) в рамках стратегии «Stop TB Strategy» [23], начавшейся в 2006 и закончившейся в 2015 году, - не были уменьшены на 50%, по сравнению с 1990 годом, уровни распространенности и смертности [21].

В России наблюдается рост соотношения «заболеваемость туберкулезом/смертность от туберкулеза» с 3,7 в 2005 году до 6,0 в 2014 году; а среди постоянного населения – с 4,0 до 6,1. По сравнению с 2005 г., когда отмечался пик смертности от туберкулеза, в России в 2014 г. данный показатель снизился на 55,8%. По сравнению с 2013 г., общая смертность от туберкулеза снизилась на 11,5%, однако в половине случаев такое снижение обусловлено увеличением регистрации смертности от ВИЧ-инфекции пациентов с туберкулезом [24], что соотносится с общемировыми данными, - 55% пациентов с туберкулезом по всему миру имеют подтвержденный статус ВИЧ-инфицированных [3,25]. Без надлежащего лечения, в среднем, 45% ВИЧ-негативных лиц, страдающих туберкулезом, и почти все ВИЧ-позитивные больные туберкулезом умирают [2].

Лечение туберкулеза и борьба с его распространенностью осложняются способностью микобактерий развивать устойчивость к противотуберкулезным препаратам (ПТП): широко распространены высокорезистентные штаммы микобактерий, вызывающие туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). В России в 2014 году отмечался рост распространенности микобактерий туберкулеза (МБТ) с МЛУ к ПТП среди контингентов, состоящих на учете на окончание года. Продолжается и рост доли больных с туберкулезом с МЛУ среди больных туберкулезом органов дыхания,

выделяющих МБТ – с 40,0% до 43,6% [24]. В странах бывшего СССР наблюдается самый высокий уровень заболеваемости туберкулезом с МЛУ (Рис. 1). Россия также является второй страной после Китая и Индии по развитию туберкулеза с МЛУ у больных туберкулезом, на 2014 год (Рис. 2) [21], в 2015 году на эти три страны пришлось 45% новых случаев туберкулеза с МЛУ в мире [3].

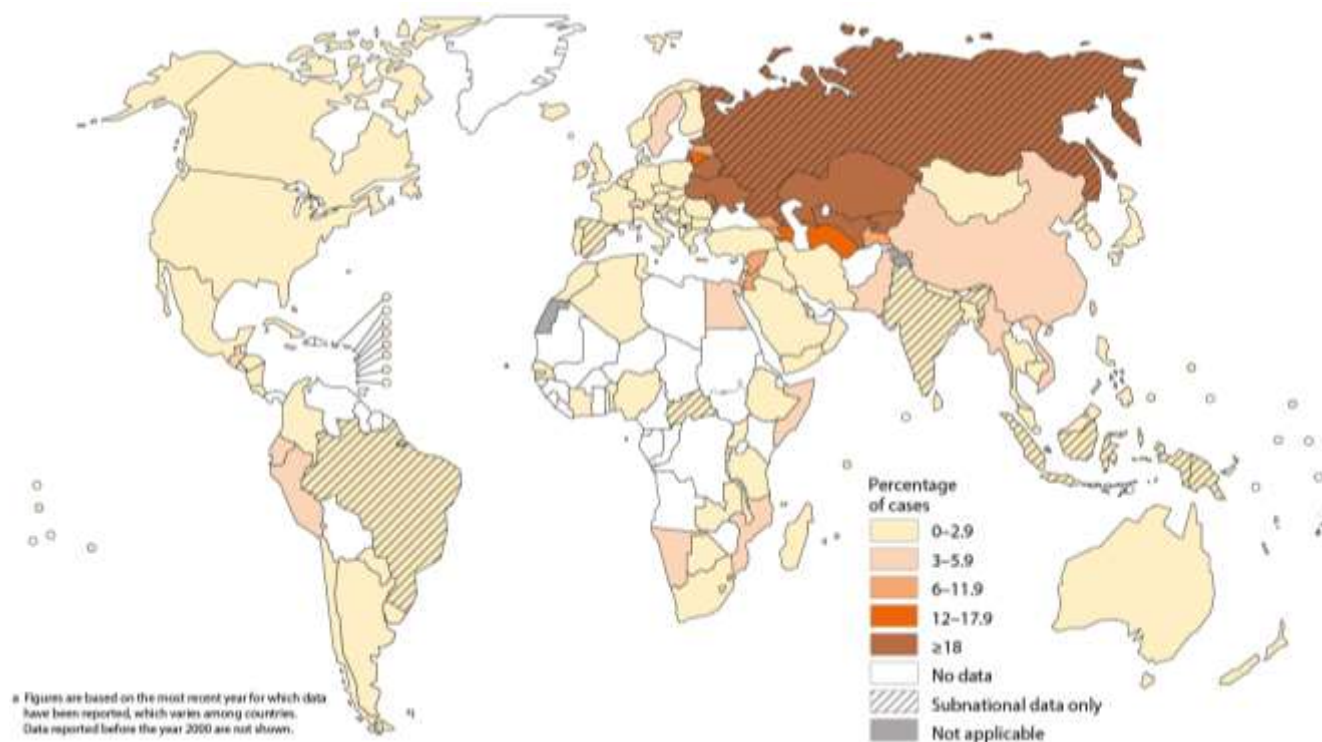


Рисунок 1 - Карта мира, демонстрирующая заболеваемость туберкулезом с МЛУ по самым последним данным стран [21], процент новых случаев заболевания туберкулезом с МЛУ продемонстрирован диапазоном цифр и/или чисел, соответствующих цветным прямоугольникам

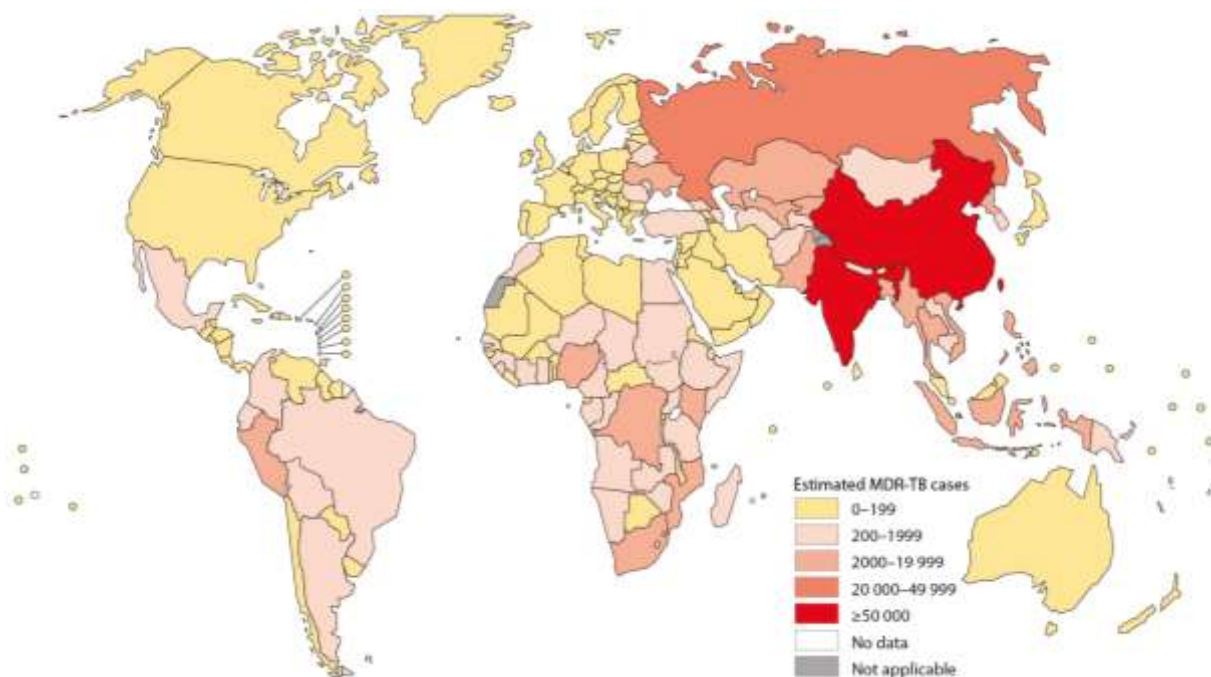


Рисунок 2 - Карта мира, демонстрирующая развитие туберкулеза с МЛУ в ранее выявленных случаях туберкулеза в 2014 году [21], количество случаев туберкулеза с МЛУ на 100 тыс. человек продемонстрировано диапазоном чисел, соответствующих цветным прямоугольникам

В России в большинстве случаев умирают от туберкулеза органов дыхания (2013 год – 85,0%). Большинство умерших от туберкулеза имеют трудоспособный возраст (2013 год – 80,5%), как мужчины (83,3%), так и женщины (69,9%). Значительная часть умерших умирает в молодом возрасте до 45 лет (2013 год – 45,5%) и в возрасте 45-54 года (25,3%) [24]. Такие данные говорят об острой необходимости принятия мер по борьбе с данным инфекционным заболеванием.

В 2016 г. принята новая стратегия ВОЗ, согласно которой необходимо достичь к 2030 г. снижения на 90% числа смертей от туберкулеза, по сравнению с 2015 г., и на 80% заболеваемости, а также достичь доступности мер борьбы с данным заболеванием для каждой семьи. Для достижения поставленных целей потребуются новые способы диагностики, новые лекарства и новые вакцины [21].

В связи с тем, что заболеваемость туберкулезом снижается довольно медленно по всему миру, - например, по сравнению с 2013 г., в России в 2014 г. показатель общей распространенности туберкулеза (на окончание года) снизился всего на 6,9% [24], - а также в связи с постоянной угрозой развития туберкулеза с ЛУ, необходимым является создание новых эффективных вакцин против туберкулеза, причем данная необходимость – критическая [21]. Согласно докладу ВОЗ по туберкулезу 2014 г., новая вакцина, которая поможет предотвратить

передачу туберкулеза среди подростков и взрослых в развивающихся странах, будет самым экономически эффективным инструментом в смягчении эпидемии [4]. Для понимания принципа разработки эффективной вакцины против туберкулеза рассмотрим возбудителя данного заболевания более подробно.

1.1.3. Возбудитель туберкулеза

1.1.3.1. Краткая характеристика микобактерий туберкулезного комплекса

Возбудителями туберкулеза являются микобактерии туберкулезного комплекса (МТК) (Царство Bacteria; Тип: Actinobacteria; Класс: Actinobacteria; Порядок: Actinomycetales; Семейство: Mycobacteriaceae; Род: Mycobacterium) [26]. Данная группа включает виды *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis BCG*, *M.africanum*, *M.caprae*, *M.microti* и *M.canetti* [27]. Представители данной группы не образуют споры и капсулы и являются аэробами, но также некоторые виды МТК можно рассматривать как факультативные анаэробы [19]. Под микроскопом МТК выглядят как длинные, тонкие, иногда слегка изогнутые палочки (рисунок 3).



Рисунок 3 - *M.tuberculosis* под микроскопом (University of Wisconsin-Madison)

Особенностью МТК является высокое содержание миколовых кислот в составе клеточной стенки, что обеспечивает устойчивость к таким агентам, как щелочи, кислоты и спирты, а также плохую восприимчивость к анилиновым красителям.

МТК окрашиваются по Граму, поэтому считаются грамположительными. Однако, окрашивание происходит не интенсивно, поэтому для детектирования данной группы бактерий используют окраску по методу Циля-Нильсена.

Оптимальной для выращивания МТК является яичная среда с добавлением глицерина (среда Левенштейна-Иенсена). Микобактерии растут медленно: через 28-35 дней на плотных средах образуются морщинистые, сухие, с неровными краями, изолированные, не сливающиеся друг с другом колонии. На жидких средах МТК растут в виде морщинистой пленки. Для дифференциации видов используют различные биохимические (ниациновый тест, редукцию нитратов, расщепление мочевины) [28] и молекулярно-генетические методы.

Как уже было указано выше, характерной особенностью МТК является изменчивость под воздействием внешних факторов. Так, они могут принимать актиномицетную, кокковидную форму, L-форму, с утратой плотной клеточной стенки и образованием сферопластов, окруженных цитоплазматической мембраной, сходной с мембраной клеток макроорганизма, ультрамелкую фильтрующуюся форму (0,22—0,24 мкм), которая может быть окружена плотной клеточной стенкой. С изменением формы может меняться и антигенный состав [19].

Из группы МТК самым частым возбудителем туберкулеза человека является вид *M.tuberculosis*.

1.1.3.2. Геном микобактерии туберкулезного комплекса

Характерной особенностью МТК является отсутствие экстрахромосомных включений, например, плазмид, и все разнообразие свойств МТК определяется хромосомой [29]. Секвенирование генома позволило выявить гомологию 85%-100% - чрезвычайную консервативность МТК, а также высокое содержание гуанина и цитозина, что отражается на аминокислотном составе белков. Современные исследования с применением протеогеоминого анализа выявили около 80% от предсказанного исходя из нуклеотидной последовательности числа белков *M. tuberculosis* [30].

Первым просеквенированным полноразмерным геномом *M.tuberculosis* является геном лабораторного штамма H37Rv (1998г.) [31]. Геном штамма H37Rv *M. tuberculosis* представлен 4411529 пар оснований (п.о.) и содержит порядка 4000 генов. Немного позже (в 2002 г.) был просеквенирован геном клинического штамма CDC1551 *M.tuberculosis* [32]. В настоящее время известны геномные последовательности многих штаммов *M.tuberculosis*, и данный патоген считается одним из наиболее хорошо изученных на геномном уровне.

Штамм *M.tuberculosis Erdman*, использованный в настоящей работе, был впервые изолирован в 1945 году, задепонирован в 1946 г. (DNA Database of Japan, accession no. AP012340) и просеквенирован в 2012 г. [33]. Благодаря стабильно высокой вирулентности, он используется в качестве стандарта вирулентного лабораторного штамма в исследованиях. Бактерии данного

штамма имеют вдвое более короткое время удвоения *in vivo*, по сравнению с аттенуированными штаммами *M.tuberculosis* H37Ra и *M.bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG)*, а также немного более быстрое время удвоения *in vivo*, по сравнению с вирулентным штаммом H37Rv, у мышей [33,34]. Геном *M.tuberculosis Erdman* представлен одной кольцевой хромосомой, 4392353 п.о., при среднем содержании GC 65,6%. Хромосома в общей сложности содержит 4246 белок-кодирующих гена, 52 гена тРНК, ген, кодирующий одну мРНК для всех аминокислот, 1 оперон *rrn* и 11 инсерционных элементов (IS) IS6110 [33].

Количество копий инсерционных элементов IS6110 и IS1081 специфично для штаммов и является важным диагностическим признаком [35]. Некоторые штаммы *M. tuberculosis* содержат в геноме профаги, которые, скорее всего, и обеспечивают постоянный лизис клеток в культуре, на низком уровне. Было показано, что профаг *phiRv1* играет важную роль для обеспечения экспрессии генов, связанных с вирулентностью микобактерий. При получении вакцинного штамма *M. bovis BCG* данный профаг был утерян [36]. В недавнем исследовании для данного профага, как и профага *phiRv2*, была установлена возможность ощущать состояние кислорода в организме и, соответственно, реагировать на изменения [37].

Штамм *M.bovis* был впервые изолирован в 1908 году и культивирован *in vitro* в течение 230 последовательных пассажей, из-за отсутствия возможности сохранения в живом виде, например, замораживанием [38], на среде, содержащий экстракт картофеля, глицерин и желчь [39]. Было показано, что данный штамм утратил вирулентность после 39 пассажа – перестал быть способным убивать экспериментальных животных, - и что данное изменение необратимо, даже при пассажировании более 200 раз, что позволило в 1921 г. впервые применить данный штамм, который теперь идентифицировали как *M.bovis BCG*, для вакцинации против туберкулеза [40]. Показано, что геномы *M.bovis BCG*, *M.bovis* и *M.tuberculosis* различаются по наличию делеций, которые опосредуют аттенуацию штамма [38,41,42]. Более того, для всех разновидностей штамма *M.bovis BCG*, произошедших из-за длительного пассажирования исходного штамма [38], используемых для вакцинации по всему миру, характерна делеция RD1 (9,454 п.о.), которая произошла, вероятно, еще до 1921 года [43], и возможно, именно она была первичной аттенуирующей мутацией, которая привела к образованию штамма *M.bovis BCG* [44]. Интересно, что данная утраченная область кодирует белки ESAT-6 и CFP-10 - предполагаемый эффектор цитолиза и его шаперон [44,45], причем показано, что цитолиз инфицированных клеток разрушает барьер и позволяет бактериям эффективнее транслоцироваться [46]. До начала использования вакцины BCG в форме лиофилизата начиная с 1960-ых годов, каждый из дочерних штаммов *M.bovis BCG* пассажировался около 1000 раз, обычно при тех же условиях, при которых была проведена первоначальная аттенуация, что может быть причиной различий, в том числе значительных, в эффективности вакцин на их основе [38].

Что интересно, штамм *M.bovis BCG Russia*, как и *M.bovis BCG Japan*, не приобрел дополнительных делеций, по отношению к первоначальному штамму *M.bovis BCG* с делецией области RD1, в отличие от всех остальных ныне существующих штаммов *M.bovis BCG* [38]. Полногеномное секвенирование данного штамма было проведено в 2011 г. [47] и 2015 г. [48] и показало, что геном, представленный кольцевой хромосомой, содержит 4363945 п.о. и около 4119 предсказанных генов, G+C состав – 65,5%, также содержит по одной копии генов, кодирующих 5S, 16S, и 23S рРНК, 45 копий предсказанных генов, кодирующих тРНК, 34 мобильных элемента, 159 tandemных (DU-I) и палиндромных повторов, а также множество однонуклеотидных полиморфизмов, специфичных исключительно для данного штамма. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в DDBJ/EMBL/GenBank под номерами AEZG00000000 [47] и CP011455 [48].

В настоящее время вакцина BCG в России производится из партии 368 «shch» (2006). Данная посевная культура получена в 1925 году и обозначена как *M. bovis BCG-1 (Russia)*, с 1940ых годов лиофилизирована, и с 1954 года используется в системе лотов посевных культур. Штамм для получения вышеуказанной посевной культуры был привезен в Россию из Института Пастера [48].

1.1.3.3. Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis*

В наши дни приобретенная ЛУ МТК является одной из серьезнейших проблем, препятствующих борьбе с распространением туберкулеза в мире.

В последние десятилетия, в связи с изобретением многих весьма эффективных антибактериальных химиопрепаратов, приближающихся или превышающих по активности «традиционные» антибиотики, понятие «антибиотик» стало употребляться не только по отношению к природным и полусинтетическим соединениям, но и ко многим наиболее эффективным антибактериальным химиопрепаратам. Используемые при лечении туберкулеза ПТП разделяют на две группы: так называемые препараты первого ряда (основные) и препараты второго ряда (резервные).

К ПТП первого ряда относятся изониазид и рифампицин - наиболее эффективные ПТП, а также пиразинамид, этамбутол, стрептомицин. Такие препараты назначают отдельно, либо в комбинации. Как правило, ПТП первого ряда применяют для лечения простых форм туберкулеза без ЛУ.

К резервным препаратам (препаратам второго ряда) относятся протионамид (этионамид), канамицин, амикацин, капреомицин, циклосерин, рифабутин, пара-аминосалициловая кислота (ПАСК) и фторхинолоны. ПТП второго ряда - более дорогостоящие, и их назначают при лечении туберкулеза с ЛУ к препаратам первого ряда.

ЛУ бактерий может формироваться с использованием различных механизмов. Выделяют шесть биохимических механизмов формирования ЛУ в бактериальной клетке:

- снижение проницаемости клеточной стенки для препарата;
- усиленное выведение препарата из бактериальной клетки;
- ферментативная инактивация препарата;
- модификация мишени препарата;
- инактивация фермента, активирующего антибиотик;
- повышенная экспрессия белка-мишени лекарственного препарата [49].

Приведенные механизмы устойчивости к препаратам могут проявляться в качестве природных свойств бактериальной клетки, либо возникают в результате селективного действия антибактериальных препаратов.

При природной ЛУ у бактерий, как правило, отсутствует, либо недоступна мишень антибиотика вследствие первично низкой проницаемости мембраны, либо ферментативной инактивации. При наличии у бактерий природной устойчивости антибиотики клинически неэффективны. Природная ЛУ - постоянный видовой признак микроорганизмов, который легко прогнозируется.

Приобретенной устойчивостью считается свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при концентрациях антибиотиков, подавляющих основную часть популяции микроорганизмов. Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически, а именно изменением нуклеотидной последовательности бактериальных генов или изменением уровня экспрессии собственных генов.

Микобактерии туберкулезного комплекса обладают природной устойчивостью к некоторым препаратам благодаря наличию в составе ее оболочки значительного количества гидрофобных соединений, она является механическим барьером для некоторых антибиотиков [50,51]. Однако, в основном, формирование ЛУ определяется геномом *M. tuberculosis*. В нем закодированы элиминирующие (гидролитические) или модифицирующие лекарства ферменты, например, β -лактамаза и аминогликозид ацетил-трансферазы; а также элементы множества систем, выводящих препараты из клетки, например, многочисленные АВС транспортеры. Наличие β -лактамазы обеспечивает устойчивость многих видов микобактерий к β -лактамным антибиотикам [52–54].

Помимо естественных механизмов резистентности, штаммы *M.tuberculosis* способны формировать устойчивость к ПТП в результате возникновения спонтанных мутаций в бактериальных генах [55]. В отличие от других видов бактерий, у *M.tuberculosis* транспозоны и плазмиды не участвуют в формировании ЛУ [55], несмотря на наличие таких механизмов резистентности у других видов микобактерий [56,57]. Возникновение штаммов *M.tuberculosis* с ЛУ связано с нарушением режима лечения ТБ.

На данный момент показано, что мутации в генах, кодирующих мишени ПТП, приводят к возникновению устойчивых к данным ПТП штаммов *M. tuberculosis*. Такие хромосомные мутации происходят с частотой 1 на $10^6 - 10^8$ репликаций микобактерий. При одновременном же применении трех различных ПТП вероятность развития ЛУ составляет от 10^{-18} до 10^{-20} , поэтому, теоретически, при правильном применении трех эффективных ПТП ЛУ не возникает. Тем не менее, на практике ЛУ все же наблюдается, что можно объяснить человеческим фактором: монотерапия из-за недоступности ПТП, назначение не подходящих пациенту препаратов, несоблюдение пациентом всех предписаний врача [58]. Последующая передача патогена с ЛУ, аккумуляция мутаций в различных генах, ассоциированных с ЛУ к определенным ПТП опосредуют проблему мирового масштаба – распространение туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ, ШЛУ) [55].

1.1.3.4. Строение клеточной стенки

Клеточная стенка микобактерий обеспечивает механическую и осмотическую защиту [19] и имеет самое сложное строение среди прокариот. Она состоит из нескольких слоев. Наружные слои имеют меняющийся химический состав и, в основном, представлены липидами, большинство из которых – миколовые кислоты и их производные [29].

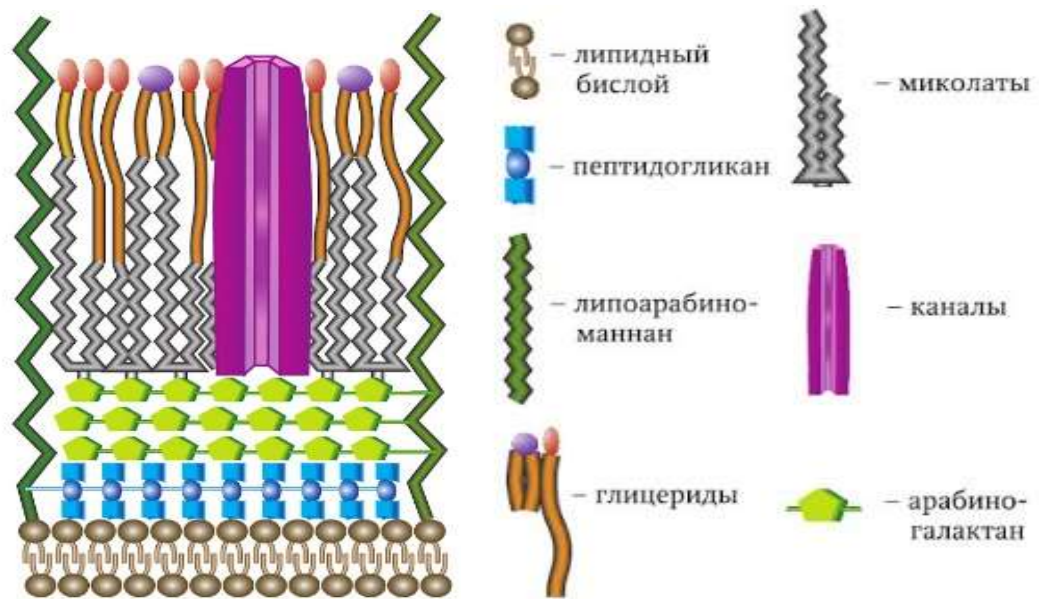


Рисунок 4 - Структура клеточной стенки *M. tuberculosis* [29]

Первичный слой клеточной стенки – перекрестно связанные пептидогликаны, над ним располагается слой арабиногалактанов, образуя полисахаридную строму клеточной стенки, последний имеет точки связи с первичным слоем и структуры для крепления миколовых кислот и их производных [29]. Миколовые кислоты присутствуют в виде свободных сульфоллипидов и корд-фактора - фактора вирулентности, который оказывает токсическое действие на макрофаги при фагоцитозе [19,29]. С наличием последнего на поверхности клеток связано характерное образование колоний МБТ в виде жгутов. Слой гликолипидов – «микозидов» - токсичен и подобно сульфоллипидам и корд-фактору вызывает формирование гранул. Клеточная мембрана и слои клеточной оболочки пронизаны каналами или порами: порами с малым временем жизни, обеспечивающими управляемую диффузию веществ, и каналами с более длительным временем жизни, обеспечивающими энергозависимый транспорт веществ. Также компонентом клеточной стенки является липоарабиноманнан, заякоренный на плазматической мембране, пронизывающий клеточную стенку и выходящий на ее поверхности. Его терминальные фрагменты, прежде всего остатки маннозы, неспецифически подавляют активацию Т-лимфоцитов и лейкоцитов периферической крови, что приводит к нарушению иммунного ответа на микобактерии [29].

Такой состав клеточной стенки определяет устойчивость МБТ к воздействию кислот и щелочей, а также высокую гидрофобность клетки в целом [19].

1.1.4. Инфицирование человека *M. tuberculosis*

Чаще всего заражение человека микобактериями осуществляется через дыхательные пути, но лишь небольшая часть попавших в дыхательную систему микобактерий попадает в нижние дыхательные пути и альвеолы и осуществляет заражение [19]. В альвеолах микобактерии взаимодействуют со множеством клеток – макрофагами, эпителиальными клетками, фибробластами [59], эндотелиальными клетками [60] и адипоцитами [61]. Захват МБТ клеткой происходит более эффективно в случае макрофагов, чем пневмоцитов, однако в последних микобактерии размножаются быстрее [62]. При инфицировании пневмоцитов 2 типа микобактериями индуцируется синтез некоторых хемокинов и цитокинов [63], что может приводить к локальному воспалительному процессу и привлекать моноциты, CD4+ Т-клетки и нейтрофилы. Транскрипционная программа, запускаемая микобактериями в пневмоцитах, отличается от таковой, запускаемой в макрофагах [64], и был выявлен белок, для которого на модели мышей было показано, что его синтез после попадания в эпителиальные клетки вызывал распространение патогена в более глубокие ткани [65,66]. Также показано, что при пассажировании патогена в пневмоцитах его эффективность в поражении эндотелиальных клеток значительно увеличивается [67]. Более того, заражение пневмоцитов второго типа может приводить и к их гибели [68], что также способствует распространению инфекции [59].

Взаимодействие альвеолярного макрофага и МБТ осуществляется следующим образом.

Связывание липоарабиноманнана или микозидов клеточной стенки МБТ с маннозными рецепторами на поверхности альвеолярных макрофагов приводит к захвату МБТ макрофагом, однако в данном случае формируется фагосома, которая может избежать слияния с лизосомой, что предотвращает уничтожение бактерии [59,69]. Показано, что важную роль при этом играют ранние секреторные белки ESAT-6 и CFP-10, отсутствующие в штамме BCG, они позволяют выходить микобактериям в цитоплазму [70], что опосредует презентацию через MHC 1 класса микобактериальных антигенов CD8+ Т-лимфоцитам, способствуя развитию цитотоксического ответа.

В случае же предварительной опсонизации МБТ специфичными антителами и захвата фагоцитом, благодаря их связыванию с рецептором комплемента, формируется фагосома, которая далее сливается с лизосомой [71], что далее может приводить к усиленному извлечению от патогена [59]. При этом микроокружение также влияет на взаимодействие макрофага и микобактерии. Так, было отмечено, что белок А сурфактанта связывается с микобактерией и усиливает ее захват макрофагом, благодаря взаимодействию со специфичным рецептором белка

А сурфактанта на макрофаге, а также усиливает уровень продукции в нем индуцибельной синтазы оксида азота, что приводит к гибели микобактерий [72].

Микобактерии могут проникать и осуществлять заражение также через повреждения в эпителиальной выстилке дыхательной системы. Некоторая часть микобактерий остается на месте проникновения, другая с током лимфы и крови переносится к месту внедрения — в региональные лимфатические узлы. В месте внедрения МБТ их фагоцитируют нейтрофилы – осуществляется неспецифическая реакция. Однако под влиянием токсинов МБТ нейтрофилы разрушаются, что вызывает воспалительную реакцию, на смену которой приходит фагоцитоз МБТ макрофагами. Макрофаги в очаге воспаления принимают форму эпителиоидных клеток, которые сливаются вместе, образуют гигантские клетки, однако при туберкулезе самостоятельно макрофаги уничтожить МБТ не могут. Необходимо активирующее воздействие на них сенсibilизированных Т-лимфоцитов, в частности субпопуляции Т-хелперов (CD4+ клетки) и Т-супрессоров (CD8+ клетки) [19].

1.2. Профилактика туберкулеза

1.2.1. Историческая справка по методам борьбы с инфекциями

Термин инфекция (лат. *infecere*) означает «отравлять, заражать», или *inficio* - «вношу что-либо извне, заражаю». Сведения о заразных болезнях содержатся в индийские аюрведах и Законах Ману, иероглифических письменах древнего Китая, «Илиаде» и «Одиссее» Гомера, трудах историков, философов и врачей средневековья [73], что говорит о том, что человечество сталкивается с инфекциями достаточно давно. И с давних времен предпринимались попытки борьбы с ними: удаление заболевших из городов, сжигание имущества умерших, привлечение переболевших людей к уходу за больными [73], предложение по защите города от зараженного воздуха кострами [73,74]. Аристотель в 4 веке до н.э. предположил существование живых болезнетворных организмов, что определило все последующие взлеты науки эпидемиологии. Последующие меры включали рекомендации очистки и фильтрации воды (Авиценна, 10-11 в.), карантин с 14 в., который лег в основу ключевого принципа в данном вопросе – принципа разобщения больных и здоровых людей. Доктор Джироламо Фракасторо, 15-16 в., дал подробное описание симптомов заразных болезней и методов их лечения и ввел термины «инфекция» и «дезинфекция». Синдхем Томас, 17 в., использовал методы борьбы с такими болезнями, на которых основывалось в дальнейшем их лечение, - популяризация лечения лихорадки хинином,

рекомендация применения опиума при кишечных заболеваниях, назначение слабительных, рвотных, потогонных средств, кровопускания при холере. Немецкий врач К. Гуфеланд, 18-19 в., на основе вышеуказанных терминов сформулировал название группы заболеваний - «инфекционные болезни». Российский врач-эпидемиолог Д.С. Самойлович в 18 в. разработал простейшие способы дезинфекции при чуме, за, по крайней мере, 50 лет до открытия патогенных для человека организмов [73].

Ввиду специфики инфекционных заболеваний, выражающейся в их распространении за счет заражения, крайне важным аспектом борьбы такими заболеваниями всегда являлось не только лечение такого заболевания, но и борьба с его распространением.

Одной из самых старых инфекционных болезней, известных человечеству, является оспа. В Древнем Китае и Индии врачи разработали метод защиты людей от оспы путем вариоляции: оспенные корочки больного втирали в кожу, а иногда вдвухали в нос здоровому человеку. Однако высокоэффективный способ профилактики оспы удалось реализовать только в 18 веке Эдварду Дженнеру – вакцинацию [73,75]. Вакцина против оспы была разработана им в 1796 г., однако не применялась достаточно широко, чтобы полностью контролировать болезнь [76]. И.М. Соколов произвел в 1847 году первое в мире переливание сыворотки крови больному холерой, в Европе такую спасительную процедуру повторили в 30-х годах 20 века. В работе о куриной холере, 1880 год, Л. Пастер, вслед за Э. Дженнером, обосновал защитный эффект прививок и получил вакцины против сибирской язвы и бешенства. В дальнейшем, благодаря исследованиям Л. Пастера и Р. Коха и их учеников, профилактика инфекционных заболеваний стала вестись с использованием вакцин и сывороток [73].

С выявлением патогенов и исследованием их природы и взаимодействия с организмом человека и/или животного появилось понимание, как инфекционные заболевания лечить и предотвращать их распространение. В настоящее время наблюдается тенденция возрастания резистентности многих патогенов, вызывающих социально значимые бактериальные и грибковые заболевания, к действию антибиотиков, в связи с чем перспективным направлением борьбы с ними представляется предупреждение развития заболевания, за счет вакцинации.

Вакцинопрофилактика на данный момент является наиболее эффективной превентивной программой в медицине [77]. В ближайшие годы ООН планирует методами вакцинации ликвидировать полиомиелит, дифтерию, столбняк, уменьшить смертность от пневмонии у детей - эффективность излечения сегодня достигла 90% [73]. Для понимания, почему именно вакцинация является ключевым фактором в борьбе с инфекционными заболеваниями, в том числе с туберкулезом, следует разобраться в механизме действия вакцин.

1.2.2. Механизм действия вакцин

Иммунная система человека состоит из центральных (тимус, костный мозг) и периферических (селезенка, лимфатические узлы) органов и работает как интегрированная защитная система организма, обеспечивая элиминацию инфекционных агентов и длительный протективный иммунитет [78].

При первой встрече с инфекционным агентом начинает незамедлительно работать врожденный иммунитет: активируются нейтрофилы, клетки моноцитарно-макрофагального ряда, эозинофилы, базофилы, тучные клетки, фибробласты, NK-клетки, продуцируются молекулы – белки каскада комплемента, белки, ответственные за создание железодефицитной среды, белки сыворотки крови (острая фаза воспаления).

Реакции распознавания при этом не связаны с рецепторами, относящимися к иммуноглобулиновому семейству. Распознаются консервативные молекулярные паттерны. Активацию клеток врожденного иммунитета опосредуют в том числе TLR (Toll-like receptor)-лиганды и опсоины. При активации TLR, присутствующих в большом количестве на клетках, локализующихся на слизистых, осуществляется активная продукция муцина и антимикробных пептидов. Есть мнение, что TLR присутствуют и на эозинофилах и базофилах. TLR5 – рецептор флагеллина и расположен на плазмалемме.

Данные механизмы врожденного иммунитета действуют первые 4 часа. Такой иммунитет не является антиген-специфичным, а также не формируется иммунологическая память. В течение этой ранней фазы важную роль играет продукция как антимикробных факторов, так и цитокинов для последующего развития специфического иммунного ответа, Т-клеточно-опосредованного или гуморального. Цитокины - это связующее звено между врожденным и приобретенным иммунитетом.

Занимающими промежуточное положение между врожденным и приобретенным иммунитетом также можно считать В-клетки, сформировавшиеся в эмбриональном периоде. Такие клетки специфичны к полисахаридам, но специфичность очень низкая. Они способны в ходе взаимодействия с антигеном включаться в ответ без кооперации с Т-лимфоцитами и вырабатывать практически исключительно антитела класса IgM. Такие антитела связываются с антигеном с низкой степенью сродства, но способны запускать каскад комплемента. В результате это может помочь уничтожать патогенов.

При прохождении инфекционными агентами этой ранней линии защиты запускаются механизмы адаптивного иммунного ответа с развитием антигенспецифических эффекторных клеток, специфически распознающих антиген, и клеток памяти, которые длительно сохраняются

в организме и предупреждают развитие инфекции, вызываемой повторным попаданием того же самого патогена.

Через 4-6 суток после первичной встречи с чужеродным антигеном начинает работать приобретенный иммунитет: иммунокомпетентные клетки – Т- и В-лимфоциты, иммуноглобулины G, M, A, E, D низкой аффинности. Реакции распознавания при этом связаны с рецепторами, относящимися к иммуноглобулиновому семейству. Распознаются при этом уже структурные особенности белков. Однако в случае микобактерий показано, что данные механизмы не позволяют побороть инфекцию [79].

Все иммуноглобулины из вышеперечисленных, кроме IgD и IgE, могут обуславливать нейтрализацию бактерий, их опсонизацию и обеспечивать комплемент-зависимый иммунитет. IgM не является опсонизирующим антителом, но активирует каскад комплемента, в отличие от IgA, для которого характерны противоположные свойства, и последний активирует альтернативный каскад комплемента. При взаимодействии с C3b компонентом комплемента ко-рецептора В-лимфоцитов CD21, одновременно являющегося рецептором комплемента второго типа (CR2), осуществляемом наряду с таковым IgM и антигена, сигнал существенно амплифицируется, в 1000 раз, чем при взаимодействии только IgM на поверхности В-клеток с антигеном. IgG является опсонизирующим и активирующим каскад комплемента антителом. Кроме того, показано, что IgG могут быть секреторными антителами [80].

Отложенное время специфичного ответа связано с необходимостью клональной селекции. Для клональной селекции и дифференцировки наивных лимфоцитов в эффекторные Т-клетки и антитело-продуцирующие плазматические клетки требуется несколько дней, позже 96 ч после встречи с патогеном.

Антиген фагоцитируется дендритными клетками, процессируется на небольшие пептиды и представляется на клеточной поверхности в комплексе с молекулами МНС класса I и/или II. CD4⁺ Т-клетки с соответствующими МНС-пептидными комплексами активируются и обеспечивают активационный сигнал для дендритных клеток и дифференцируются в клетки-эффекторы, которые продуцируют преимущественно Th1 или Th2 цитокины. Th1 CD4⁺ Т-клетки поддерживают дифференцировку CD8⁺ Т-клеток, которая, напротив, ингибируется Th2 цитокинами. CD8⁺ Т-клетки распознают МНС I класса - пептидные комплексы и дифференцируются в цитотоксические клетки-эффекторы, способные убивать инфицированные клетки [81]. Также формируются Т-клетки памяти.

Т-хелперы Th2, активированные несущими антиген дендритными клетками, способствуют миграции некоторых В-клеток к дендритным клеткам, находящимся в герминативных центрах фолликулов селезенки и лимфоузлов, инициируя реакцию герминативных центров [82].

В герминативных центрах, расположенных в лимфатических узлах, В-клетки получают дополнительные сигналы от находящихся там Т-хелперов, и переключаются с синтеза IgM на синтез IgG, IgA, IgE, проходят стадию созревания аффинности и дифференцируются в плазматические клетки, секретирующие большое количество антиген-специфичных антител. После завершения реакции в герминативных центрах несколько плазматических клеток выходит из лимфатического узла или селезенки и мигрирует в ниши выживания, преимущественно - в костный мозг [81].

Параллельно с формированием таких плазматических клеток происходит генерация В-клеток памяти, происходит процесс созревания аффинности в течение нескольких месяцев (4-6). На выходе из герминативных центров эти В-клетки не дифференцируются в антитело-продуцирующие плазматические клетки, а становятся клетками памяти, которые транзиторно мигрируют через кровь в экстрафолликулярные зоны селезенки и лимфатических узлов. Они персистируют здесь как покоящиеся клетки до повторной экспозиции специфичного для них антигена. В-клетки памяти живут несколько десятилетий и, возможно, в отсутствие антигена подвергаются гомеостатической реактивации.

После повторной экспозиции антигена В-клетки памяти готовы пролиферировать и дифференцироваться в плазматические клетки, секретирующие большее количество высокоаффинных антител, которые можно определить в сыворотке крови в течение нескольких дней после бустерной инъекции [81].

Т- и В-клетки иммунологической памяти представлены двумя типами таких клеток: относительно стабильно существующими длительное время клетками клона, которые потом уходят в апоптоз, и формирующимися каждые 154 дня спонтанно, без дополнительных сигналов, клетками клона, при этом часть клеток клона уходит в апоптоз через 10 суток. Активация происходит сигналом через TcR и CD3.

Таким образом, формируется специфическая иммунологическая память, которая обеспечивает длительную защиту при ре-инфицировании тем же возбудителем [78]. Феномен иммунологической памяти лежит в основе вакцинации.

Формирование иммунного ответа на белковые антигены, а также антигены, имеющие в своем составе белковую часть, по сути, имитирует инфекционный процесс и представлено следующими этапами:

- захват антиген-презентирующими клетками антигенов вакцин, расщепление и представление на клеточной поверхности эпитопов антигенов в комплексе с молекулами МНС класса I и II;

- распознавание антигенов специфическими Т- и В-лимфоцитами;

- активация, дифференцирование и пролиферация Т-клеток: формирование регуляторных (Th1, Th2), эффекторных (CD8+) и Т-клеток памяти;

- активация, дифференцирование В-клеток и образование антителопродуцирующих плазматических клеток и В-лимфоцитов памяти: после распознавания антигена вакцины В-лимфоцитами и получения сигнала от активизированных Т-лимфоцитов о присутствии чужеродных тел, некоторые В-лимфоциты трансформируются в плазматические В-лимфоциты - основные клетки, продуцирующие в организме человека специфичные к антигенам вакцины антитела;

- синтез специфичных антител [78,83].

В отношении В-клеточного ответа, первичный иммунный ответ характеризуется в ранней фазе преимущественной продукцией антител класса М, тогда как доминирующий изотип антител, продуцируемый в раннем вторичном и последующих ответах, - это обычно IgG, в некоторых случаях IgA и IgE. Эти антитела продуцируются В-клетками, которые уже переключились с продукции IgM на более зрелые изотипы и синтезируют IgG, IgA, или IgE и высокий уровень молекул МНС класса II. Это позволяет В-клеткам памяти инициировать их взаимодействие со зрелыми Т-хелперами даже при низких дозах антигена.

Кроме того, число В-клеток, которые могут отвечать на антиген, увеличивается после прайминга в 5-10 раз, а продуцируемые антитела имеют более высокий аффинитет.

Следовательно, бустерная (повторная) иммунизация приводит к синтезу антител с более высоким аффинитетом [78].

При введении ДНК-конструкций, кодирующих антиген патогена, осуществляется дополнительный механизм стимуляции иммунной системы, помимо описанного выше, причем магистральный. Данное введение, как правило, осуществляется в мышечную ткань, и данная конструкция попадает в соматические клетки, где происходит экспрессия целевого гена. Синтезированный белок экспонируется на поверхности соматической клетки с помощью молекул МНС класса I, что вызывает формирование цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако при введении в состав белка секреторного пептида он, в основном, секретируется во внеклеточное пространство, и реализуется механизм гуморального иммунного ответа.

1.2.3. Обоснование выбора стратегии профилактики инфицирования *M. tuberculosis*

Если рассмотреть микобактериальную инфекцию, то, при попадании в организм человека, на слизистые, начинает немедленно действовать врожденный иммунитет.

Классический вариант адаптивного иммунного ответа на инфицирование микобактерией – развитие гранулемы с последующей элиминацией (выздоровление), либо изоляцией патогена (переход в латентную форму), сопровождающееся хроническим воспалением – гиперчувствительностью замедленного типа (ГЗТ). При этом презентация осуществляется антиген-презентирующими клетками – макрофагами, главным образом, и дендритными клетками - с помощью молекул МНС второго класса, и в данном ответе участвуют Т-хелперы первого типа. Клетки-эффекторы при этом – макрофаги, фибробласты и эозинофилы. Также на модели мышей, зараженных бактерией *M. tuberculosis*, было показано [4], что весьма вероятно, что при образовании антител к ней и их взаимодействии с ингибиторным рецептором Fc-фрагмента FcγRIIB в организме реализуется механизм антитело-зависимого усиления инфекции [5]. Данный тип рецептора присутствует на макрофагах, дендритных клетках и В-клетках [4].

Поскольку микобактерии, как правило, успешно преодолевают воздействие врожденного иммунитета и инфицируют макрофаги, с дальнейшим развитием различных последствий, усложняющих борьбу с данным патогеном, то ключевым способом противостоять инфицированию является блокировка проникновения данного патогена в место локализации и/или способствование блокированию выхода из-под контроля иммунного ответа.

На поверхности микобактерий экспонированы гликолипиды, липоарабиноманнан, а также поверхности белков, формирующих поры с малым временем жизни и каналы с более длительным временем жизни. Поры и каналы представлены белковыми молекулами. Также микобактерии синтезируют секретлируемые белки, в частности для прикрепления к слизистой оболочке, высланной фибронектином.

Поскольку механизм и эффективность формирования приобретенного иммунитета с иммунологической памятью наиболее хорошо изучен и продемонстрирован, соответственно, в ответ на молекулы белковой природы, ключевыми мишенями для формирования антиген-специфичного иммунного ответа целесообразно считать три названные последними группы молекул.

Причем для профилактической вакцины крайне важным является добиться формирования антител на данные белки, чтобы запустить захват микобактерий с формированием фаголизосомы. Данного эффекта возможно достичь при индукции профилактической вакциной гуморального иммунного ответа с формированием соответствующей иммунологической памяти.

При этом индуцируется формирование Т-хелперов второго типа. Антиген-презентирующие клетки в данном случае – В клетки, главным образом, а также макрофаги и, в меньшей степени, дендритные клетки. Эффекторными клетками – активированные В-лимфоциты, дифференцирующиеся в плазматические клетки. Возможность синтеза антител на белки микобактерий продемонстрирована в нескольких исследованиях, больший титр антител выявлен к мембран-ассоциированным белкам микобактерий, чем к цитозольным, причем опсонизация антителами к поверхностным антигенам микобактерий, либо их пассивный перенос способствуют защите против инфекции [84].

В результате такого иммунного ответа продуцируются специфичные антитела, происходит опсонизация бактерий и фагоцитоз клетками мононуклеарной системы, в которых они подвергаются инактивации и разрушению.

Крайне важно, что данный механизм реализуется, когда бактерии локализируются вне клеток.

Данный механизм, безусловно, также имеет место быть при инфицировании микобактериями, но осуществляется в очень низкой степени и на более позднем этапе, чем при проникновении бактерий, поскольку для его реализации требуется время для клональной селекции, т.к. встреча с данным патогеном – первичная; что значительно снижает его эффективность в борьбе с данным патогеном в указанном случае.

Однако учитывая, что не всегда к моменту вакцинации встречи с микобактериями не происходит, разрабатываемая вакцина должна также индуцировать формирование и Т-клеточного иммунного ответа, с развитием иммунологической памяти.

1.2.4. Вакцинация против туберкулеза в настоящее время

На сегодняшний день единственной зарегистрированной и применяемой вакциной является BCG (БЦЖ), содержащая живые микобактерии вакцинного штамма БЦЖ-1 (см. 1.1.3.2.), а также БЦЖ-М, содержащая те же микобактерии, но в вдвое меньшем количестве [85], введение осуществляется с использованием натрия хлорида раствора для инъекций 0,9%.

После проведения вакцинации штамм БЦЖ начинает трансформироваться в L-формы. В таком виде МБТ штамма БЦЖ могут длительно, 5—7 лет, сохраняться в организме, поддерживая достаточно стойкий иммунологический эффект вакцинации [19]. Иммунитет, индуцированный вакциной БЦЖ, формируется приблизительно через шесть недель после иммунизации [86].

Для вакцины БЦЖ в настоящее время во всем мире наиболее широко используется внутрикожный способ введения, и он является единственным методом введения данной вакцины, разрешенным ВОЗ [87]. Дерма и эпидермис кожи человека богаты антиген-презентирующими клетками [88], что делает такой способ доставки вакцины эффективным. Показано, что чрескожное введение БЦЖ менее эффективно в отношении стимуляции синтеза гамма-интерферона Т-хелперами 1 типа, чем внутрикожное, при этом продемонстрированы одинаковая протективность и безопасность у младенцев и детей младшего возраста при данных способах введения БЦЖ.

Однако внутрикожный способ введения технически более сложен и, соответственно, требуется более профессиональная подготовка специалистов и более интенсивный контроль качества программы иммунизации [87]. Более простой способ введения вакцины против туберкулеза был бы предпочтительным.

В дерме присутствует большое количество дендритных клеток, в эпидермисе – их разновидность - клетки Лангерганса, которые способны презентировать антиген как с помощью МНС первого класса, и второго. Однако ввиду того, что при вакцинации невозможна реализация механизма опсонизации IgG в первое время, микобактерии поглощаются с дальнейшей реализацией механизма фагосомы, без слияния с лизосомой. Микобактерия из БЦЖ захватывается макрофагами, но не выходит в цитоплазму, и презентация осуществляется, главным образом, через МНС второго класса. Кроме того, при введении внутрикожно, т.е. в дерму, микобактерии из БЦЖ не реализуется механизм с использованием микроокружения, например, белка А сурфактанта, как при естественном инфицировании, приводящий к гибели микобактерий. Это также, как можно предположить, может способствовать развитию антителизависимого усиления инфекции.

Внутримышечное введение используется для большинства зарегистрированных вакцин в мире. Известны единичные случаи введения вакцины БЦЖ человеку внутримышечно, непреднамеренные, при этом наблюдалось развитие в течение длительного времени серьезных локальных реакций, однако развитие туберкулеза не происходило [89–91]. Тем не менее, развивающиеся побочные явления не позволяют применять вакцину БЦЖ внутримышечно, несмотря на то, что в нашем исследовании продемонстрирована большая эффективность БЦЖ при таком типе введения, чем при стандартном. Однако в нашем исследовании введение осуществлялось двукратное, а также в составе препарата введения содержался гидроксид алюминия в качестве адьюванта. Вакцины, содержащие алюминий или «масло-в-воде» адьюванты могут иметь неприемлемую местную реактогенность после внутрикожного введения [88]. Такие адьюванты можно вводить внутримышечно.

Также следует отметить, что вакцинация БЦЖ защищает, причем только младенцев и детей младшего возраста, только от самых тяжелых форм туберкулеза, и данная защита не является длительной, и не защищает от инфицирования микобактериями. Вакцинация БЦЖ в детском возрасте эффективна в отношении заболевания милиарной формой туберкулеза легких и туберкулезным менингитом. Однако в последние годы усиливаются сомнения относительно ее универсальности и эффективности. Необходимо отметить, что развитие туберкулеза на сегодняшний день отмечается не только у некачественно вакцинированных или невакцинированных детей, но и у лиц, которым вакцина БЦЖ была введена правильно и своевременно [92].

Завершенное 60-летнее изучение результатов вакцинации американских индейцев показало, что долгосрочная эффективность БЦЖ-вакцинирования составляет 52% [93]. Также следует отметить, что БЦЖ, подобно другим живым вакцинам, способна вызывать отрицательные побочные эффекты. Осложнения при вакцинации БЦЖ наблюдаются, в частности, у детей, инфицированных ВИЧ, еще до рождения. Принципиальным недостатком вакцины БЦЖ является постепенное (в течение 3–7 лет) снижение поствакцинального иммунитета. Согласно результатам контролируемых исследований, это приводит к практически полному отсутствию защитного эффекта уже через 10 лет после вакцинации [94]. В то же время использование БЦЖ для ревакцинации, направленной на поддержание противотуберкулезного иммунитета, по данным экспертов ВОЗ, признается неэффективным [95], и это подтверждают результаты рандомизированного исследования, проведенного в Бразилии с участием более 300 000 школьников в возрасте от 7 до 14 лет [96].

В 2015 году показано, что защитная эффективность против туберкулеза, обусловленная БЦЖ, также реализуется клетками врожденного иммунитета ILC1 (innate lymphoid cell) и ILC3 в легких для контроля раннего инфицирования микобактериями, при этом корреляции индукции Т-хелперов первого типа с протективностью не наблюдалось [97]. В последних публикациях по БЦЖ фигурирует понятие "trained immunity" – «натренированный врожденный иммунитет», считается, что он играет немалую роль в защите, индуцируемой БЦЖ [98,99]. Однако поскольку такая защита не является той, какую должна обеспечивать вакцина против туберкулеза, разработка новых эффективных безопасных вакцин является актуальной.

Таким образом, к настоящему времени назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом, в первую очередь с его легочной формой.

1.2.5. Современный взгляд на вакцинацию против туберкулеза

Характеристика иммунного ответа на *M. tuberculosis* в значительной степени сфокусирована на клеточно-опосредованном иммунитете [100–102]. Разработка вакцин против внутриклеточных патогенов, включая микобактерии туберкулеза, в основном, основана на Т-клеточно-ориентированном подходе [103]. Существуют, однако, экспериментальные доказательства того, что гуморальный иммунитет может существенно сказаться на иммунной защите против патогенов с предпочтительной внутриклеточной локализацией (рассмотрен в [104,105]). Использование же более широкого подхода, включающего и клеточно-опосредованный, и гуморальный иммунитет, характеризующего иммунный ответ на микобактерии, вероятно, позволит получить новые выводы, которые могут помочь в разработке противотуберкулезной стратегии, в том числе иммунотерапии и вакцинации.

Очевидно, что В-клетки обладают несколькими средствами для модуляции развития иммунных реакций, независимо от их способности к синтезу антител, включая усиление Т-клеточного иммунитета.

Одна из важных регулирующих иммунную систему способностей антител опосредуется через взаимодействие с антигенами, в результате образуются иммунные комплексы, которые могут связываться с Fc γ рецептором (Fc γ R), чтобы модулировать широкий спектр иммунных функций клеток, относящихся ко многим патологическим состояниям [106]. Очень хорошо изученной областью является область влияния сигналинга Fc γ R на антиген-презентирующие клетки и последующее воздействие на их эффекторные функции, включая праймирование Т-клеток [107,108].

Появляется все больше работ, указывающих на роль гуморального иммунитета в обеспечении оптимальной защиты против внутриклеточных патогенов в целом (рассмотрен в [109–111]), и *M. tuberculosis* в частности (рассмотрены в [108,110,112,113]). Однако следует учитывать феномен антигенного импринтинга [114], а также антителозависимого усиления инфекции [115].

В настоящее время реализуется несколько стратегий иммунизации против туберкулеза.

- Праймирование (Prime): замена БЦЖ живой рекомбинантной БЦЖ (rBCG) или генетически инактивированными вакцинными кандидатами микобактерии туберкулеза, что придает большую безопасность и защитное действие [116]. При разработке альтернативного вакцинного кандидата на основе безопасных рекомбинантных конструкций станет возможным преодоление рисков, связанных с мутациями и полиморфизмами у прививаемых, приводящих к серьезным побочным эффектам при использовании живых или инактивированных вакцин у

таких субъектов [117]. Также учитывая феномены антигенного импринтинга и антителозависимого усиления инфекции [115], важно при разработке профилактических вакцин против туберкулеза тщательно продумывать дизайн молекул(ы) и индуцировать, прежде всего, цитотоксический ответ, а также в отношении гуморального ответа обеспечить формирование нейтрализующих антител, соответственно.

- Бустирование (Prime-Boost): усиление ограниченного иммунитета, сформированного БЦЖ (или усиление специфичных антигенов, презентруемых рекомбинантной БЦЖ или ослабленной микобактерией туберкулеза), используя вакцинные кандидаты на основе вирусного вектора или субъединичной вакцины с адьювантом. Вакцины такого типа нацелены на усиление защиты после вакцинации БЦЖ в младенчестве или в подростковом возрасте, когда защита БЦЖ начинает нивелироваться [116]. Однако учитывая феномен антигенного импринтинга [115], крайне важно корректно подобрать бустерный вакцинный кандидат. Также важно не допустить формирования процессов, приводящих к антителозависимому усилению инфекции.

- Иммунотерапевтический: Разработка терапевтических вакцин, которые могут быть использованы с химиотерапией для того, чтобы сократить лечение активного туберкулеза или латентной туберкулезной инфекции. Терапевтические вакцины в стадии разработки - цельноклеточные и фрагментированные микобактерии, хотя некоторые из этих кандидатов также демонстрируют профилактический потенциал [116]. Однако, учитывая феномен антителозависимого усиления инфекции [115], а также антигенного импринтинга [114], важно корректно подобрать вакцинный кандидат.

Многие авторы [118–121] прямо ставят вопрос о необходимости обязательного изучения феномена антителозависимого усиления инфекции в процессе разработки вакцин и при проведении массовых вакцинаций. Adalja A. и Henderson D.A. [122] настаивают на изменении политики вакцинации с учетом феномена антигенного импринтинга. Важно обращать внимание на систему доказательств протективного эффекта вакцины и ее безопасности. Важно, чтобы демонстрировались не только динамика и титры специфических антител, но и доказательства протективного эффекта в опытах на животных (доклинические исследования), в том числе чтобы приводились экспериментальные данные по этим феноменам - антителозависимому усилению инфекции, антигенному импринтингу и суперантигенному эффекту среди представителей патогена данного семейства [121].

1.2.6. Кандидатные вакцины против туберкулеза, в отношении которых проводят клинические исследования

Клиническое исследование (clinical investigation) (клиническое испытание, клиническое изучение) - системное исследование с участием одного или более человека в качестве субъекта, проводимое для оценки безопасности или функциональных характеристик медицинского изделия [123]. Что интересно, первое слепое рандомизированное клиническое исследование было проведено именно в отношении туберкулеза: в 1931 г. Джеймсом Амберсоном проводилось сравнение эффективности лечения туберкулеза препаратами золота (санокризин) с плацебо [124].

Проводятся последовательно четыре фазы клинических исследований:

I фаза: тестирование на небольшой группе людей (20-80) впервые, цель заключается в оценке безопасности и выявлении побочных эффектов,

II фаза: тестирование на большой группе людей (100-300), цель заключается в выявлении эффективности и оценке безопасности,

III фаза: тестирование в больших группах людей (1000–3000), цель заключается в том, чтобы подтвердить эффективность, также проводится мониторинг побочных эффектов, сравнение со стандартным или эквивалентным лечением, и собирается информация, которая позволит безопасно применять,

IV фаза: после регистрации и вывода на рынок отслеживается безопасность, осуществляется поиск дополнительной информации, оцениваются риски и выгода, осуществляется оптимизация использования [125].

В настоящее время проводятся клинические исследования в отношении 13 вакцинных кандидатов для профилактики туберкулеза: рекомбинантные BCG, вакцины – дериваты цельных клеток, рекомбинантные платформы с вирусным вектором, комбинации белка и адьюванта, и микобактериальные экстракты. Эти вакцинные кандидаты направлены либо на предотвращение инфекции, либо на предотвращение прогрессирования или реактивации туберкулеза из латентной стадии. Латентный туберкулез определяется как состояние стойкого иммунного ответа на микобактерии туберкулеза без клинических проявлений признаками активного заболевания туберкулезом. Существуют две группы риска, для которых ВОЗ рекомендует проводить специфичные диагностику и лечение в отношении латентного туберкулеза: дети в возрасте до 5 лет, которые находятся в домашнем контакте с заболевшими легочной формой туберкулеза, и люди с ВИЧ [3].

Поскольку для борьбы с туберкулезом зарегистрированы только вакцины БЦЖ и БЦЖ-М, известны лишь вакцинные кандидаты, изучаемые в, максимум, III фазе клинических

исследований. Рассмотрим такие вакцинные кандидаты, начиная с наиболее близких к внедрению.

1.2.6.1. Вакцинные кандидаты в III фазе клинических исследований

Единственным вакцинным кандидатом, находящимся в III фазе клинических исследований, является Vassae™, который представляет собой специфичный лизат, который соответствующее агентство Китая, China Food and Drug Administration, лицензировало в качестве иммунотерапевтического агента для сокращения сроков лечения туберкулеза у пациентов с лекарственно-чувствительной формой данного заболевания. В настоящее время проводится исследование у людей с латентным туберкулезом, 15-65 лет [3].

1.2.6.2. Вакцинные кандидаты во II фазе клинических исследований

VRM 1002 - живая рекомбинантная кандидатная вакцина на основе рекомбинантного штамма БЦЖ, в который клонирован ген листериолизина (*Listeria monocytogenes*) и из которого удален ген уреазы, для увеличения иммуногенности. Принцип действия - использованы гемолитические свойства белков-цитолизин, которые обладают способностью образовывать поры в фагосомальной мембране клетки-хозяина, обеспечивая выход антигенов в цитоплазму и праймирование CD8+ Т-лимфоцитов [126]. II Фаза клинических исследований реализуется в Южной Африке, оценивается безопасность и иммуногенность вакцины у ВИЧ-контактных и неконтактных новорожденных. III Фаза клинических испытаний для профилактики заболевания туберкулезом у взрослых планируется в Индии [3].

M72/AS01E – это рекомбинантный гибридный белок на основе антигенов 32A и 39A *M. tuberculosis*, с адьювантом AS01E [3]. Адьювант AS01 представляет собой суспензию липосом с двумя иммуностимулирующими компонентами: 3'-О-декацил-4'-монофосфорил липид А (MPL) и сапонин 21 (QS21), полученный из экстракта растения Квиллая мыльная (*Quillaja saponaria*) [127]. Большое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование II фазы проводится среди не больных туберкулезом легких, положительных по анализу высвобождения интерферона гамма, ВИЧ-отрицательных взрослых в Кении, Южной Африке и Замбии. Первичной конечной

точкой является защитная эффективность двух доз M72/AS01E против легочного туберкулеза. Вторичные конечные точки включают безопасность и иммуногенность [3].

DAR-901 бустерный вакцинный кандидат – цельноклеточный инактивированный высокой температурой вакцинный кандидат на основе нетуберкулезной микобактерии *M. obuense* [128]. Показана его эффективность в фазе III клинических испытаний в Объединенной Республике Танзании среди людей, которые были ВИЧ-положительными. В результате I фазы исследований в Соединенных Штатах Америки, в качестве бустера, среди БЦЖ-праймированных взрослых с и без ВИЧ-инфекции, обнаружено, что он был безопасен и хорошо переносится. 2-Летнее исследование II фазы начато среди подростков в апреле 2016 года в Объединенной Республике Танзания [3].

RUTI® - неживой полиантигенный вакцинный кандидат на основе фрагментированной и лишенной токсинов микобактерии туберкулеза, заключенной в липосомальную мембрану [129]. Он разрабатывался как иммунотерапевтическая вакцина, для использования в сочетании с короткой интенсивной антибактериальной терапией. Недавно была завершена фаза II испытаний в Южной Африке, другие клинические исследования находятся в стадии планирования [3].

H4:IC31 и H56:IC31v – субъединичные кандидатные вакцины, содержащие адъювант IC31. Адъювант IC31 представлен синтетическим антимикробным пептидом KLKL5KLLK, действие которого направлено на усиление взаимодействия антиген-презентирующих клеток с антигеном, и TLR9 - лигандом ODN1a, обладающим иммуностимулирующим действием.

H4:IC31 разрабатывался как бустерный вакцинный кандидат к БЦЖ и содержит гибридный белок на основе антигенов *M. tuberculosis* Ag85B и TB10.4, а также адъювант IC31. Он проходит испытания в Южной Африке во II фазе этапа предварительной проверки концепции исследования профилактики туберкулеза среди отрицательных по анализу высвобождения интерферона гамма, ВИЧ-негативных подростков с высоким риском заражения *M. tuberculosis*; интенсивное исследование иммуногенности ведется в той же популяции. H4:IC31 также оценивается в фазе I/II испытаний у детей [3].

H56:IC31 содержит три антигена *M. tuberculosis* - Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, а также адъювант IC31. Завершена I фаза исследования по оценке безопасности и иммуногенности у ВИЧ-отрицательных взрослых с и без химиотерапии и без истории или признаков заболевания туберкулезом. Два испытания I фазы были завершены, чтобы определить профиль безопасности и иммуногенности H56:IC31 у ВИЧ-отрицательных, БЦЖ-вакцинированных взрослых с и без латентного туберкулеза, и у пациентов, которые недавно лечились от легочной формы туберкулеза. Эти клинические испытания I фазы продемонстрировали приемлемый профиль безопасности и иммуногенность при всех исследованных дозах. В настоящее время проводится II фаза исследований, включающая H4:IC31, H56:IC31 и БЦЖ, у 84 подростков [3].

ID93 + GLA-SE содержит слитый белок, состоящий из трех иммунодоминантных антигенов *M. tuberculosis* - Rv2608, Rv3619, Rv3620 и одного ассоциированного с латентной стадией антигена *M. tuberculosis* - Rv1813 и адъювант GLA-SE [3]. Адъювант GLA-SE (Glucopyranosyl Lipid Adjuvant-Stable Emulsion) представляет собой стабильную эмульсию глюкопиранозил липида, который стимулирует активацию Т-хелперов 1 типа (Th1) и выработку цитокинов, таких как IFN- γ , TNF и ИЛ-2 [130]. Завершено исследование I фазы у БЦЖ-вакцинированных, QuantiFERONTB- Gold отрицательных и положительных здоровых взрослых в Южной Африке. Показано, что ID93 антиген (2 мг или 10 мг) в сочетании с GLA-SE адъювантом (2 мг или 5 мг), в трех дозах, имели приемлемый профиль безопасности у БЦЖ-вакцинированных здоровых взрослых (отрицательных и положительных по тесту QuantiFERON). В целом, наблюдали CD4+ ответ значительно выше во всех трех случаях, по сравнению с плацебо. Фаза IIa испытания в Южной Африке нацелена на оценку безопасности и иммуногенности у ВИЧ-наивных пациентов с туберкулезом, которые недавно закончили лечение туберкулеза легких [3].

1.2.6.3. Вакцинные кандидаты в I фазе клинических исследований

MTBVAC – это вакцинный кандидат на основе живой микобактерии туберкулеза, аттенуированного штамма, у которого делетированы гены *phoP*, кодирующий ключевой транскрипционный фактор для регуляции вирулентности *M. tuberculosis*, и *fadD26*, необходимый для синтеза сложных липидов DIM (phthiocerol dimycocerosates) [131], одних из основных факторов вирулентности микобактерий, и отсутствуют маркеры устойчивости к антибиотикам. Целевая популяция - новорожденные (замена вакцины БЦЖ), вторичная мишень - подростки и взрослые (бустерная вакцина). В сентябре 2015 года MTBVAC перешел в Ib фазу клинических исследований у младенцев [3].

Ad5 Ag85A - вакцинный кандидат на основе вектора на основе серотипа 5 аденовируса, с которого синтезируется белок Ag85A. Он был оценен на безопасность и иммуногенность на 24 здоровых добровольцах (БЦЖ-наивные и ранее привитые БЦЖ) в Канаде. В целом, была показана его безопасность, хорошая переносимость и иммуногенность в обеих опытных группах, стимулировался полифункциональный Т-клеточный ответ. Более мощная иммуногенность наблюдалась у ранее БЦЖ-вакцинированных добровольцев. Недавно было завершено исследование безопасности и иммуногенности аэрозольного введения вакцины [3].

ChAdOx1.85 A - вакцинный кандидат на основе обезьяньего аденовируса, с которого синтезируется белок Ag85A, который был разработан, чтобы усилить БЦЖ - индуцированную

защиту. Он исследуется в I фазе клинических исследований на БЦЖ-вакцинированных взрослых, как в одиночку, так и в рамках стратегии прайминга и бустирования (prime-boost strategy) с MVA85A [3].

MVA85A (Aerosol) представляет собой распыляемый вакцинный кандидат MVA85A, безопасность и иммуногенность которого была испытана у 24 БЦЖ-вакцинированных взрослых в Объединенном Королевстве в I фазе клинических исследований. Показано, что вакцинация распыляемым вакцинным кандидатом MVA85A безопасна и экономически выгодна по сравнению с внутрикожным введением MVA85A, и индуцирует более сильный CD4+ Т-клеточный ответ, чем внутрикожное введение MVA85A. Дальнейшие исследования - оценка аэрозольного введения у лиц с латентной стадией туберкулеза [3]. MVA85A - модифицированный вирус коровьей оспы Анкара (MVA), с которого синтезируется консервативный антиген микобактерий Ag85A [132].

TB/FLU-04 L – вакцинный кандидат, который был разработан Научно-Исследовательским Институтом Проблем Биологической Безопасности и Научно-Исследовательским Институтом Гриппа в Российской Федерации, и представляет собой вектор на основе штамма вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) - ослабленный вектор, не способный к репликации, с которого синтезируются антигены *M. tuberculosis* Ag85A и Esat-6. Он был разработан как мукозальная бустерная вакцина для детей, подростков и взрослых. Недавно была завершена фаза I у БЦЖ-вакцинированных негативных по QuantiFERON-TB-Gold здоровых взрослых добровольцев с помощью интраназального введения, а также запланирована фаза II клинических исследований [3].

1.2.7. Кандидатные вакцины против ТБ, исследованные на эффективность

Поскольку на данный момент разработано множество вакцинных кандидатов против туберкулеза на основе веществ разной природы, рассмотрим обзорно наиболее близкие к предложенным в настоящей работе.

Известны следующие немногочисленные решения на основе белков Ag85A, Ag85B и TB10.4 *M.tuberculosis*.

Известна трансформированная бактерия (BCG), которая содержит чужеродную нуклеотидную последовательность, например, плазмидную ДНК, не связанную с селективным маркером, которая кодирует белок из Ag85A, Ag85B или TB10.4, либо более одной из таких нуклеотидных последовательностей [133].

Известен способ терапии туберкулеза в активной стадии, в том числе с МЛУ и ШЛУ, введением аденовирусного вектора серотипа 26 или 35, либо обоих, в системе prime-boost, несущего гены, кодирующие белки Ag85A, Ag85B и TB10.4 *M.tuberculosis*, либо несущего ген, кодирующий гибридный белок из приведенных антигенов, при этом введение вектора неоднократное [134]. Известна кандидатная вакцина на основе аденовирусного вектора, который кодирует ОРС хотя бы двух белков из Ag85A, Ag85B и TB10.4, в одном из вариантов осуществления – где такая конструкция связана, таким образом с вектора синтезируется гибридный белок. Также заявлен один из вариантов конструкции, когда дополнительно используют холерный токсин (CtxA1), в сшивке с антигенной составляющей [135]. Известны нуклеотидные последовательности, кодирующие конструкции Ag85B-TB10.4, Ag85B-ESAT6-TB10, в составе аденовирусного или поксвирусного векторов, в том числе в системе prime-boost с BCG и гBCG, в качестве вакцинных кандидатов [136].

Известна полиэпитопная противотуберкулезная ДНК-вакцина, содержащая один тип носителя, плазмидную ДНК pcDNA3, и одну вставку-сегмент целевого гена, на 5' конце которого находится ген, кодирующий белок HSP65, на 3' конце последовательно расположены нуклеотидные последовательности, кодирующие эпитопы белков ESAT-6, с 1 по 20 нуклеотид и с 61 по 81 нуклеотид, Ag85A, с 62 по 84 нуклеотид, Ag85B, с 121 по 155 нуклеотид, снова Ag85A, с 143 по 166 нуклеотид, Ag85B, с 234 по 256 нуклеотид, MPT64C, с 177 по 228 нуклеотид, последовательности соединены нуклеотидной последовательностью, кодирующей AAУ, причем HSP65 и полиэпитопный фрагмент синтезируются отдельно, HSP65 - методом ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК микобактерий, полиэпитопный фрагмент синтезируют химически, затем фрагменты сшиваются [137]. Таким образом, создание конструкции усложняется введением этапов сшивки фрагментов. Также непонятно, какой материал используется для синтеза гена HSP65: при использовании лизата микобактерий возникает риск заражения. Известна противотуберкулезная ДНК-вакцина, доставляемая с помощью хитозановой системой доставки, содержащая хитозан и плазмиды, содержащие полноразмерный ген *hsp65* и фрагменты ДНК, кодирующие Т-клеточные эпитопы белков ESAT-6(189-228), Ag85A(369-405), CFP10(162-207) и Ag85B(420-459), в форме капель для носа [138].

Известна плазмидная ДНК pcDNA3.1, несущая химерный ген, который содержит ген, кодирующий белок Ag85a микобактерий туберкулеза и ген, кодирующий 125-282 аминокислоты белка Ag85b микобактерий туберкулеза, причем фрагмент гена *Ag85b* расположен в гене *Ag85a*, по сайту узнавания эндонуклеазы Kpn I и/или Acc I, это фрагменты, соответствующие а.о. 245-250 или 430-435, соответственно [139].

Известна вакцина против хронического заболевания, например, бактериальной инфекции, содержащая смесь перекрывающихся пептидов, охватывающих всю последовательность

аминокислот белка, в том числе Ag85B или TB10.4, которая также может содержать адъювант – катионные липосомы, также может дополнительно вводиться полноразмерный белок, охватываемый пептидами в первом введении [7]. Указано, что в одном из вариантов изобретения пептиды получают гидролизом белка с использованием более, чем двух протеолитических агентов, однако в данном случае осложняется процесс получения для вакцины пептидной смеси без примесей. Более того, условия хранения такой пептидной смеси могут опосредовать проблемы при реализации данного изобретения. Однако использование вакцины со значительно меньшим количеством компонентов является более оптимальным вариантом, как для производства, так и для применения, в последнем случае, поскольку вероятность развития осложнений за счет возможных неспецифических реакций меньше.

Известен способ получения гибридной конструкции TB10.4-Hsp16.3, по которому гены, кодирующие данные белки, клонируют по разным сайтам рестрикции в плазмиде, полученной плазмидой трансформируют клетки *E.coli* [140]. Известна гибридная конструкция TB10.4-Ag85B-антиген, вызванный голоданием микобактерий (вырабатывается, как минимум, в 6,5 раз больше после того, как подвергнуть микобактерию голоданию) [141].

Однако возможно добиться дополнительного увеличения иммуногенности вакцины при использовании адъюванта.

Известен гибридный полипептид, одним из вариантов изобретения является белок на основе белка семейства ESAT-6 и белка MPT59 (Ag85B), либо одного Т-клеточного эпитопа MPT59, а также композиция, дополнительно содержащая адъювант из DDA, Quil A, poly I:C, неполного адъюванта Фрейнда, IFN- γ , IL-2, IL-12, MPL и MDP [142]. Известна вакцина, содержащая гибридный белок, содержащий аминокислотные последовательности, кодирующие гибридные белки Ag85B-TB10.4, дополнительно может применяться адъювант [8]. Известна фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок, содержащий аминокислотные последовательности Rv0288 (TB10.4) и хотя бы один агент из фрагмента в том числе Ag85B, дополнительно может применяться адъювант [9]. Известна иммуногенная композиция, содержащая микобактериальные антигены в форме отдельных полипептидов, либо в форме одного или более слитых белков, либо совместно отдельных полипептидов и слитых белков, слитый белок содержит антигены *M. tuberculosis* Ag85B, TB10.4 и ESAT6, также дополнительно может применяться адъювант [15]. Известна иммуногенная композиция, содержащая гибридный белок, который дополнительно содержит белки Ag85B, TB10.4, а также содержащая адъювант [10–13].

Известен гибридный белок, в одном из вариантов гипотетически содержащий белок Rpf (Mycobacterium Resuscitation Promoting Factor) в качестве адъюванта и белки Ag85B, TB10.4 [143]. Однако, данная конструкция не охарактеризована структурно, последовательность

приведена лишь для гибридного белка, содержащего белки RpfB - Dhyb, Ag85B, TB10.4 и ESAT6, RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6 из 849 а.о.. Последний белок достаточно велик, что затрудняет принятие им конформации, при которой возможно одновременное функционирование всех требуемых компонентов белка, что может привести к трудностям при реализации заявленных функций.

Использование адъюванта позволяет усилить иммуногенность вакцин, однако важно подобрать адъювант, который позволит индуцировать наиболее специфичный по отношению к патогену иммунный ответ, в данном случае способный стимулировать Т-клеточный иммунный ответ, наряду с В-клеточным, а также который будет способствовать формированию местного иммунитета. Считаем флагеллин наиболее оптимальным вариантом для данных целей.

Известна вакцинная композиция, содержащая один или более из источников белков DosR и, в одном из вариантов, адъювант, в одном из вариантов - из бактериальных флагеллинов [144].

Известна композиция для вакцинации, содержащая полипептид, включающий антигенные части в одном из вариантов осуществления белков Ag85B и TB10.4, также содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд CD40, либо пептид, который обладает способностью связываться с лигандом CD40 и активировать рецептор CD40, экспрессированный на антитело-продуцирующих В-лимфоцитах, которая в одном из вариантов изобретения также содержит флагеллин [14]. Недостатком является многокомпонентность, три разных компонента в составе одной вакцины. Более того, гибридный белок не охарактеризован структурно, лишь обозначены его компоненты. Также предлагается использовать полноразмерный флагеллин, причем не указана его принадлежность к тому или иному организму, а также не указан тип флагеллина, например, для флагеллина *Salmonella* - FliC или FljB.

Таким образом, указание микроорганизма, флагеллин которого используется, а также типа используемого флагеллина (например, для *Salmonella*) является существенным.

Более того, известные флагеллиновые адъюванты проявляют значительные побочные эффекты, и, в частности, собственную антигенную активность и системные провоспалительные свойства при введении *in vivo*. В связи с вышесказанным реализация изобретения, описанного в публикации [14], ставится под вопрос.

1.2.8. Обоснование выбора в качестве иммуногенов предложенных молекул

Современные вакцины конструируются по принципам большей безопасности, чем БЦЖ. Так, у вакцинных кандидатов VPM 1002 и DAR-901 это реализуется путем использования

дополнительного гена, обеспечивающего выход бактерии из фагосомы, и использования нетуберкулезной микобактерии, с дополнительной инактивацией высокой температурой, соответственно. В данном случае реализуется механизм презентации антигенов через МНС первого класса, при этом должны индуцироваться CD8⁺ цитотоксические Т-клетки, которые из цитокинов синтезируют в том числе TNF β , вызывающий апоптоз клеток. Антиген-презентирующие клетки в данном случае – дендритные клетки, главным образом, а также макрофаги, реже. Эффекторными клетками – активированными CD8⁺ цитотоксическими Т-клетками. В результате такого ответа индуцируется апоптоз инфицированных клеток.

Однако следует помнить о том, что при введении убитых при высокой температуре микобактерий развивается адьювантный артрит [145]. Вакцинный кандидат MTBVAC – на основе микобактерии туберкулеза, с ослабленной вирулентностью и чувствительной к антибиотикам, но, учитывая способность микобактерий к изменчивости, данный вакцинный кандидат потенциально наименее безопасен. Также учитывая недостаточную продолжительность защиты, индуцируемой БЦЖ, вероятно основанную на природе действующего агента вакцины, весьма вероятно, что и защита данными вакцинными кандидатами будет осуществляться также временная.

Все виды вакцин, не содержащих живые микроорганизмы, являются более безопасными не только из-за отсутствия рисков инфицирования, но и из-за отсутствия рисков развития побочных явлений у людей с мутациями в генах, обуславливающих строение молекул, ключевых для корректного функционирования иммунной системы.

Следует учитывать, что при инактивации бактерий используемые вещества могут вызывать изменение структуры антигенов, что может приводить к феномену антигенного импринтинга, когда антитела, полученные в отношении антигенных белков инактивированных бактерий обладают сниженной протективной способностью по сравнению с антителами, полученными в отношении этих же антигенов живых вакцин [114].

Лизат микобактерий также является более безопасным вариантом и используется в вакцинном кандидате RUTI®, там такой лизат дополнительно лишен токсинов. Однако необходимо учитывать, что специфичность иммунного ответа может быть более важна для защиты против микобактерий, чем его амплитуда [146].

Ряд вакцинных кандидатов создан на основе вирусных векторов: аденовируса - Ad5 Ag85A, ChAdOx1.85 A, вируса гриппа - TB/FLU-04 L. Однако использование аденовируса для доставки иммуногена также несет в себе риски. Вирусные векторы имеют ряд недостатков, в их числе то, что они дорогостоящи и могут вызывать воспалительную реакцию, что исключает повторное введение вектора, а также иметь самостоятельную активность. Также вирусные векторы обладают способностью реплицироваться, что снижает степень контроля над

экспрессией целевого гена, что, в свою очередь, не всегда желательно и применимо. Способ получения вирусов также обуславливает риски попадания в препарат на их основе молекул, которые могут вызвать нежелательные реакции. Также учитывая тот факт, что к 5-летнему возрасту практически все дети хотя бы один раз переносят аденовирусную инфекцию [147], вероятность эффективной работы данной конструкции достаточно мала ввиду возможности развития реакции на сам аденовирусный вектор.

Вирусные векторы и модифицированные патогены имеют и риски наследования, что может препятствовать их использованию у человека [148,149].

В 1890 году по инициативе Р.Коха в практику лечения туберкулеза был введен туберкулин с целью усиления репаративных процессов, но результаты лечения были неудачными [19].

Старый туберкулин Коха - водно-глицериновая вытяжка из туберкулезных культур микобактерий человеческого и бычьего типов, выращенных на мясопептонном бульоне с добавлением 4% раствора глицерина. Однако полученный таким путем туберкулин содержит протеиновые дериваты мяса и пептона, входящие в состав среды, что приводит к возникновению неспецифических реакций. Более специфичным и очищенным от балластных веществ является очищенный белковый дериват (Purified Protein Derivative — PPD), который представляет собой очищенный путем ультрафильтрации, осажденный трихлоруксусной кислотой, отмытый спиртом и эфиром и высушенный в вакууме из замороженного состояния фильтрат убитой нагреванием культуры микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего типов [19].

По своему биохимическому составу туберкулин является сложным соединением, включающим белки (туберкулопротеины), являющиеся действующим веществом, а также полисахариды, липидные фракции и нуклеиновую кислоту [19].

Туберкулин в инфицированном организме инициирует ответную реакцию антиген-антитела, подобную реакции на живую или убитую культуру микобактерий. В настоящее время установлено, что реакции организма на туберкулин являются классическим проявлением иммунологического феномена гиперчувствительности замедленного типа - ГЗТ, развивающегося в результате взаимодействия антигена (туберкулин) с лимфоцитами-эффекторами, имеющими на своей поверхности специфические рецепторы. При этом часть лимфоцитов погибает, выделяя протеолитические ферменты, обуславливающие повреждающее действие на ткани. Возникает воспалительная реакция не только в месте введения, но и вокруг туберкулезных очагов. При разрушении сенсibilизированных клеток выделяются активные вещества, обладающие пирогенными свойствами [19]. Весьма вероятно, что лечение туберкулеза с помощью туберкулина, апробированное Кохом, не увенчалось успехом из-за данного механизма.

Антитела к туберкулину выявляются [150], однако его использование для вакцинации не является перспективным. При наличии инфекции ее течение усугубляется, такая вакцина будет

менее безопасна, чем БЦЖ. Также в данном случае использование туберкулина для диагностики инфицированности человека микобактериями будет невозможным, что неприемлемо при сложившемся в настоящее время уровне техники. Также крайне важно то, что для элиминации патогена важную роль имеет цитотоксический иммунный ответ, который таким решением не сможет быть индуцирован.

Для развития корректного иммунного ответа в отношении микобактерий, с формированием иммунологической памяти, который позволит элиминировать микобактерию до обширного инфицирования и закрепления в соответствующих клетках в состоянии недоступности для работы иммунной системы, необходимо использовать конструкции на основе белков микобактерий, присутствующих в клеточной стенке или секретируемых, опосредующих взаимодействие микобактерий со слизистыми.

Также известно, что белок Hsp65 микобактерий туберкулезного комплекса имеет гомологию с молекулами, представленными в суставах [5], и вызывает формирование адьювантного артрита [6]. Это не позволяет использовать вакцины, его содержащие, то есть как ослабленные штаммы, живые, либо убитые микобактерии, так и лизаты, а также генно-инженерные вакцины, содержащие данный белок.

Самый безопасный вариант – использование субъединичных вакцин. Достоинства таких вакцин заключаются в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные молекулы, которые могли бы вызвать нежелательные эффекты в организме введения. Однако их эффективность варьирует и обуславливается массой факторов, одним из самых важных из которых является подбор компонентов.

По данному принципу созданы вакцинные кандидаты M72/AS01E, H4:IC31 и H56:IC31v, содержащие 2-3 антигена *M. tuberculosis* и адьювант из двух компонентов. Более оптимальным является использование одной слитой конструкции, так реализован вакцинный кандидат ID93 + GLA-SE, однако там также содержится отдельный адьювант, иной природы. Использование рекомбинантного гибридного белка позволит уменьшить количество компонентов вакцины, соответственно, упростить и удешевить ее производство, соответственно, и ее стоимость, при сообщении вакцине безопасности.

Аналогичные аргументы можно привести и в отношении вакцинных кандидатов, проходящих или прошедших доклинические исследования. Введение живой бактерии, в особенности микобактерии, пусть и аттенуированной, несет в себе риски, как и вируса. Использование вакцины на основе белка является более безопасной альтернативой.

Использование плазмидной ДНК для доставки иммуногена в организм также является безопасным, кроме того, получение такой молекулы и очистка достаточно просты, что позволяет

использовать в вакцине несколько таких плазмидных ДНК, кодирующих гены микобактерии туберкулеза [151,152], что и реализуется в предложенном вакцинном кандидате на основе плазмидных ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85a* и pcDNA3.1(+)*Ag85b* (далее – группа «ДНК в/м»). Показано, что после введения поддерживается экспрессия целевого гена [153–155], а также может быть усилено формирование Т- и В-клеток памяти [156,157], что ведет к формированию долгосрочного гуморального и клеточно-опосредованного иммунитета [158]. Кроме того, показано, что сама по себе ДНК, наряду с введением иглой, действует как адъювант, что опосредует презентацию синтезируемых целевых антигенов, главным образом, с помощью МНС первого класса, что индуцирует, в свою очередь, формирование цитотоксического ответа. Показано, что синтез одного внутриклеточного белка в больших количествах может способствовать активной презентации миофибриллами с помощью МНС первого класса [159]. Однако учитывая неоднозначно определенную роль, возможно, недооцененную, гуморального иммунного ответа в защите против туберкулеза, было принято решение исследовать созданные вакцинные кандидаты, для получения экспериментальных данных.

Учитывая предшествующий уровень техники, исследовались полученные вакцинные кандидаты в профилактической модели.

Также следует отметить, что при использовании химически синтезированных молекул, например, адъювантов, в том числе пептидов, следует понимать, что их часть может быть представлена энантиомерами, что может приводить к непредсказуемым результатам в организме при применении. Понятие энантиомерии играет важную роль в фармацевтике, поскольку разные энантиомеры лекарственных веществ, как правило, имеют различную биологическую активность. Использование живых систем для получения пептидных молекул позволяет получить молекулы природной структуры, гомогенную смесь. Однако учитывая особенности состава и строения некоторых пептидов, единственным способом их получения оказывается химический синтез.

Использование адъюванта позволяет усилить иммуногенность вакцин, однако важно подобрать адъювант, который позволит индуцировать наиболее специфичный по отношению к патогену иммунный ответ, в данном случае способный стимулировать Т-клеточный иммунный ответ, наряду с В-клеточным, а также который будет способствовать формированию местного иммунитета и который будет безопасным. Во всех вакцинных кандидатах использован в качестве адъюванта гидроксид алюминия, в гибридном белке содержатся фрагменты флагеллина, плазмидная ДНК имеет самостоятельное адъювантное действие, также в качестве дополнительных адъювантов были использованы рекомбинантные белки CRM197 и IL-7. Также показано, что белок TB10.4 обладает адъювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий [160], что позволяет предположить его роль также в качестве адъюванта

в составе гибридного белка. Кроме того, предполагают, что прямое физическое связывание флагеллина также позволяет значительно улучшать адьювантную активность агониста TLR-5 [161,162].

Для создания иммуногенов были выбраны иммунодоминантные секретируемые антигены *M.tuberculosis* – белки Ag85A и Ag85B комплекса белков 85 и белок TB10.4. На моделях мышей и кроликов ранее показано, что защита от заражения бактериями, выражаемая в уменьшении потери веса, обеспечивалась с использованием смеси секретируемых антигенов микобактерий [163–165]. Также ранее продемонстрировано, что именно секретируемые при персистенции в макрофагах белки являются доминирующими Т-клеточными антигенами, и к ним относятся белки Ag85A и Ag85B [166]. Важно и то, что данные белки обуславливают прикрепление микобактерий к фибронектину, а также то, что данные белки являются постоянными компонентами клеточной стенки, что, безусловно, делает их перспективной мишенью, в том числе для формирования также и гуморального иммунитета, создающего барьер для ухода микобактерий от иммунного ответа. Данные белки, а также белок TB10.4 высококонсервативны среди различных штаммов микобактерий, а также способны вызывать иммунный ответ, что позволяет полагать, что возможно получение кросс-реактивного иммунного ответа [167]. Важно, что указанные белки не имеют гомологии с известными белками других организмов, что обеспечивает также специфичность их действия.

Введение иммуногена, соответственно, вакцины, предпочтительно – внутримышечное. Также возможно использование для иммунизации белковым антигеном поверхности слизистой, поскольку иммунитет, индуцированный в одной области слизистой, может индуцировать развитие иммунитета на дистальной области слизистой [168]. Формирование местного иммунитета важно для предотвращения инфицирования микобактериями. Содержание в составе гибридного белка фрагментов флагеллина также способствует данному процессу, так, известно, что в респираторном тракте флагеллин индуцирует синтез IgA и вызывает Th2-ассоциированный ответ [169]. Иммунизация поверхности слизистой также значительно облегчает доставку иммуногена.

1.2.9. Элементы предлагаемых кандидатных вакцин против туберкулеза

1.2.9.1. Антигены *M. tuberculosis*

1.2.9.1.1. Белки антигенного комплекса 85

Исходя из литературных данных, иммунодоминантными антигенами МБ являются секреторные белки.

Среди белков, секретируемых *M.tuberculosis*, а также в клеточной оболочке бактерии были обнаружены белки трехкомпонентного антигенного комплекса Ag85 в составе Ag85А, Ag85В и Ag85С [170]. Данные белки обеспечивают высокую аффинность микобактерий к фибронектину, опосредующему прикрепление *M.tuberculosis* к альвеолярным макрофагам [171]. Также помогают поддерживать клеточную стенку, катализируя перенос миколовых кислот на арабиногалактан клеточной стенки и синтез альфа, альфа-трегалозо димиколата (ТДМ, фактор жгутообразования). Все они обладают мукозил-трансферазной активностью и катализируют биосинтез наиболее распространенных гликолипидов клеточной стенки, в том числе и вирулентного корд-фактора [172]. Данные белки кодируются тремя отдельными генами, присутствующими во многих штаммах микобактерий, в том числе в вакцинном штамме *M.bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guerin, Бацилла Кальметта-Герена). Антигены 85 также участвует в формировании Т-клеточного ответа у лиц, инфицированных *M.tuberculosis* [173], [174].

Другие обозначения белка Ag85a - Diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase Ag85A, DGAT, EC2.3.1.122, EC2.3.1.20, Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase, Antigen 85 complex A, 85A, Fibronectin-binding protein A, Fbps A, представлен 338 а.о. (Рис. 5).

Sequence annotation (Features)

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view
Molecule processing				
<input type="checkbox"/>	Signal peptide	1 – 43	43 Tat-type signal Potential	
<input type="checkbox"/>	Chain	44 – 338	295 Diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase Ag85A	
Regions				
<input type="checkbox"/>	Region	85 – 86	2 Substrate binding By similarity	
<input type="checkbox"/>	Region	101 – 111	11 Fibronectin-binding	
<input type="checkbox"/>	Region	275 – 278	4 Substrate binding By similarity	
<input type="checkbox"/>	Region	305 – 307	3 Substrate binding By similarity	
Sites				
<input type="checkbox"/>	Active site	169	1 Nucleophile Probable	
<input type="checkbox"/>	Active site	273	1 By similarity	
<input type="checkbox"/>	Active site	305	1 By similarity	
<input type="checkbox"/>	Binding site	169	1 Substrate By similarity	
<input type="checkbox"/>	Binding site	197	1 Substrate By similarity	
<input type="checkbox"/>	Binding site	282	1 Substrate By similarity	
Amino acid modifications				
<input type="checkbox"/>	Disulfide bond	130 ↔ 135	Ref.2 Ref.13	
Experimental info				
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	169	1 S → A: Abolishes diacylglycerol acyltransferase activity. Ref.12	
Secondary structure				

Рисунок 5 - Структура белка Ag85a

FbpA опосредует формирование триацилглицерола (TAG) с длинной цепью ацил-КоА, выступая в качестве донора ацильной группы, а 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol (1,2-дипальмитин)

выступает в качестве акцептора ацильной группы. Имеет предпочтение к C26:0-CoA над C18:1-CoA.

Другие обозначения белка Ag85b - Diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase Ag85B, DGAT, EC2.3.1.122, EC2.3.1.20, 30 kDa extracellular protein, Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase, Antigen 85 complex B, 85B, Extracellular alpha-antigen, Fibronectin-binding protein B, Fbps B, представлен 325 а.о. (Рис. 6).

Sequence annotation (Features)

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view
Molecule processing				
<input type="checkbox"/>	Signal peptide	1 – 40	40 Potential	
<input type="checkbox"/>	Chain	41 – 325	285 Diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase Ag85B	
Regions				
<input type="checkbox"/>	Region	82 – 83	2 Substrate binding	
<input checked="" type="checkbox"/>	Region	98 – 108	11 Fibronectin-binding By similarity	
<input type="checkbox"/>	Region	272 – 275	4 Substrate binding	
<input type="checkbox"/>	Region	302 – 304	3 Substrate binding	
Sites				
<input type="checkbox"/>	Active site	166	1 Nucleophile Probable	
<input type="checkbox"/>	Active site	270	1 Probable	
<input type="checkbox"/>	Active site	302	1 Probable	
<input type="checkbox"/>	Binding site	166	1 Substrate	
<input type="checkbox"/>	Binding site	194	1 Substrate	
<input type="checkbox"/>	Binding site	279	1 Substrate	
Amino acid modifications				
<input type="checkbox"/>	Disulfide bond	127 ↔ 132	Ref.11	
Secondary structure				

Рисунок 6 - Структура белка Ag85b

Молекулярная масса белка Ag85B - 36,7 кДа [175]. Показано, что рекомбинантный антиген Ag85B обладает протективным потенциалом, в связи с чем его используют для создания кандидатных вакцин против туберкулеза [176].

1.2.9.1.2. Секреторный белок TB10.4

Низкомолекулярный секретируемый белок TB10.4 (рисунок 7, 8) относится к семейству ESAT-6 (esx). Белки данного семейства высокоиммуногенны и специфичны для микобактерий [177]. Другие обозначения белка TB10.4 - ESAT-6-like protein EsxH, 10 kDa antigen CFP7, CFP-7, Low molecular weight protein antigen 7,

Sequence annotation (Features)

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view
Molecule processing				
<input type="checkbox"/> Initiator methionine	1	1	Removed	
<input checked="" type="checkbox"/> Chain	2 – 96	95	ESAT-6-like protein EsxH	
Secondary structure				

Рисунок 7 - Структура белка TB10.4

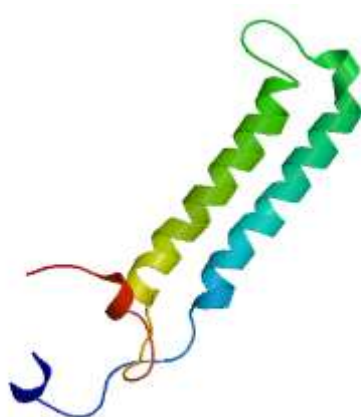


Рисунок 8 - Модель пространственной структуры белка TB10.4 *M.tuberculosis*
(<http://swissmodel.expasy.org/>)

Изучены иммуногенные свойства данного белка в сравнении с другими белками *M.tuberculosis*. По уровню синтеза γ -интерферона (ИФН- γ) мононуклеарными клетками периферийной крови доноров в ответ на их контакт с соответствующими антигенами белок ТВ10.4 демонстрирует высокую иммуногенность [178].

Белок ТВ10.4 - продукт гена *Rv0288* – был впервые выделен из низкомолекулярной фракции культурального фильтрата *M.tuberculosis* [179]. Белок распознается на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствует пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию (ИФН- γ) - основного фактора протективного иммунитета. Ген *tb10.4* также представлен в геноме вакцинного штамма BCG [180].

Известно, что белок ТВ10.4 также обладает адьювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий. Учитывая эти свойства, белок ТВ10.4 перспективен для разработки новых противотуберкулезных вакцин [181].

1.2.9.2. Плазмидная ДНК для доставки иммуногена в организм человека

Показано, что в норме мышечные волокна не экспрессируют антигены МНС, однако при воспалении или в присутствии интерферона гамма мышечные волокна способны продуцировать антигены в составе комплекса с МНС первого класса, либо второго класса [159,182–184]. Исследователям не удалось найти доказательства патологических изменений после повторных инъекций ДНК у мышей или кроликов [185]. В 2007 году в руководстве FDA США по ДНК-вакцинам пришли к выводу, что доклинические исследования не требуются для оценки эффекта в отношении аутоиммунных заболеваний.

Плазмидная ДНК должна содержать существенные для организмов ее поддержания и использования элементы, вкуче с соответствующими регуляторными последовательностями. Регуляторные последовательности – нуклеотидные последовательности, способные повлиять на экспрессию гена на уровне транскрипции и/или трансляции, а также на механизмы, обеспечивающие существование и поддержание функционирования плазмидной ДНК.

Существенными для прокариотической системы являются ориджин репликации и репортерный ген. Бактериальные элементы плазмидной ДНК не должны отрицательно влиять на экспрессию в клетках млекопитающих и обуславливать побочный эффект от применения плазмидной ДНК. В литературе имеются данные о том, что использование гена устойчивости к ампициллину в качестве репортерного гена может быть нежелательным в связи с развитием

реакции у пациентов на ампициллин, однако такие последствия скорее связаны с низким качеством очистки плазмидной ДНК, но не самим элементом.

Существенными элементами плазмид для использования у млекопитающих являются промотор, лидерная последовательность мРНК, терминирующая последовательность.

Промотор является важным компонентом плазмиды, который запускает экспрессию целевого гена. Классические промоторы для плазмидных ДНК-компонентов препаратов - это CMV (цитомегаловирусный) человека/ немедленно-ранний или CMV-chicken- β actin (CAGG) промотор. Промоторы CMV используются в большинстве ДНК-вакцин, так как они опосредуют высокие уровни конститутивной экспрессии в широком диапазоне тканей млекопитающих [186] и не подавляют прочитывание по ходу транскрипции (downstream).

Лидерная последовательность мРНК также играет большую роль. Последовательность Козак непосредственно перед старт-кодоном, а также использование видоспецифичных кодонов также позволяет увеличить уровень экспрессии гена [187], [188].

На экспрессию генов можно повлиять путем изменения терминирующей последовательности, которая необходима для сохранения стабильности мРНК, надлежащего прекращения транскрипции и экспорта мРНК из ядра, в том числе ее укорачиванием. Во многих современных ДНК-вакцинах используют последовательность терминатора транскрипции бычьего гормона роста [189]. Полиаденилирование (полиА) необходимо для стабилизации транскрипта. Изменение последовательности полиА может привести к увеличению уровня экспрессии гена [190].

Оптимальная конструкция плазмиды для осуществления назначения должна объединять «бактериальные» и «эукариотические» элементы, с соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить высокую копияность в процессе производства и высокий уровень экспрессии у млекопитающих [191].

Для создания вакцинного кандидата на основе плазмидной ДНК можно использовать плазмидную ДНК, как минимум, стандартно применяющуюся для доставки генов и их экспрессии в организме млекопитающего, в том числе человека, а также оптимизированную по вышеперечисленным параметрам, в том числе подробно описанным в статье Williams et al., 2009 [191]. В руководстве FDA (2007) заявлено, что исследования биораспределения вещества после его введения в организм могут быть отменены для ДНК-вакцин, производимых клонированием нового гена в плазмидный вектор, в отношении которого ранее документально установлены приемлемые биораспределение и профиль интеграции. В руководстве ВОЗ (2007) заявлено, что исследования биологического распределения и сохранения требуются, если еще не имеется значительный опыт работы с почти идентичным или аналогичным продуктом. В руководстве ЕМЕА (2006) заявлено, что опыт работы с векторной системой позволит оптимизировать и

сфокусироваться на доклинических исследованиях. Исследования по безопасности с использованием ДНК-векторов с различными клонированными генами продемонстрировали аналогичное биораспределение [192] и токсикологию [193].

Для ДНК, предназначенной для использования человеком, конечный продукт ДНК целесообразно вводить в фармацевтически приемлемом носителе или буферном растворе. Фармацевтически приемлемые носители или буферные растворы известны из уровня техники и включают те, которые описаны в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences.

1.2.9.3. Адъювант

1.2.9.3.1. Флагеллин

Флагеллин – белок бактериальных жгутиков, присутствующих у многих бактерий, в том числе патогенных. Флагеллин - лиганд TLR5 (Toll-like receptor 5). Взаимодействие флагеллина с TLR-5 стимулирует созревание макрофагов и дендритных клеток – антиген-презентирующих клеток, что приводит к выработке иммунного ответа [194,195]. Флагеллины индуцируют формирование сывороточных и секреторных антител, Th1- и Th2- ответ как на сами флагеллины, так и на совместно введенные антигены.

Флагеллин, в зависимости от происхождения из того или иного микроорганизма, различается и состоит из 259–1250 аминокислотных остатков, что, безусловно, влияет на его свойства.

Различия в структуре флагеллина наблюдаются и среди одного бактериального вида. Так, большая часть сероваров *Salmonella enterica* двухфазные, т.е. у них чередуется экспрессия разных жгутиковых антигенов (фаз). Это обусловлено возможностью нахождения в активном состоянии только 1 из 2 генов флагеллина (fliC и fljB), локализующихся в разных локусах хромосомы [196], FliC – phase 1 flagellin (STF), fljB – phase 2 flagellin (STF2). Данные флагеллины имеют одинаковый N-конец, гомологичный, различающийся на несколько а.о., С-конец, а также различный домен D3, соответственно, имеют различную структуру и могут иметь различные эффекты.

Таким образом, в зависимости от того, флагеллин какого микроорганизма используется, а также типа используемого флагеллина (например, для *Salmonella*), эффект будет различаться.

Связывание флагеллина с TLR-5 происходит только в мономерной форме [197]

1.2.9.3.2. CRM197

Дифтерийный токсин (DTx, 58 кДа) является белковым токсином, который вызывает одноименное заболевание. Проникая в клетки, дифтерийный токсин приводит к нарушению синтеза белка и гибели клеток за счет ферментативной активности [198]. В начале 1970х годов были выделены нетоксичные или малотоксичные «кросс-реактивные» формы дифтерийного токсина – cross-reacting materials – CRMs. CRM30 и CRM45 утратили некоторые структурные элементы и имеют меньшую молекулярную массу, по сравнению с дифтерийным токсином, они сохранили ферментативную активность *in vitro*, но утратили связывающую способность и способность к проникновению внутрь клетки, чем и обуславливается потеря ими токсичности. CRM176, CRM228 имеют ту же молекулярную массу, что и дифтерийный токсин дикого типа, но утратили и ферментативную активность, и связывающую. Белок CRM197 утратил ферментативную активность, но не потерял связывающую, он является наиболее подходящим для использования в составе вакцин и терапевтических препаратов.

Белок CRM197 является производным дифтерийного токсина, отличающимся одной мутацией, а именно заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52, что элиминирует его токсичность [199]. Белок состоит из 535 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 58,4 кДа и рI 5,8. Как и дифтерийный токсин дикого типа, CRM197 содержит два домена: фрагмент А (каталитический) и фрагмент В, соединенные дисульфидным мостиком. Фрагмент В содержит субдомены, один из них связывает клеточный рецептор HB-EGF (гепарин-связывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста), другой участвует в процессе проникновения внутрь клетки. Ген, кодирующий CRM197, принадлежит мутантному фагу β 197tox-. CRM197, являясь нетоксичным, тем не менее, сохраняет те же иммуностимулирующие свойства, что и дифтерийный токсин, в результате чего CRM197 широко используется в качестве безопасного носителя в конъюгированных вакцинах.

CRM197 используется как белок-носитель во многих конъюгированных вакцинах, таких как пневмококковые (PrevenarTM) [200], [201], менингококковые (Menveo®, Menjugatec®, Meningitec®) [202], а также против гемофильной палочки *H.influenza B* (HibTITER®, Vaxm-Hib®) [203]. В настоящее время помимо оценки эффективности уже применяющихся препаратов, в состав которых входит CRM197, активно идет разработка новых поли- и олигосахаридных вакцин против различных бактериальных инфекций, с CRM197 в своем составе [204].

Белок-носитель ковалентно связывается с компонентами вакцины, в результате чего получают высокоиммуногенные антигены, вызывающие активацию Т-клеточного ответа [205]. Экспериментальные исследования показали, что при использовании в качестве белка-носителя

CRM197 наблюдается повышение уровня IgG на целевой антиген. Также происходит увеличение синтеза таких цитокинов, как ИЛ-4 и ИЛ-5, которые являются маркерами Т-хелперов 2 типа [206]. Таким образом, он позволяет усилить формирование специфического иммунного ответа на вводимый совместно с ним иммуноген. В экспериментах на модели мышинного рака толстой кишки данный белок демонстрировал сильную адъювантную активность [207].

Соответственно белок CRM197 является сильным и эффективным адъювантом, который может быть использован в разработке вакцин, за счет усиления ответа Т-хелперов 1 и 2 типа.

1.2.9.3.3. ИЛ-7

ИЛ-7 представляет собой короткоцепочечный гликозилированный цитокин с молекулярной массой 25 кДа. ИЛ-7 секретируется, в основном, негемопоезическими клетками, такими как клетки тимуса и эпителия кишечника, кератиноциты, ретикулярные клетки и стромальные клетки костного мозга. Рецептор ИЛ-7 - это гетеродимер, состоящий из α -цепи рецептора ИЛ-7 (ИЛ-7R α , или CD127) и γ -цепи рецептора ИЛ-2 (ИЛ-2R γ , γ -цепь, или CD132). Рецептор ИЛ-7 экспрессируется различными клетками иммунной системы, в том числе незрелыми В-клетками, ранними предшественниками тимоцитов и более зрелых Т-лимфоцитов. ИЛ-7 играет важную роль в дифференцировке Т-клеток, В-клеток, естественных киллеров и дендритных клеток. Кроме того, ИЛ-7 имеет важное значение для клеточной пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток. Однако роль ИЛ-7 в дифференцировке фолликулярных Т-хелперов и индукции гуморального иммунитета остается неясной [208].

Биологическая активность ИЛ-7 человека главным образом связана с его действием как ростового фактора для предшественников Т-лимфоцитов. Это дополняется также и тем, что ИЛ-7 усиливает формирование цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров. Ключевая роль ИЛ-7 в регуляции иммунитета подтверждена открытием у человека одного из вариантов тяжелого комбинированного иммунодефицита, обусловленного мутацией в гене α -цепи рецептора ИЛ-7, приводящей к выключению его биологического действия [209].

В связи с этим ИЛ-7 потенциально может быть использован для коррекция лимфопении различного происхождения, для лечения иммунодефицитных состояний, при терапии инфекционных заболеваний, для коррекции Т-клеточного иммунодефицита при СПИДе или как адъювант для вакцинации, в том числе в случае использования противоопухолевых вакцин [210].

Было показано, что ИЛ-7 и другие цитокины обладают терапевтическим эффектом при введении их зараженным туберкулезом мышам, в качестве терапевтического агента через три

недели после заражения. При этом при введении цитокинов непосредственно в момент заражения какой-либо положительный эффект не наблюдался [211].

1.2.9.3.4. Гидроксид алюминия

Адсорбция антигена рассматривается как важный шаг в разработке вакцины. Показано, что антигены, адсорбированные на адьювантах на основе алюминия, приводят к формированию более сильного иммунного ответа, по сравнению с растворимыми антигенами [17].

Существуют предположения о механизмах действия данных адьювантов. Так, улучшается процесс захвата антигена антиген-презентирующими клетками в месте введения [212], а также секреция про-воспалительного агента макрофагами [213,214].

Несмотря на то, что механизмы остаются до конца не понятыми, более сильная иммуностимуляция адсорбированными антигенами объяснялась удерживанием в течение продолжительного времени адьюванта на основе алюминия и адсорбированных антигенов в месте инъекции. Данный процесс, в сочетании с большим вовлечением клеток иммунной системы из-за воспалительной реакции, индуцированной адьювантами, как полагают, оказывают положительное влияние на эффективность вакцины [215]. Кроме того, Джонс и соавт. [17] показали, что конформационные изменения белков при адсорбции на адьюванте солей алюминия приводят к более высокой иммуногенности вакцины.

В настоящее время суспензии на основе алюминия наиболее распространены в качестве адьювантов в вакцинах для использования у человека. Коммерчески используемые алюминий-содержащие адьюванты в составе вакцины изготавливают путем осаждения солей алюминия в контролируемой щелочной среде [215].

Один из основных механизмов адсорбции белковых антигенов на адьюванте на основе алюминия - электростатическое взаимодействие [216,217]. Второй важной движущей силой адсорбции антигена на адьюванте считается лигандный обмен между фосфатными группами антигена и гидроксильными группами адьюванта [218,219]. Показано, что сила взаимодействия между адьювантом и антигеном, адсорбированным за счет лигандного обмена, больше, чем за счет электростатического взаимодействия [220].

NaCl часто используется в вакцинах (1) для оптимизации адсорбции антигена и (2) для регулировки I вакцины перед введением. Однако было показано, что высокие концентрации NaCl (3 M) при производстве адьюванта гидроксида алюминия способствует формированию кристаллической структуры оксигидроксида алюминия [221]. Поскольку формирование

кристаллических зон адьюванта гидроксида алюминия изменяет его структуру, эффективность вакцины может быть изменена после регулировки I.

Показано, что в присутствии NaCl при концентрации, близкой к изотоничности тела, усиливается агрегация адьювантов гидроксида алюминия. Следует учитывать это воздействие на структуру адьюванта при изучении механизмов адсорбции белковых антигенов на адьювантах на основе алюминия, и в процессе разработки вакцины [220]. Также следует учитывать, что при формировании агломератов из такого адьюванта, размером примерно с бактерию, при введении адьюванта в низкой дозировке, возможен их захват моноцитами и, возможно, перенос в другие ткани и накопление в мозгу, что несет риски [222]. Этот вопрос требует отдельного исследования.

Традиционная гидроокись алюминия является безопасной и применяется во множестве вакцин, в том числе вакцинных кандидатов против туберкулеза, но она стимулирует иммунный ответ в сторону Th2-типа, то есть стимуляции В-клеток. Однако в настоящее время появляются новые формы данного адьюванта, например, наночастицы, для которых продемонстрирована также стимуляция Th1-ответа [223].

1.2.9.4. Нормативная документация по исследуемым объектам

Создание и испытание препаратов для лечения человека требует тщательного соблюдения международных стандартов по безопасности ICH (International Conference on Harmonisation), а также норм российского законодательства. Регулирующие стандарты для биотехнологических препаратов сходны для Европейского Союза, Японии и США. Принят гибкий, от случая к случаю, научный подход, к доклиническим испытаниям безопасности.

Поскольку в настоящем исследовании показана эффективность разработанных вакцинных кандидатов, далее будут проведены доклинические исследования, согласно нормам национального и международного права. В России на данный момент регулирующими документами являются Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (ред. от 03.07.2016), Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», Федеральный закон от 13.07.2015 № 241-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств" и Федеральный закон "О внесении изменений в Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств"», Постановление Правительства РФ от 17.12.2013 № 1172 «О признании и об оценке соответствия испытательных лабораторий (центров) принципам надлежащей лабораторной практики, соответствующим принципам надлежащей лабораторной

практики Организации экономического сотрудничества и развития», ГОСТ Р 53434-2009 Национальный стандарт Российской Федерации. Принципы надлежащей лабораторной практики (утв. и введен в действие Приказом Ростехрегулирования от 02.12.2009 N 544-ст) [224], а также Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. Миронова А.Н., Бунатян Н.Д. и др. .

Исследуемые в настоящей работе кандидатные вакцины против туберкулеза – на основе генетических и белковых молекул, которые относятся к биотехнологической продукции, для такого класса веществ разработан ряд международных норм в отношении оценки их качества (Quality of Biotechnological Products Q5B - Q5E) [225] и безопасности (PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1) [226], OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) протоколы по тестированию химических веществ в токсикологических исследованиях. Также обсуждается введение документа по исследованию распространения и передачи генетического материала при использовании векторов у человека [227].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Рекомбинантные плазмидные ДНК

2.1.1. Плазмидная ДНК pET-28a(+)

В настоящей работе использовалась ковалентно замкнутая кольцевая ДНК (кзк ДНК) pET-28a(+), схема которой приведена на рисунке 9. Данная плазмидная ДНК предназначена для экспрессии целевого гена в клетках *E.coli* и содержит промотор и терминатор бактериофага T7 для контролируемой экспрессии целевого гена, сайт связывания с рибосомальным комплексом, старт-кодон для трансляции, множественный сайт клонирования, ген, кодирующий лактозный репрессор, для обеспечения работы lac-оперона, ориджин репликации, ген устойчивости к канамицину, ориджин фага f1 для синтеза одноцепочечной ДНК. Данная плазмидная ДНК также содержит полигистидин - кодирующий фрагмент, находящийся в рамке трансляции целевого гена, на его N-, либо C-конце, для экспрессии целевого гена в виде белка, слитого с полигистидином, для удобства его дальнейшей очистки с использованием иммобилизованной металлоаффинной хроматографии (ИМАХ).

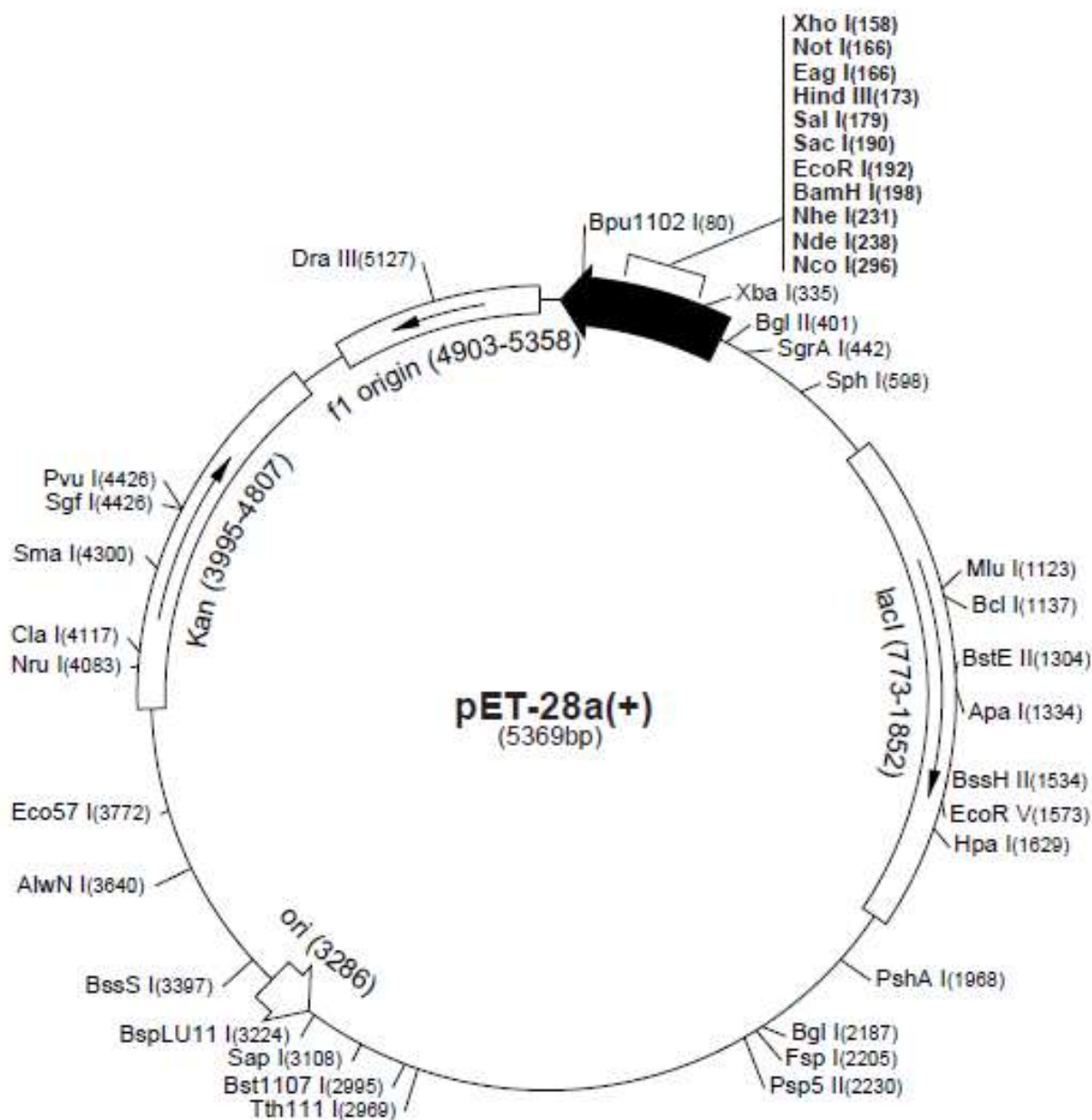


Рисунок 9 - Схема кзк ДНК рЕТ-28а(+)

2.1.2. Плазмидная ДНК рсDNA3.1(+)

Плазмидную ДНК, как и антиген - рекомбинантный белок, экономически наиболее выгодно набирать в прокариотических клетках, преимущественно бактериальных клетках. В связи с этим созданная для исследования плазмидная ДНК содержит элементы для поддержания и амплификации, преимущественно в больших количествах, в клетках бактерий, - «бактериальные». Плазмидная ДНК, используемая для настоящего исследования, содержит

также элементы для эффективного функционирования в клетках млекопитающих - для стабильной транзientной экспрессии целевого гена в клетках млекопитающих на высоком уровне, - «эукариотические».

В настоящей работе использована ковалентно замкнутая кольцевая ДНК (кзк ДНК) pcDNA3.1(+), схема которой приведена на рисунке 10.

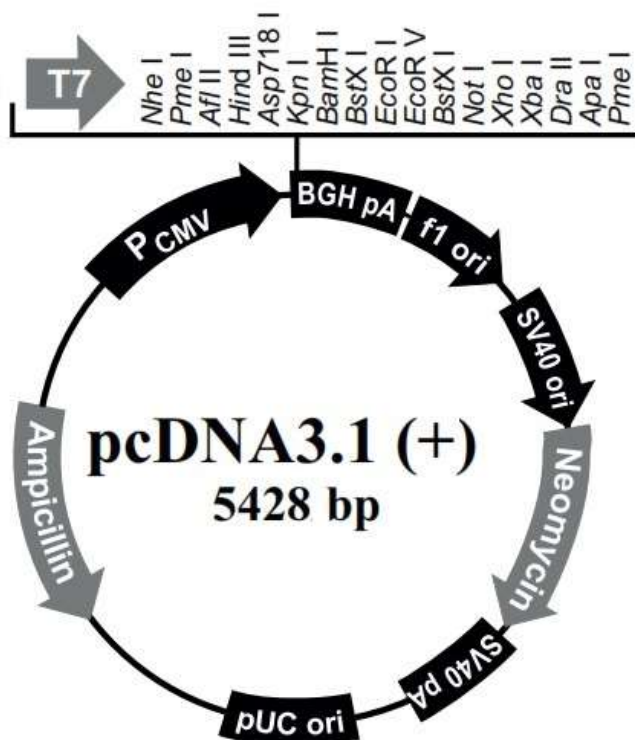


Рисунок 10 - Схема кзк ДНК pcDNA3.1(+)

«Бактериальными» существенными элементами являются бактериальные ориджин репликации, для поддержания в клетке с высокой копийностью, и репортерный ген для возможности селекции штамма-продуцента. Подходящий ориджин репликации представлен pUC - для высококопийной репликации и роста в клетках *E. coli*. Подходящий репортерный ген представлен геном устойчивости к антибиотику, ампициллину. Также содержится ориджин фага f1 для синтеза одноцепочечной ДНК.

«Эукариотическими» существенными элементами являются следующие. Это промотор с соответствующими регуляторными последовательностями из природных промоторов со своими регуляторными элементами - предранний цитомегаловирусный (CMV) промотор для получения необходимого характера экспрессии (соотношения продолжительности и уровня экспрессии) целевого гена на уровне транскрипции - для экспрессии целевого гена в клетках млекопитающих на высоком уровне [228–230]. Регуляторная последовательность по отношению к промотору - 5' нетранслируемая область до промотора. Это промотор бактериофага T7 для транскрипции *in vitro* и секвенирования целевого гена за счет сайтов для посадки праймеров для его секвенирования.

Это множественный сайт клонирования - сайты для клонирования целевого гена, для осуществления правильной ориентации целевого гена в плазмидной ДНК. Это терминирующая последовательность, содержащая последовательно стоп-кодон, 3' нетранслируемую область с сигналом полиаденилирования, стоп-кодон, за счет которой сохраняется стабильность мРНК, и осуществляется надлежащее прекращение транскрипции и экспорт мРНК из ядра, - сайт полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH) для эффективной терминации транскрипции и полиаденилирования матричной РНК (мРНК) [231]. Это сайт связывания с рибосомальным комплексом.

2.2. Бактериальные штаммы

Для проведения генно-инженерных работ использовались клетки *E.coli* DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M 15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara,leu)769 galU galK λ - rpsL nupG. Данный штамм *E.coli* широко применяется в лабораторной практике как специализированный реципиент для амплификации плазмидной ДНК с клонированным геном интереса. В данном штамме полностью выключена система рестрикции (отсутствует эндонуклеаза A – мутация *endA*), также присутствует мутация *recA*, нарушающая процесс гомологичной рекомбинации у *E.coli*, что позволяет использовать данный штамм и для сохранения плазмидной ДНК. Используются электрокомпетентные клетки данного штамма. Данный штамм не является токсигенным или патогенным и не представляет опасности для человека и окружающей среды.

Для экспрессии рекомбинантного гена использовались клетки *E.coli* BL21 Star (DE3), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) (int::lacI->PlacUV5-T7 genel). Данный штамм *E.coli* широко применяется в лабораторной практике как специализированный реципиент для обеспечения индуцибельной экспрессии генов, транскрибирующихся под контролем промоторов, узнаваемых РНК-полимеразой бактериофага T7. Данный штамм не является токсигенным или патогенным и не представляет опасности для человека и окружающей среды.

Он содержит лизоген DE3, несущий ген, кодирующий полимеразу фага T7 под контролем индуцибельного промотора lacUV5, необходимую для экспрессии гена, клонированного в плазмиде pET28a(+). Кроме этого, данные клетки дефектны по протеазам lon и OmpT. Отсутствие данных протеаз обуславливает уменьшение деградации гетерологичных белков. Также этот штамм несет мутированный ген *rne*, кодирующий усеченный вариант РНКазы E, что

обуславливает увеличение стабильности мРНК в клетке, вследствие уменьшения ее ферментативной деградации [232], [233].

Для моделирования лекарственно устойчивого туберкулеза использовалась культура клинического изолята *M. tuberculosis* № 9660 с множественной лекарственной устойчивостью к 5 противотуберкулезным препаратам из коллекции ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, выделенный в лаборатории микробиологии от больного с впервые выявленным туберкулезом легких. Спектр лекарственной устойчивости штамма: изониазид – 1 мкг/мл; рифампицин – 40 мкг/мл; этамбутол – 2 мкг/мл; стрептомицин – 10 и 50 мкг/мл; канамицин – 30 мкг/мл.

Для моделирования лекарственно чувствительного туберкулеза использовалась культура чувствительного к существующим противотуберкулезным препаратам стандартного тест-штамма *M. tuberculosis Erdman*, полученного из «НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича».

2.3. Лабораторные животные

Исследования кандидатных иммуногенов проводились на самках белых мышей неинбредных линий, весом 18-20 г, возраст 6-8 недель (Питомник лабораторных животных «Рапполово»), а также самках мышей линии BALB/c, весом 18-20 г, возраст 9-12 недель (Питомник лабораторных животных «Рапполово»).

Прибывшие животные до начала исследования помещались в отдельную комнату на период адаптации (14 дней). Во время этого периода проводился ежедневный осмотр каждого животного: контролировалось проявление отклонений в состоянии здоровья (поведение, общее состояние), дважды в день животные наблюдались в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования необходимое количество животных было распределено по группам с помощью метода рандомизации с использованием в качестве основного критерия массы тела, таким образом, чтобы индивидуальное значение массы тела входило в диапазон вариации $\pm 10\%$ для мышей от среднего значения показателя в группе. Средняя масса тела животных статистически не отличалась между группами. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

Клетки с животными были помещены в отдельные комнаты. Животные содержались в стандартных условиях, при температуре окружающей среды $+(19-25)^{\circ}\text{C}$, относительной влажности — 50–70%, при 12-часовом световом дне, животные получали сухой стандартизованный корм и воду без ограничения. При изменении погодных условий

контролировался воздухообмен в помещении с помощью анемометра и путем измерения содержания в воздухе углекислого газа и аммиака. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO₂ не более 0,15 объемных %, аммиака — не более 0,001 мг/л.

В течение исследования каждое животное осматривалось ежедневно. Осмотр включал в себя оценку общего поведения и общего состояния животных. При введении препарата осмотр проводился примерно через 1 час после введения. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) [234].

2.4. Препарат вакцины сравнения

В качестве препарата сравнения использовалась коммерческая вакцина для профилактики туберкулеза БЦЖ, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения, производства Филиал "Медгамал" ФНИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи (Россия). 1 доза содержит активное вещество: живые микобактерии вакцинного штамма БЦЖ-1 0,025 мг микробных клеток БЦЖ; вспомогательные вещества: натрия глутамата моногидрат (стабилизатор) — не более 0,15 мг. 1 доза составляет 0,1 мл разведенной суспензии; препарат не содержит консервантов и антибиотиков; выпускается в комплекте с растворителем — натрия хлорида раствором для инъекций 0,9%.

Также в качестве дополнительного контроля использовалась коммерческая вакцина БЦЖ Имурон-вак (Imuron-vac) для иммунотерапии рака мочевого пузыря, лиофилизат для приготовления суспензии для внутривезикулярного введения, производства Филиал "Медгамал" ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи (Россия). 1 ампула содержит активное вещество: живые микобактерии вакцинного штамма БЦЖ-1, лиофилизированные в 1,5% растворе глутамата натрия, 25 мг микробных клеток БЦЖ; вспомогательные вещества: натрия глутамата моногидрат (стабилизатор) — (14,3±0,20) мг. 1 доза составляет 0,1 мл разведенной суспензии; препарат не содержит консервантов и антибиотиков.

2.5. Реакции ферментативной модификации ДНК

2.5.1. Синтез и амплификация последовательностей генов

Синтез рассчитанных последовательностей генов осуществлялся химически в ООО «АТГ Сервис Ген».

Для амплификации полученных последовательностей генов *FlicAg85bTb10*, *ag85a*, *ag85b* использовались праймеры, представленные в таблице 1.

Таблица 1 - Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации последовательностей генов *FlicAg85bTb10*, *ag85a*, *ag85b*

№	Название праймера	5'→3' нуклеотидная последовательность	Кол-во п.о.	Tm, °C
1.	<i>FlicAg85bTb10</i> - For	CATATGGCTCAGGTTATCAAC	21	53,3
2.	<i>FlicAg85bTb10</i> - Rev	CTCGAGTTAACCACCCCA	18	55,3
3.	<i>Kozak</i> - For	GCTAGCGCCACCATGGAC	18	61,2
4.	<i>ag85a</i> - Rev	AAGCTTTTAGGCGCCCTG	18	59
5.	<i>ag85b</i> - Rev	AAGCTTTTAGCCGGCGCC	18	63,4

Амплификация последовательности гена проводилась методом ПЦР [235], в объеме 50 мкл, в тонкостенных полипропиленовых пробирках объемом 650 мкл, содержащих 5 мкл 10-кратного буфера *Taq* (700 мМ Трис-НСl, рН 8,6/ 25°C, 166 мМ (NH₄)₂SO₄), 5 мкл MgCl₂ (1,25 мМ), 1 мкл дНТФ, 31,5 мкл воды, 1 мкл прямого и 1 мкл обратного праймеров, соответствующих амплифицируемому гену, таблица 1, 5 мкл ДНК (ген) и 0,5 мкл полимеразы *Taq* (Fermentas, Литва). Для амплификации гена *FlicAg85bTb10* использовались праймеры 1 и 2, гена *ag85a* – 3 и 4, гена *ag85b* – 3 и 5, все праймеры – из таблицы 2.

Реакционная смесь прогревалась 5 мин. при 95°C для денатурации ДНК. Для предотвращения испарения на реакционную смесь объемом 50 мкл наслаивались 30 мкл минерального масла Bayol F (Sigma, США). Реакция амплификации проводилась в термоциклере C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующих условиях:

Для амплификации гена *FlicAg85bTb10* проводились 35 циклов:

95°C – 20 сек.	} 35 циклов
54°C – 20 сек.	
72°C – 1 мин.	

Для амплификации гена *ag85a* проводились 35 циклов:

$95^{\circ}\text{C} - 20 \text{ сек.}$
 $60^{\circ}\text{C} - 20 \text{ сек.}$
 $72^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин.}$
} 35 циклов

Для амплификации гена *ag85b* проводились 35 циклов:

$95^{\circ}\text{C} - 20 \text{ сек.}$
 $62^{\circ}\text{C} - 20 \text{ сек.}$
 $72^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин.}$
} 35 циклов

Для достраивания образовавшихся цепей ДНК проводился дополнительный цикл: 5 мин. при 72°C .

При использовании указанных в таблице 1 праймеров величина амплифицированного гена *FlicAg85bTb10* должна составлять 1650 п.о., гена *ag85a* – 1101 п.о., *ag85b* – 1062 п.о..

Полученные амплификаты хранились при -20°C . Результат ПЦР анализировался электрофорезом в агарозном геле по п. 2.7.3.

2.5.2. Реакция гидролиза ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции

Гидролиз ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции ДНК проводился для линейаризации донорной плазмидной ДНК и подготовки для дальнейшего лигирования с геном, гена для подготовки к лигированию с плазмидной ДНК, а также для анализа плазмид с фрагментом клонированной ДНК, полученных из рекомбинантных клонов.

Реакция рестрикции проводилась в 70 мкл раствора, содержащего 100 мкг ДНК и по 6 ед. ферментов серии FastDigest (ThermoScientific, США) - NdeI и XhoI, либо NheI и HindIII. Реакция проводилась в соответствующем буфере FastDigest в течение 15 минут при 37°C . Инактивировалась реакция прогреванием до 65°C в течение 5 минут.

Результаты анализировались с помощью электрофореза в агарозном геле по п. 2.7.3. В случае получения фрагментов ДНК для дальнейшего лигирования фрагменты очищались с использованием препаративного электрофореза по п. 2.7.4.

2.5.3. Реакция лигирования фрагментов плазмидной ДНК

Осуществлялась реакция лигирования очищенных рестрицированных ПЦР-продуктов в очищенный рестрицированный вектор pET-28a(+) (Invitrogen, США), для гена *FlicAg85bTb10*, и pсDNA3.1(+) (Invitrogen, США), для генов *ag85a* и *ag85b*. Реакционная смесь содержала 2 мкл очищенного рестрицированного ПЦР-продукта, 3,5 мкл 10X буфера для лигазы (1X буфер содержит 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5 при 37°C), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 0,1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА)) (Thermo Fisher Scientific Inc.), 3,5 мкл 50% полиэтиленгликоля 4000, 1 мкл рестрицированного вектора, 5 мкл T4 лигазы (Thermo Fisher Scientific Inc.). Реакционная смесь доводилась до 35 мкл безнуклеазной водой и инкубировалась при 22°C в течение 4 часов. Ферментативная реакция останавливалась инкубацией реакционной смеси при 65°C в течение 15 минут.

2.6. Микробиологические методы

2.6.1. Приготовление компетентных клеток *E.coli* для трансформации

Для подготовки компетентных клеток *E.coli* штаммов DH10B/R и BL21 Star (DE3) к последующей трансформации методом электропорации бралась отдельная колония, выращенная на LB-агаре (Gibco BRL, США), и помещалась в 5 мл LB-среды (Gibco BRL, США). Клетки росли в течение 16 ч при 37°C и постоянном перемешивании (250 об./мин.). Два миллилитра полученной ночной культуры помещались в 200 мл LB-среды. Клетки росли при 37°C при постоянном перемешивании (250 об./мин.) до ОП₆₀₀=0,6, после чего осаждались центрифугированием в течение 10 мин. при 4000g, +4°C. Клетки отмывались в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедура отмывки повторялась трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировался в малом объеме деионизованной воды и центрифугировался 30 сек. при 5000 об./мин. на микроцентрифуге. К осадку клеток добавлялись 3 объема (от объема клеточного осадка) 15% раствора глицерина, осадок ресуспендировался. Готовые к трансформации клетки хранились при -70°C.

2.6.2. Трансформация клеток *E.coli*

Трансформация полученных компетентных клеток осуществлялась методом электропорации. Использовались электропоратор Eporator (Eppendorf, Германия) и стерильные кюветы для электропорации (Eppendorf, Германия), объемом 100 мкл, щель 1 мм.

К 12 мкл компетентных клеток добавлялся 1 мкл десятикратно разведенной лигазной смеси или раствора плазмиды в воде, осуществлялись перемешивание и перенос в кювету, которая помещалась в электропоратор. Трансформация проводилась при электрическом импульсе напряженностью 1,7 кВ длительностью 5 мсек [236].

После трансформации клетки помещались в 1 мл SOC-среды (2% бактотриптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄; 20 mM глюкоза) и инкубировались в течение 40 минут при 37°C, после чего вмазывались в LB-агар с антибиотиком на чашке Петри и инкубировались 16 ч при 37°C.

2.6.3. Скрининг клонов *E.coli* на наличие искомой плазмидной ДНК

Колонии клеток *E.coli*, выросшие на чашке Петри с селективной средой после трансформации, анализировались на наличие искомой плазмидной ДНК. Для этого выделялась плазмидная ДНК согласно методике, описанной в п. 2.7.5, и анализировалась электрофорезом в агарозном геле согласно методике, описанной в п. 2.7.3.

Анализировалось наличие фрагмента клонированной ДНК в выделенной плазмиде с использованием реакции ПЦР. Реакция проводилась согласно методике, описанной в п. 2.5.1..

Анализировалось количество копий фрагмента клонированной ДНК и его локализация в векторе с использованием рестрикционного анализа, описанного в п. 2.5.2.. Использовались эндонуклеазы рестрикции, по сайтам действия которых были клонированы гены.

Результаты ПЦР и рестрикции анализировались электрофорезом в агарозном геле согласно методике, описанной в п. 2.7.3..

Для быстрого скрининга рекомбинантных клонов *E.coli* на наличие плазмид pET-28a(+)*FlicAg85bTb10*, либо pсDNA3.1(+)*ag85a*, либо pсDNA3.1(+)*ag85b* использовался метод ПЦР. Реакция проводилась согласно методике, описанной в п. 2.5.1.. В качестве матрицы брался материал одной отдельной колонии, размером около 1 мм. Результат ПЦР анализировался электрофорезом в агарозном геле согласно методике, описанной в п. 2.7.3..

2.6.4. Индукция экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок FlicAg85bTb10, в штамме-продуcente *E.coli*, индуктор – ИПТГ

Осуществлялась индукция экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок FlicAg85bTb10 (далее – «гибридный белок»), в созданном штамме-продуcente на основе клеток *E.coli* BL21, по п. 2.2.2 с использованием ИПТГ (Invitrogen, США) в конечной концентрации 0,1 мМ, 0,5 мМ и 1 мМ. Для этого единичная колония штамма-продуцента инокулировалась в стандартную жидкую среду LB (Gibco BRL, США), 10 мл, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл, и ферментировалась при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа в течение 16 ч при 250 об./мин. Измерялась ОП₆₀₀, и отбиралось соответствующее количество культуры в 4 колбы, разводилось стандартной жидкой средой LB (Gibco BRL, США), содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл, до ОП₆₀₀ 0,1 оптических единиц (ОЕ), и осуществлялась ферментация в течение 2 часов до ОП₆₀₀ 0,4 ОЕ. Далее в первую колбу добавлялся ИПТГ (Invitrogen, США) до конечной концентрации 0,1 мМ, во вторую – до 0,5 мМ, в третью – до 1 мМ, в четвертую колбу не добавлялся ИПТГ (контроль), и осуществлялась ферментация в течение 9 часов, отбирая через каждый час аликвоты суспензии клеток для измерения ОП₆₀₀ и анализа экспрессии гена методом диск-электрофореза белков, по п. 2.8.1. Аликвоты хранились при -20°C.

2.6.5. Автоиндукция экспрессии гибридного гена в штамме-продуcente *E.coli*, индуктор - 0.2% лактоза (по методу Штудиера)

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудиера [237] использовалась среда РҮР-5052, состоящая из 1% пептона (Gibco, США), 0,5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ K₂HPO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0,5% глицерола, 0,05% глюкозы и 0,2% лактозы.

Единичная колония штамма-продуцента рекомбинантного белка FlicAg85bTb10 была инокулирована в среду РҮР-5052, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл. Ферментация проводилась при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин. в течение 20 часов, до отсутствия существенного изменения ОП₆₀₀ за 1 час. Далее отбиралась аликвота клеток на анализ методом электрофореза по п. 2.8.1., а оставшаяся биомасса

осаждалась центрифугированием при 9000g и хранилась при -70°C для последующего выделения белка.

2.6.6. Создание музейных образцов клеток *E.coli*

Для длительного хранения были созданы образцы штаммов *E.coli* – продуцентов белка FlicAg85bTb10 и плазмид pсDNA3.1(+)*ag85a*, pсDNA3.1(+)*ag85b*, - далее «плазмидная ДНК», в названии групп животных – «ДНК», - pЕТ-28a(+)*FlicAg85bTb10*, которые хранятся в главном (МСВ - master cell bank) и рабочем (WСВ - working cell bank) банках клеток. Для этого единичная колония штамма была инокулирована в стандартную жидкую среду LB (Gibco BRL, США), содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл, либо ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, в зависимости от устойчивости, сообщаемой плазмидой штамму, и осуществлялась инкубация при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа в течение 16 ч при 250 об./мин. Далее к 850 мкл выращенной культуры добавлялись 150 мкл 10% глицерола, перемешивались и замораживались в криовиалах при температуре -70°C. Для работы использовались образцы из рабочего банка клеток, в соответствии с международными стандартами работы с прокариотическими клетками [238].

2.7. Анализ и очистка нуклеиновых кислот

2.7.1. Переосаждение плазмидной ДНК

Для переосаждения плазмидной ДНК она помещалась в смесь из 1 мкл гликогена, 1/10 объема ацетата натрия, 2,5 объемов этилового спирта 96%, держалась при -70°C в течение 20 мин., далее осуществлялось центрифугирование в течение 30 мин. при 13,5 тыс. оборотов, супернатант отбрасывался. Добавлялся 70% этанол, далее осуществлялось центрифугирование в течение 10 мин., супернатант отбрасывался. Осуществлялось высушивание при комнатной температуре. Добавлялась стерильная вода, осуществлялось перемешивание.

2.7.2. Секвенирование фрагментов ДНК

Для анализа созданных клонов клеток *E.coli* на наличие фрагмента клонированной ДНК осуществлялось секвенирование по методу Сэнджера [239]. В работе использовался набор Applied Biosystems BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по прилагающейся к нему инструкции. Для мечения продуктов реакции использовались меченные флуоресцентным красителем ддНТФ, причем каждому ддНТФ соответствовал свой краситель. Для секвенирования использовались немеченные праймеры для секвенирования клонированных фрагментов в плазмидных ДНК рЕТ-28a(+) (1 и 2 в табл. 2) и рсDNA3.1(+) (1 и 3 в табл.2).

Таблица 2 - Олигонуклеотидные праймеры для секвенирования фрагмента клонированной ДНК в вектора рЕТ-28a(+) и рсDNA3.1(+)

№	Название праймера	5'→3' нуклеотидная последовательность	Кол-во п.о.	Tm, °C
1	T7 promoter primer	TAATACGACTCACTATAGGG	20	45,6
2	T7 terminator primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19	54,8
3	BGH Reverse Primer	TAGAAGGCACAGTCGAGG	18	53,1

Реакционная смесь для секвенирования содержала 2 мкл ДНК (очищенный амплифицированный фрагмент), 0,5 мкл праймера (5 пмоль), 1,75 мкл 5x Sequencing buffer (350 мМ TrisHCl pH 9, 2,5 мМ MgCl₂), 0,5 мкл BigDye® Terminator (BDT) Reaction Mix, 5,25 мкл воды.

Реакционная смесь прогревалась 5 мин. при 95°C для денатурации ДНК. Реакция амплификации проводилась в термоциклере для амплификации нуклеиновых кислот C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующих условиях:

Для амплификации фрагмента ДНК, содержащего целевой ген, проводились 35 циклов:

95°C – 20 сек.	} 35 циклов
50°C – 20 сек.	
72°C – 1 мин.	

Для достраивания образовавшихся цепей ДНК проводился дополнительный цикл: 5 мин. при 72°C.

Реакционная смесь очищалась от свободных меченых ддНТФ по инструкции к набору BigDye X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США).

Для разделения продуктов реакции секвенирования с использованием капиллярного секвенатора Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) применялся 3500/3500xL Genetic Analyzer Polymer “POP-6™” (Applied Biosystems, США).

Результаты разделения продуктов реакции секвенирования регистрировались путем сканирования лазером и детекции четырех флуоресцентных красителей, включенных во все типы ддНТФ. Получались хроматограммы, которые анализировались с использованием специализированных компьютерных программ, по п. 2.9.2..

2.7.3. Аналитический электрофорез ДНК в агарозном геле

Анализ препаратов ДНК проводился методом электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле (Gibco BRL, США) [240]. Электрофорез проводился в горизонтальном аппарате в буфере ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат, 2 мМ EDTA pH 8,0, 0,5 мкг/мл бромистого этидия) при напряжении 5-10 В/см геля. Перед нанесением на гель проба ДНК смешивалась с шестикратным буфером (0,25% бромфеноловый синий, 30% глицерин) (ThermoScientific, США). Наносились по 5 мкл смеси в лунку. Результат разделения ДНК регистрировался в проходящем УФ свете (302 нм) трансиллюминатора Macrovue (LKB, Швеция). Длина амплифицированного фрагмента определялась по логарифмической зависимости подвижности ДНК от длины фрагментов в маркере. В качестве маркера использовалась фирменная смесь фрагментов ДНК «GeneRuler 1kb DNA Ladder» (Thermo Scientific).

2.7.4. Препаративный электрофорез ДНК и выделение ДНК из агарозного геля

Амплифицированные фрагменты ДНК концентрировались и очищались при помощи препаративного электрофореза в 0,8% агарозном геле (Gibco BRL, США) [240]. Проба смеси после проведения ПЦР смешивалась с шестикратным буфером (0,25% бромфеноловый синий, 30% глицерин) (ThermoScientific, США) и наносилась на гель, по 18 мкл в лунку. Электрофорез проводился в горизонтальном аппарате в буфере ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА pH 8,0, 0,5 мкг/мл бромистого этидия) при напряжении 5-10 В/см. Результат разделения ДНК регистрировался в проходящем УФ-свете (302 нм) трансиллюминатора Macrovue (LKB, Швеция). Длина амплифицированного фрагмента определялась по логарифмической зависимости подвижности ДНК от длины фрагментов в маркере. В качестве маркера использовалась фирменная смесь фрагментов ДНК «GeneRuler 1kb DNA Ladder» (Thermo Scientific). Участок агарозы, содержащий полосу, соответствующую ДНК необходимого размера,

вырезался, и фрагмент ДНК очищался с помощью набора DNA&Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Великобритания) в соответствии с инструкцией.

2.7.5 Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli*

Единичная колония клеток *E.coli*, выращенная на LB-агаре в чашке Петри с добавлением релевантного антибиотика, была инокулирована в стандартную жидкую среду LB (Gibco BRL, США), 2–10 мл, содержащую антибиотик в концентрации 25 мкг/мл, для канамицина, и 50 мкг/мл, для ампициллина, к которому искомая плазмидная ДНК сообщает устойчивость, - релевантному, - и осуществлена ферментация при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа в течение 16 ч при 250 об./мин.

Полученная культура бактериальных клеток была осаждена центрифугированием при 4000g в течение 10 мин. при +4°C. Удалялся супернатант, и из осадка клеток выделялась плазмидная ДНК с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Цитокин, Россия), по инструкции к набору.

При необходимости наработки плазмидных ДНК в большом количестве, например, для исследований на животных, выделение и очистка плазмидной ДНК из полученной культуры клеток осуществлялась с использованием набора EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen), позволяющего получить апирогенную ДНК.

Выделенная плазмидная ДНК анализировалась электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле по п. 2.7.3., ее концентрация измерялась с помощью флуориметрии по п.2.7.6.. Выделенная плазмидная ДНК хранилась при -20°C.

2.7.6. Определение концентрации плазмидной ДНК

Концентрация выделенной плазмидной ДНК определялась с помощью флуориметрии с помощью спектрофотометра UV-1240 mini (Shimadzu, Япония).

В качестве контрольного раствора использовалась вода без добавления тестируемого препарата. В ячейку для измерения оптической плотности объемом 2 мл вносились 1,950 мл воды и 0,05 мл тестируемого раствора (концентрация 1мг/мл), перемешивались, и измерялась

оптическая плотность при длине волны 260 нм. Определение концентрации ДНК проводилось по формуле:

$$C(\text{мкг/мл})=40A_{260}K,$$

где A_{260} -оптическая плотность препарата, измеренная при длине волны 260 нм; $K(\text{мкг/мл})$ - для ДНК 50 мкг/мл (50 мкг/мл двухцепочечной ДНК в воде); 40 - разведение тестируемого препарата.

2.8. Анализ и очистка рекомбинантных белков

2.8.1. Электрофорез белков в денатурирующих условиях по Леммли

Электрофорез клеточных лизатов, их фракций и очищенного рекомбинантного гибридного белка FliCAg85BTb10.4 проводился в 12,5%-ном, а белка Ag85B – 10% ПААГ в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) с использованием на стадии концентрирования образца механизма изотахофореза (ИТФ) [241].

Для проведения электрофореза использовалась система из нескольких буферных растворов:

- катодного буфера – Trisbase 0,1 М; Tricine 0,1 М; SDS 0,1% (закрывающий анион – трицин);
- анодного буфера – Trisbase 0,2 М pH 8,9 (ведущий анион – Cl⁻).

Использовались концентрирующий гель с $T=2,5\%$, разделяющий гель с $T=12,5\%$ и $C=3\%$, где T – относительное содержание мономеров в геле, C – содержание сшивающего агента в сумме мономеров.

В лунки в концентрирующем геле вносились подготовленные пробы лизатов бактериальных клеток, либо их фракций, либо очищенных белков, либо сывороток крови.

Пробы подготавливались следующим образом: к исходному материалу добавлялся буфер, содержащий 0,2 М трис-HCl pH 7,5, 0,2 М NaCl, 0,01 М ацетат натрия, 0,01 М β-меркаптоэтанол и 5% глицерин, после чего осуществлялось кипячение в течение двух минут. Лизаты клеток подготавливались из 1 мл клеточной культуры: клетки осаждались центрифугированием и ресуспендировались в 200 мкл указанного буфера, с последующим кипячением в течение двух минут. В качестве маркера молекулярных масс использовался PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Электрофорез проводился в денатурирующих условиях. Гели окрашивались Кумасси G-250, после чего отмывались в буфере на основе ледяной уксусной кислоты и анализировались.

2.8.2 Определение локализации целевого белка

Клетки штамма-продуцента после индукции экспрессии гибридного гена и осаждения отмывались от питательной среды натрий-фосфатным буфером. Далее клетки подвергались трем циклам соникации на приборе ультразвуковой генератор ИЛ10-2.0 (INLAB LTD) на льду по 30 секунд с перерывом в 2 мин. После осуществлялось центрифугирование при 10000 g в течение 20 мин. Далее отбирались аликвоты полученных фракций - супернатанта и осадка, - для анализа методом электрофореза белков в полиакриламидном геле (ПААГ), описанным в п. 2.8.1..

2.8.3. Имобилизованная металлоаффинная хроматография

Очистка гибридного рекомбинантного белка FliCAg85bTb10.4 проводилась с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ (нитрилотриуксусная кислота) сефарозы. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка.

К индуцированным клеткам-продуцентам добавлялся лизирующий буфер (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1% Triton X-114, 10 mM EDTA, 5 % Glucose, pH 8.0) из расчета 3 мл буфера на 1 г влажных клеток, осуществлялось перемешивание биомассы до состояния однородной суспензии. Осуществлялась инкубация при комнатной температуре 30 минут с интенсивным встряхиванием. Далее клетки разрушались с помощью 5 циклов соникации по 30 сек с перерывом в 2 мин на льду, на приборе ультразвуковой генератор ИЛ10-2.0 (INLAB LTD). Осуществлялось центрифугирование в течение 30 минут, при 20000 g, +4°C. Супернатант удалялся, слой клеточного дебриса смывался водой, тельца включения использовались в дальнейшей работе.

Проводилось разрушение телец включения путем инкубации с лизирующим буфером, содержащим 500 mM натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 6 M гуанидин гидрохлорид, 500 mM хлористый натрий, в течение часа. К клеткам, собранным центрифугированием из 50 мл культуры, прибавлялось по 8 мл такого лизирующего буфера.

Колонка, содержащая Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивалась буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0, 8М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). Разрушенные тельца включения наносились на колонку. Далее колонка промывалась двумя объемами буфера для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0, 8М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). После этого колонка промывалась тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0, 8М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 30 мМ имидазол). Белок элюировался с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0, 8М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 200 мМ имидазол). Собирались фракции по 1 мл, концентрация белка в них определялась по методу Бредфорд, по п. 2.8.5.. Далее материал анализировался с помощью электрофореза в ПААГ по п. 2.8.1..

2.8.4 Гель-фильтрация

Данный метод позволяет разделять молекулы по размеру и применялся для избавления от примесей, имеющих в препарате белка после очистки с помощью иммобилизованной металоаффинной хроматографии.

Хроматография проводилась на гель-фильтрационной колонке XK26/60 с сорбентом Superdex S-100, при скорости элюции 1,3 мл/мин, элюент - 0,01 М натрий фосфатный буфер, рН 7,2-7,4. Результаты анализировались с помощью электрофореза в ПААГ по п. 2.8.1..

2.8.5. Определение концентрации белка по методу Бредфорд

Концентрация белка определялась по методу Бредфорд [242]. Приготовление реагента Бредфорд: 100 мг Кумасси G-250 растворялись в 50 мл спирта, добавлялись 100 мл ортофосфорной кислоты, объем доводился до 1 л дистиллированной водой, затем осуществлялось фильтрование через бумажный фильтр. Измерение проводилось следующим образом: объем образца доводился до 1 мл дистиллированной водой, добавлялся 1 мл реагента Бредфорд, перемешивался и инкубировался при комнатной температуре в течение 5 мин. После проводилось измерение ОП₅₉₅, концентрация белка рассчитывалась по калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору сывороточного альбумина быка.

2.8.6. Определение концентрации белка по методу Лоури

Количественное определение белка проводилось также методом Лоури [243] с предварительным осаждением белка. Раствор белка в количестве 5 мл переносился в мерную колбу объемом 25 мл, объем раствора доводился водой до метки и перемешивался. В центрифужную пробирку помещался 1 мл испытуемого раствора, прибавлялся 1 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты, и осуществлялось перемешивание. Проба оставлялась на 20 ч при температуре +4°C. Осадок отделялся центрифугированием при 2000g в течение 30 мин. при температуре +4°C и промывался 1 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем еще раз центрифугировался при 2000g в течение 30 мин. при температуре +4°C. Осторожно удалялась надосадочная жидкость, оставшийся осадок растворялся в 0,2 мл 0,1М гидроксида натрия, и объем раствора доводился водой до 1 мл. К 0,5 мл полученного раствора прибавлялось 0,5 мл воды, перемешивалось, и вносилось 5 мл реактива В. Содержимое пробирки перемешивалось и оставлялось на 10 минут при комнатной температуре. Затем прибавлялось 0,5 мл разведенного реактива Фолина, быстро и тщательно перемешалось и оставлялось на 30 минут при комнатной температуре.

Оптическая плотность испытуемого раствора измерялась на спектрофотометре при длине волны 750 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

В качестве раствора сравнения использовалась проба, содержащая 0,1 мл 0,1 М гидроксида натрия, 0,9 мл воды, 5 мл реактива В и 0,5 мл разведенного реактива Фолина.

Содержание белка рассчитывалось по калибровочному графику.

Калибровочный график строился в пределах концентраций от 0,05 до 0,2 мг/мл стандартного белка (БСА, «Sigma»). Растворы бычьего сывороточного альбумина готовились в указанном интервале концентраций (от 0,05 до 0,2 мг/мл) и подвергались тем же процедурам, что и исследуемый препарат.

2.8.7. Иммуноферментный анализ

2.8.7.1. Измерение титров антител

В лунки 96-луночного планшета (Greiner, Германия) вносился целевой антиген, гибридный рекомбинантный белок FliCAg85bTb10.4, по 500 нг в 50 мкл PBS. Сорбция проводилась при

+37°C в течение 1 ч при постоянном помешивании на горизонтальном шейкере для планшетов. Далее осуществлялась отмывка несвязавшихся молекул антигена PBS с 0,05% Tween 20. Далее добавлялось 3% молоко и 0,05% Tween 20.

Готовилась серия 2-кратных разведений сывороток, разведение осуществлялось PBS, полученные растворы вносились в лунки планшета по 100 мкл (начиная с 1:100), проводилась инкубация в течение 1,5 ч при постоянном перемешивании при +37°C. Далее осуществлялась отмывка несвязавшихся молекул антител PBS с 0,05% Tween 20.

В лунки планшета добавлялось по 100 мкл конъюгата. В качестве конъюгата использовались моноклональные крысиные антимышьиные IgG (Invitrogen, США) в разведении 1:1000, меченые пероксидазой хрена. Проводилась инкубация в течение 1 ч при +37°C при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов. Далее осуществлялась отмывка несвязавшихся молекул антител PBS с 0,05% Tween 20.

В лунки планшета добавлялось по 100 мкл субстрата. В качестве субстрата использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин - ТМБ (BD Bioscience). Проводилась инкубация в течение 15 минут, затем реакция останавливалась 1н H₂SO₄. Учет реакции проводился с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводились не позднее 10-15 минут после остановки реакции. Качество теста считалось удовлетворительным, если ОП контроля раствора ТМБ не превышала 0,10 ОЕ, среднее значение оптической плотности отрицательного контроля (ОП_{ср К-}) не превышало 0,150 ОЕ, а значение ОП положительного контроля было не менее 1,0 ОЕ.

За титр принималось наибольшее разведение сыворотки, при котором оптическая плотность, по крайней мере, в 2 раза больше, чем сыворотка не иммунизированных мышей в том же разведении.

2.8.7.2. Измерение концентрации белка

В лунки 96-луночного планшета (Greiner, Германия) вносилась сыворотка крови мышей, отобранной на 2, 5 и 7 день после введения плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)_{Ag85b}, а также отрицательный контроль и положительный контроль - набор проб гибридного белка FliC_{Ag85bTb10.4} для построения калибровочной кривой. Сорбция проводилась при +37°C в течение 1 ч при постоянном помешивании на горизонтальном шейкере для планшетов. Далее осуществлялась отмывка несвязавшихся молекул антигена PBS с 0,05% Tween 20. Далее добавлялось 3% молоко и 0,05% Tween 20.

В лунки планшета добавлялось по 100 мкл неразбавленной сыворотки, полученной предварительно по п. 2.10.1.2.. Проводилась инкубация в течение 1 ч при +37°C при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов. Далее осуществлялась отмывка несвязавшихся молекул антител PBS с 0,05% Tween 20.

В лунки планшета добавлялось по 100 мкл конъюгата. В качестве конъюгата использовались антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam). Проводилась инкубация в течение 1 ч при +37°C при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов. Далее осуществлялась отмывка несвязавшихся молекул антител PBS с 0,05% Tween 20.

В лунки планшета добавлялось по 100 мкл субстрата. В качестве субстрата использовался 3,3',5,5'-тетраметилбензидин - ТМБ (BD Bioscience). Проводилась инкубация в течение 15 минут, затем реакция останавливалась 1н H₂SO₄. Учет реакции проводился с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводились не позднее 10-15 минут после остановки реакции. Качество теста считалось удовлетворительным, если ОП контроля раствора ТМБ не превышала 0,10 ОЕ, среднее значение оптической плотности отрицательного контроля (ОПср К-) не превышало 0,150 ОЕ, а значение ОП положительного контроля было не менее 1,0 ОЕ.

Далее строилась калибровочная кривая по результатам анализа проб положительного контроля, и концентрация белка Ag85b в сыворотке мышей измерялась по данной кривой.

2.8.8. Вестерн блот

После проведения электрофореза в ПААГ по п.2.8.1. осуществлялся перенос белков на мембрану. Использовались следующие растворы: Раствор I - 10 мл этанола, 17 мл Tris-HCl 1М рН10,4, до 50 мл дН₂О, Раствор II - 10 мл этанола, 1,25 мл Tris-HCl 1М рН10,4, до 50 мл дН₂О, Раствор III - 10 мл этанола, 1,25 мл Tris-HCl 1М рН9,4, до 50 мл дН₂О. По размеру геля с небольшим отступом нарезались фрагменты нитроцеллюлозной мембраны BioRad и чуть большим – ватмана, далее собирался «сэндвич» на аппарате для горизонтального переноса Semi-phor TE70 Semi-dry transfer unit: 6 фрагментов ватмана, вымоченных в Растворе I, откатанных стеклянной палочкой, 3 фрагмента ватмана, вымоченных в Растворе II, нитроцеллюлозная мембрана, вымоченная в Растворе II, ПААГ после проведения электрофореза по п.2.8.1., который располагался на мембране и не двигался более, обеспечивалось отсутствие пузырей, 9 фрагментов ватмана, вымоченных в Растворе III, откатанных стеклянной палочкой. Закрывалась

крышка прибора, подключалось питание, 100 В в течение часа, источник тока - Constant current PS unit model PS50, Hoeffler Scientific Instruments (HSI).

Далее осуществлялось формирование иммобилизованного на мембране комплекса: белок Ag85b-специфичное антитело-вторичное антитело-пероксидаза хрена. Для этого мембрана обрабатывалась 1% сухим обезжиренным молоком на фосфатно-солевом буфере с добавлением 0.5% Tween-20 (125 мкл 20% водного раствора на 50 мл молока), осуществлялась инкубация в течение 15 минут при комнатной температуре. Далее смесь сливалась, добавлялись специфичные антитела - кроличьи антитела к гибриднему рекомбинантному белку FliCAg85bTb10.4, полученные по п. 2.10.1.2., в 1% сухом обезжиренном молоке, в разведении 1:3000, затем осуществлялась инкубация в течение 16 ч при +4°C, после чего осуществлялось нагревание до комнатной температуры. После осуществлялись 3 отмытки 1% сухим обезжиренным молоком с добавлением 0.5% Tween-20, каждая - по 10 минут. После последней отмытки добавлялись вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, - Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam), - в 1% сухом обезжиренном молоке, в разведении 1:6000, осуществлялась инкубация в течение 1 ч, после чего проводились 3 отмытки фосфатно-солевым буфером, каждая – по 10 минут.

Сформированные иммобилизованные на мембране комплексы проявлялись с использованием набора для хемолюминисценции Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). На влажную мембрану с иммобилизованными комплексами белок Ag85b-специфичное антитело-вторичное антитело-пероксидаза хрена наносилась смесь равных объемов реагентов 1 и 2 из данного набора, все упаковывалось между слоями прозрачной пластиковой папки для бумаг (слайда). Данная конструкция помещалась в кассету для рентгеновских снимков (Kodak) и прокатывалась валиком для устранения пузырей. Сверху наклеивался фрагмент рентгеновской пленки Amersham Hyperfilm ECL и фиксировался скотчем. Кассета закрывалась, осуществлялось выдерживание в течение 12 ч. Пленка проявлялась с использованием коммерческих растворов проявителя и фиксажа (Крок-рентген) согласно инструкции и высушивалась. Данные действия осуществлялись в темноте в свете красной лампы.

Далее при нормальном освещении выбиралась картинка с лучшим качеством и сканировалась на настольном сканере параллельно с исходной мембраной, на которой расположены маркеры молекулярных весов и разметка дорожек. Полученные изображения совмещались с помощью программы PhotoFiltre 7.

2.9. Расчет и анализ с использованием программного обеспечения

2.9.1. Расчет и анализ белков

Для моделирования гибридного белка FlicAg85bTb10 были произведены следующие действия:

1. Поиск иммуногенных эпитопов белков Ag85B, Tb10.4, FliC с помощью программы CPREDS (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html>)
2. Построение модели целого белка для определения ориентации доменов
3. Построение моделей для каждого домена (с использованием образцов 3D структур и *ab initio*)
4. Докинг моделей с использованием модели целого белка.

Для получения наиболее реалистичных результатов в автоматическом режиме использовался алгоритм I-Tasser для моделирования белков.

Анализ аминокислотной последовательности белка осуществлялся с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>).

Анализ полиакриламидных гелей проводился с помощью программы ImageJ.

Анализ собранных с использованием цитофлуориметра данных проводился с помощью программы WinMDI v2.8.

2.9.2. Расчет и анализ последовательностей ДНК

Рассчитывалась последовательность нуклеотидов гена, коллинеарная последовательности аминокислот кодируемого им гибридного белка, а также белков Ag85a и Ag85b *Mycobacterium tuberculosis*, с одновременной оптимизацией по кодонному составу для экспрессии в клетках *E.coli*, либо человека, соответственно, а также с фланкированием целевого гена сайтами рестрикции, а также, в случае дальнейшего лигирования с плазмидной ДНК pсDNA3.1(+), с добавлением последовательности Козак перед старт-кодоном для инициации трансляции [244–246], после старт кодона – сигнальной последовательности ТРА (human tissue-type plasminogen activator) для секреции синтезируемого белка из эукариотической клетки, использован инструмент на сайте molbiol.ru. Подбор праймеров осуществлялся вручную, с использованием программы ChromasPro. Анализ праймеров осуществлялся с помощью программы

FastPCRv.4.0.27 (PCR Team, Финляндия). Результаты секвенирования оформлялись с использованием программ MegaBACE Sequence Analyzer v.4.0, Sequence Scanner v1.0. Качество проведенного секвенирования оценивалось с использованием программы ChromasPro, формируя и анализируя полученные хроматограммы. Полученные в результате секвенирования последовательности ДНК анализировались с использованием программы BioEdit посредством выравнивания относительно референсных генов.

2.9.3. Статистическая обработка результатов исследований

При определении показателей тяжести течения экспериментального туберкулезного процесса и определении титра антител доверительный интервал рассчитывался для среднего по генеральной совокупности. Доверительный интервал — это интервал с обеих сторон от среднего выборки. Уровень значимости (альфа), используемый в расчетах, был равным 0,05, т.е. уровень надежности равнялся 95%. Доверительный интервал рассчитывался по формуле: $\bar{x} \pm 1.96 * (\sigma / \sqrt{n})$, где \bar{x} - среднее по генеральной совокупности, n – объем выборки, σ - стандартное отклонение для генеральной совокупности. Стандартное отклонение – это мера того, насколько широко разбросаны точки данных относительно их среднего. Стандартное отклонение (σ)

рассчитывалось по формуле:
$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$
, где n – объем выборки, x -отдельное значение.

Также полученные результаты подвергались статистической обработке и оценивались по непарному t-критерию Стьюдента с помощью компьютерной программы Statistica 6.0. Т-критерий Стьюдента используется для определения статистической значимости различий средних или относительных величин. Н0 (нулевая гипотеза) об отсутствии достоверных различий принималась при p-value >0,05; Н1 (альтернативная гипотеза) о наличии достоверных различий принималась при p-value <0,05.

При оценке полученных результатов использовался также параметрический тест Фишера [247] и непараметрический метод Уилкоксона, Манна - Уитни [248]. Взаимосвязь между величинами различных показателей определялась методом корреляционного анализа по Спирмену, пакет статистических программ Statistica 6.0.

2.10. Иммунологические методы

2.10.1. Иммунизация лабораторных животных

2.10.1.1. Иммунизация мышей

В опытах 1-5 исследованы кандидатные вакцины «гибридный белок», «плазмидные ДНК», «гибридный белок + плазмидные ДНК», «гибридный белок + IL-7», «гибридный белок + CRM197», названные согласно действующему веществу. Количественный состав ингредиентов – активных агентов таких кандидатных вакцин, а также дополнительные компоненты приведены в таблице 3.

Для иммунизации лабораторных животных использовалась схема двукратного введения по дозе вакцинного кандидата внутримышечно, либо интраназально, для гибридного белка, с интервалом в две недели. Схема эксперимента приведена в таблице 3.

Таблица 3 - Исходные данные по постановке опытов 1-5 на лабораторных животных

Показатели/№ опыта	1	2	3	4	5
Промежуток времени между действиями					
между 1 и 2 иммунизацией	2 недели	15 дней	2 недели		
между 2 иммунизацией и заражением	10 дней	2 недели			
между заражением и - выведением из опыта - анализом выделенного биоматериала	5 недель	43 дня (6 недель и 1 день)	33 дня (4 недели и 5 дней)	6 недель	41 день (5 недель и 6 дней)
Типы животных					
Мыши, самки	белые неинбредных линий	белые неинбредных линий	белые неинбредных линий	белые неинбредных линий	Balb/c
Количество животных в группах					
Интактные	10	10	6	6	6
Контроль заражения	15	10	8	13	4
БЦЖ 1-кратно	15	13	17	26	1
Гибридный белок в/м	14	12	15	17	13

Гибридный белок и/н	14	12	-	-	-
Гибридный белок + ДНК в/м	13	12	17	-	-
ДНК в/м	13	12	-	-	-
БЦЖ в/м 2-кратно	15	12	17	-	-
Гибридный белок + CRM197 в/м	-	-	-	19	-
Гибридный белок в/м + IL-7 7-кратно до вакц. п/к	-	-	-	19	-
Содержание вещества в 1 дозе кандидатной вакцины и объем 1 дозы,					
гибридный белок	20 мкг в -100 мкл в/м и в -10 мкл и/н - по 5 мкл в каждую ноздрю	20 мкг в -100 мкл в/м и при - и/н: <u>1</u> имм-я: в 11 мкл - по 5,5 мкл в каждую ноздрю <u>2</u> имм-я: в 10 мкл - по 5 мкл в каждую ноздрю	10 мкг в 100 мкл в/м	20 мкг в 200 мкл в/м (1)	50 мкг в 100 мкл в/м
ДНК	50 мкг в 100 мкл в/м	43 мкг в 100 мкл в/м	-	-	-
гибридный белок + ДНК	20 мкг + 50 мкг в 100 мкл в/м	20 мкг + 35,8 мкг в 100 мкл в/м	10 мкг + 25 мкг в 100 мкл в/м	-	-
гибридный белок + IL-7/CRM197	-	-	-	10 мкг + 10 мкг в 200 мкл в/м (2)	-
Дополнительные компоненты кандидатной вакцины					
Растворитель	Физ.раствор		PBS	Физ. раствор	PBS
Адъювант (все группы, кроме отр. контроля, 1-кр БЦЖ, ДНК, гибр. белок и/н)	Гидроксид алюминия			Гидроксид алюминия (1)	Гидроксид алюминия
				Гидроксид алюминия +CRM197 (2)	

Для иммунизации плазмидная ДНК разводилась в физиологическом растворе, либо PBS и вводилась в квадрицепс левой конечности мыши.

Для иммунизации белок и гидроксид алюминия, используемый в качестве адъюванта, растворялись в физиологическом растворе, либо фосфатном буфере и вводились испытуемому животному в квадрицепс левой конечности. Гидроксид алюминия использовался в количестве 37 мг на 2 мг белка в опытах 1,2 и 35 мг на 2 мг белка в опытах 3-5. Буфер в используемом растворе белка в опытах 1-3,5 - PBS/4М мочевины/ 200 мМ имидазол, в опыте 4 - 6М мочевины, pH 7,2.

Вакцина сравнения (БЦЖ) вводилась однократно, согласно предписаниям инструкции к препарату.

В ряде опытов вакцина БЦЖ, предварительно смешанная с физиологическим раствором и гидроксидом алюминия, вводилась в квадрицепс левой конечности животного, дважды, с интервалом в две недели.

Заражение проводилось, в среднем, через 2 недели после второй иммунизации. Микобактериальная суспензия для заражения мышей приготавливалась *ex tempore* из трехнедельного штамма, культивируемого на среде Левенштейна-Йенсена. Использовались заражающая доза 10^6 КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора, путь введения - в латеральную хвостовую вену.

Титр антител анализировался после выведения животных из опыта.

2.10.1.2. Иммунизация кроликов

Иммунизация кроликов, возраст 9 месяцев, 3 шт., проводилась гибридным белком FliC_{Ag85bTb10.4} в количестве 200 мкг, концентрация 100 мкг/мл, в объеме 2 мл, с полным адъювантом Фрейнда, адъювант – 1/10 от объема раствора для иммунизации. Иммунизация проводилась трехкратно, с интервалом в две недели, подкожно в бедро, через две недели после третьей иммунизации осуществлялся забор крови из ушной вены. Сыворотки получались по п.2.10.8. Выбиралась и использовалась далее сыворотка с самым большим титром, 1:1500000.

2.10.2. Выделение спленоцитов мышей

Животные умерщвлялись в день окончания опыта методом цервикальной дислокации, в асептических условиях выделялись селезенки. Материал каждой группы объединялся – селезенки мышей одной группы помещались в физиологический раствор и гомогенизировались.

Затем выделялись Т-лимфоциты. Взвесь спленоцитов фильтровалась через стерильную марлевую салфетку, переносилась в 15 мл полипропиленовые пробирки ("Sarshtedt", Австрия) и ресуспендировалась в 10 мл среды RPMI 1640 ("Биолот", Россия). Спленоциты осаждались центрифугированием на 1000 об/мин. (ускорение ~400 g) в течение 7 минут, супернатант сливался, и для удаления эритроцитов к осадку добавлялся 1 мл FACS Lysing Solution (Becton Dickinson). Клетки ресуспендировались с помощью вортекса и инкубировались 2 минуты при комнатной температуре, затем в пробирку добавлялось 10 мл среды RPMI 1640, и снова осаждались клетки центрифугированием при 1000 об/мин. в течение 5 минут. Осадок спленоцитов отмывался единожды в 10 мл среды RPMI 1640, и клетки переводились на среду RPMI 1640 и 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку ("Биолот"). Концентрация клеток определялась в камере Горяева, затем спленоциты переносились в 96-луночный круглодонный планшет ("SARSTEDT") в количестве 10^6 клеток на лунку.

2.10.3. Окрашивание клеточных антигенов

Содержимое каждой лунки планшета переносилось в 5 мл пробирку ("Coulter", США), фосфатным буфером (pH=7,4) доводилось до объема 4 мл, клетки осаждались центрифугированием при 400 g в течение 5 минут, супернатант удалялся, и добавлялись в пробирку 2,5 мкл антител, меченных флуоресцентным красителем, с последующей двукратной отмывкой холодным PBS буфером. Использовались моноклональные антитела (Caltag Laboratories, США), конъюгированные с красителями против клеточных антигенов: APC (Molecular Probes, США) для индикации живых клеток, Alexa Fluor 700 (Molecular Probes, США) для индикации лимфоцитов, FITC (ThermoFisher Scientific, США) для индикации CD4+ Т-лимфоцитов, PE-PC5.5 (Abcam, США) для индикации CD8+ Т-лимфоцитов, PE (Abcam, США) для индикации Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон гамма. Исходная концентрация антител во всех экспериментах - 100 мкг/мл. Конъюгация проводилась по инструкции производителя красителя.

2.10.4. Анализ с использованием проточного цитофлуориметра

Проводилась стимуляция полученных лимфоцитов препаратом гибридного белка FlіSAg85bTb10.4 в одной из двух концентраций – 40 мкг/мл (опыт №3 и №5) или 400 мкг/мл (опыт 5), либо стафилококковым энтеротоксином В (SEB), данная проба считалась положительным контролем, либо вносилась среда RPMI, и данная проба считалась отрицательным контролем.

Анализ проводился на проточном цитометре Gallios Navios (Beckman Coulter). Анализировался уровень экспрессии молекул субпопуляции Т-клеток: CD3, CD4, CD8, а также интерферона гамма (IFN γ). Гейт (окно) популяции устанавливался на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. Сбор данных производился с использованием программы System II Software (Beckman Coulter). В каждом эксперименте проводился анализ не менее 50 тысяч клеток.

2.10.5. Оценка протективности по показателям тяжести течения туберкулеза

Протективная активность вакцинных кандидатов оценивалась по следующим показателям тяжести течения экспериментального туберкулезного процесса:

- выживаемость животных в исследуемых группах при заражении модельной формой туберкулезной инфекции;
- макроскопическая оценка легких и селезенки (коэффициенты масс легких и селезенки, индексы поражения легких);
- бактериологическое исследование ткани легких.

Коэффициенты массы органов, Коэффициенты массы легких (КМЛ) и селезенки (КМС) вычислялись, исходя из соотношения массы органа и массы тела животного, и выражались в условных единицах (усл. ед.):

$$\text{Коэффициенты массы органа} = \frac{\text{масса органа (г)} \times 100}{\text{масса тела (г)}}$$

Индекс поражения легких (ИПЛ) устанавливался по совокупности экссудативных и продуктивных изменений в условных единицах - баллах.

Индекс поражения легких рассчитывался в соответствии с количеством и выраженностью очагов специфического воспаления, выявляемых при визуальном осмотре. При этом единичные субмилиарные очаги оценивались в 0,5 балла; многочисленные субмилиарные очаги (не более 20) - в 1 балл; многочисленные субмилиарные (более 20) - в 1,5 балла; единичные милиарные - в 1,75 балла; многочисленные сливающиеся субмилиарные и единичные милиарные - в 2 балла; многочисленные милиарные (не более 10) - в 2,25 балла; многочисленные милиарные, сливающиеся - 2,75 балла, появление мелких казеозных некротических фокусов - в 3 балла; обширный казеоз - 4 балла; сплошное поражение легких - 5 баллов. В случаях серозного пропитывания ткани легких к вычисленному индексу поражения прибавлялись от 0,25 до 1 баллов в зависимости от площади поражения.

Экссудативные изменения:

- легкие воздушны – 0
- единичные безвоздушные очаги – 0,25
- легкие безвоздушны на 1/2 - 0,5
- легкие безвоздушны на 2/3 – 0,75
- легкие безвоздушны на всем протяжении – 1,0

Продуктивные очаги:

- единичные субмилиарные очаги - 0,5
- многочисленные (не более 20) - 1,0
- многочисленные субмилиарные (более 20) - 1,5
- единичные милиарные - 1,75
- многочисленные сливающиеся субмилиарные и единичные милиарные - 2,0
- многочисленные милиарные (не более 10) - 2,25
- многочисленные милиарные, сливающиеся - 2,75
- появление мелких казеозных некротических фокусов - 3,0
- обширный казеоз - 4,0
- сплошное поражение легких - 5,0.

Бактериологические показатели оценивались путем дозированного посева гомогената ткани легких на плотную яичную среду Левенштейна-Йенсена методом серийных разведений (3 и 4 разведение). Определялась массивность роста микобактерий, и рассчитывался индекс защиты органа. Массивность роста микобактерий выражалась в десятичном \log (\lg) от числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на массу легких. Расчет индекса защиты органа осуществлялся по разнице между \lg КОЕ иммунизированных мышей и \lg КОЕ мышей группы контроля заражения. При оценке результатов положительным эффектом по задержке роста микобактерий считается индекс защиты $\geq 0,5 \lg$.

2.10.6. Выделение перитонеальных макрофагов

Перитонеальные макрофаги мышей выделялись путем промывания брюшной полости средой RPMI 1640 ("Биолот", Россия). Концентрация клеток доводилась до 1×10^6 клеток/мл, клетки культивировались (100 мкл на лунку) в течение 48 часов при температуре $+37^\circ\text{C}$ в атмосфере 5% CO_2 .

2.10.7. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

В пластиковую одноразовую чашку Петри вносилась культура полученных перитонеальных макрофагов в среде RPMI 1640 ("Биолот", Россия), осуществлялась инкубация при $+37^\circ\text{C}$ в течение 1 ч в атмосфере 5% CO_2 . Далее среда удалялась, вместе с не прикрепившимися клетками, клеточная взвесь дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^7 клеток на 1 чашку Петри) опсонизировалась сывороткой мышей и добавлялась в чашку Петри, осуществлялась инкубация в течение 1 и 2,5 часов, далее - двукратная отмывка и фиксация 70% этанолом и окрашивание гематоксилином и эозином. При 80-кратном увеличении осуществлялся подсчет клеток.

По полученным данным вычислялись фагоцитарная активность макрофагов, фагоцитарное число, показатель завершенности фагоцитоза, индекс завершенности фагоцитоза. На каждом сроке определения число животных в каждой группе было равным трем.

Статистическая обработка осуществлялась по п. 2.9.3.

2.10.8. Получение сывороток

Осуществлялся забор цельной крови у всех исследуемых животных в объеме 200-300 мкл из ретроорбитального синуса. Кровь инкубировалась в термостате при 37°C в течение 30 мин, после чего осуществлялось центрифугирование в течение 10 мин при 2000 g. Отбиралась сыворотка, не задевая тромба, в отдельную пробирку. Для избегания гемолиза сыворотка получалась не позже, чем через 2 ч после отбора крови. Для хранения пробирки замораживались и оставлялись при температуре минус 20°C .

Анализ антигенности проводился путем измерения титров антител в сыворотке крови исследованных животных. Титр антител сывороток иммунизированных животных определялся с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) по п. 2.8.7.. Результаты анализировались с использованием программы Microsoft Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Получение гибридного белка для исследований на лабораторных ЖИВОТНЫХ

3.1.1. Моделирование гибридного белка

По методике, описанной в п. 2.9.1., смоделирован гибридный белок FliCAg85bTb10.4, содержащий фрагменты белка FliC *Salmonella enterica serovar Typhimurium* и белка Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*, а также полноразмерный белок Tb10.4 *Mycobacterium tuberculosis*, все компоненты соединены шарнирной последовательностью аминокислот (рисунок 11).

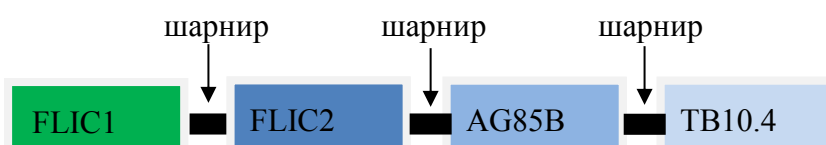


Рисунок 11 - Схема гибридного белка FliCAg85bTb10.4

Смоделированный гибридный белок состоит из 545 а.о. (Приложение 1). Домен FLIC1 представлен а.о. (аминокислотными остатками) 1-169, FLIC1 – а.о. 182-276, AG85B - а.о. 283-442, TB10.4 – а.о. 450–545.

Анализ аминокислотной последовательности данного белка с помощью программы ProtParam показал, что гибридный белок имеет молекулярную массу 57,2 кДа, pI 4.79. Однако поскольку для наработки данного белка был использован вектор pET28a(+), обеспечивающий синтез целевого белка с 6 гистидинами на N-конце, а также последовательностью для их отщепления тромбином, ожидаемая конечная молекулярная масса данного белка увеличилась примерно на 2 кДа.

3.1.2. Получение гена, кодирующего гибридный белок

Рассчитана последовательность нуклеотидов гена, 1650 п.о., коллинеарная последовательности аминокислот кодируемого им гибридного белка FliCAg85bTb10.4, с

одновременной оптимизацией по кодонному составу для экспрессии в клетках *E.coli* и добавлением фланкирующих ген-старт- и стоп-кодона и сайтов рестрикции NdeI и XhoI, по п. 2.9.2., см. Приложение 2.

Далее осуществлялись синтез и амплификация рассчитанной последовательности по п.2.5.1. Результаты ПЦР анализировались по п. 2.7.3., см. рисунок 12. Затем осуществлялась очистка наработанного ПЦР-фрагмента с использованием методики, описанной в п. 2.7.4.

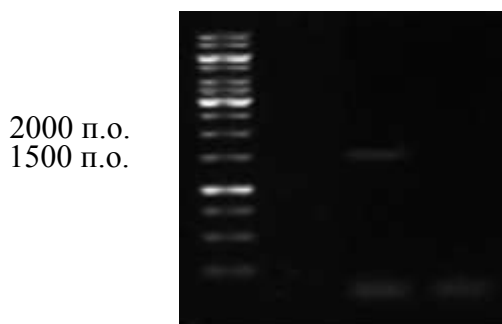


Рисунок 12 - Электрофореграмма ПЦР-продукта, кодирующего гибридный белок FliCAg85bTb10.4, полученного амплификацией синтезированного гена, для разделения фрагментов ДНК использовался 0,8% агарозный гель

3.1.3. Получение штамма *E.coli* DH10B/RpET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4*

В настоящем исследовании использована плазмидная ДНК серии рЕТ, позволяющая получить белок с полигистидином на N-конце, для удобства его последующей очистки. Также в работе использован оптимизированный по кодонному составу для организма-продуцента гибридный ген. Проводилась реакция рестрикции полученного очищенного ПЦР-фрагмента, а также вектора рЕТ-28a(+) по п.2.1.1., согласно методике, описанной в п. 2.5.2., с использованием рестриктаз, осуществляющих расщепление ДНК по сайтам NdeI и XhoI. Результаты анализировались с помощью электрофореза в агарозном геле по п. 2.7.3.. Далее полученные фрагменты очищались с использованием препаративного электрофореза по п. 2.7.4. и использовались в реакции лигирования по п. 2.5.3.. Рассчитанная плазмидная ДНК составляет 6921 п.о..

Для создания штамма-продуцента плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок FliCAg85bTb10.4, использовались клетки *E.coli* штамма DH10B/R по п.2.2.. Имеется значительный опыт безопасного использования данного штамма в генно-инженерных работах.

Он успешно используется для получения рекомбинантных векторов, в том числе несущих гены *M. tuberculosis* [249].

Подготавливались компетентные клетки по п. 2.6.1., и далее осуществлялась их трансформация полученной лигазной смесью, по методике, описанной в п. 2.6.2.. Выросшие на чашке Петри с канамицином клоны *E.coli* анализировались на наличие используемой в настоящем эксперименте плазмидной ДНК по п.2.6.3.(быстрый скрининг), с одновременным переносом анализируемых клонов клеток *E.coli* на отдельные чашки Петри с селективной средой. На электрофореграмме, полученной по п. 2.7.3., в результате анализа результатов быстрого скрининга нескольких клонов, была выявлена фракция, соответствующая гибриднему гену, что позволило отобрать клон-продуцент разработанной плазмидной ДНК - *E.coli* DH10B/RpET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4* (рисунок 13). Далее создавались музейные образцы такого клона клеток, по методике, описанной в п. 2.6.6.

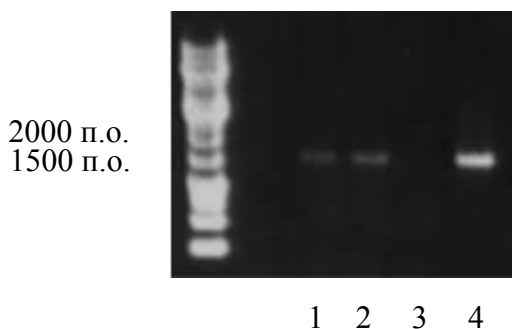


Рисунок 13 - Электрофореграмма ПЦР-продукта, кодирующего гибридный белок *FliCAg85bTb10.4*, полученного в результате быстрого скрининга выросших на селективной среде клонов *E.coli*, 0,8% агарозный гель, 1,2,4 – клоны 1-3, 3 – отрицательный контроль

Штамм *E.coli* DH10B/RpET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4* использовался для получения плазмидной ДНК *pET-28a(+)**FliCAg85bTb10.4*. Нарботка и выделение данной плазмидной ДНК осуществлялись с использованием методики, описанной в п. 2.7.5.. Выделенная плазмидная ДНК дополнительно подвергалась рестрикционному анализу по п. 2.6.3. и п. 2.5.2., результаты анализировались по п. 2.7.3. (рисунок 14).

Ожидалось получить при рестрикционном анализе с использованием рестриктазы *XhoI* линейаризованную плазмидную ДНК *pET-28a(+)**FliCAg85bTb10.4* размером 6921 п.о., рестриктаз *NdeI* и *XhoI* – двух фрагментов, фрагмента, кодирующего гибридный ген, 1644 п.о., и линейаризованной плазмидной ДНК, 5277 п.о.. При нанесении пробы плазмидной ДНК *pET-28a(+)**FliCAg85bTb10.4* без воздействия рестриктаз(ы) ожидалось увидеть на электрофореграмме три формы плазмидной ДНК – кольцевую, линейную и суперскрученную. Соответствие полученных результатов ожидаемым было подтверждено (рисунок 14).

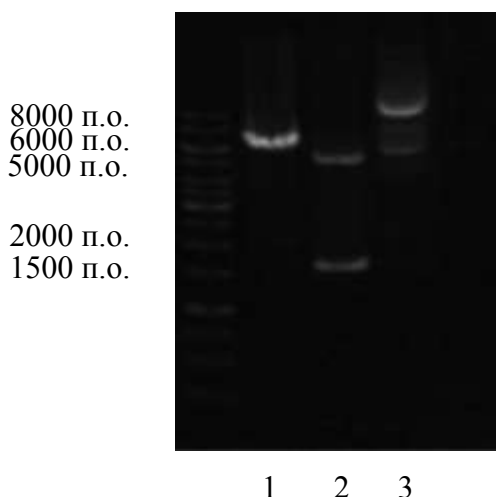


Рисунок 14 - Электрофореграмма плазмидной ДНК рЕТ-28a(+)*FliCAg85bTb10.4*: 1 – расщепленная рестриктазой *XhoI*, 2 – расщепленная рестриктазами *NdeI* и *XhoI*, 3 – отрицательный контроль (без обработки рестриктазами), 0,8% агарозный гель

Концентрация полученной плазмидной ДНК определялась по п. 2.7.6.. Был получен водный раствор плазмидной ДНК рЕТ-28a(+)*FliCAg85bTb10.4* в количестве 2 мл с концентрацией 4 мг/мл.

3.1.4. Получение штамма *E.coli* BL21(DE3)*pET-28a(+FliCAg85bTb10.4*

Имеется значительный опыт безопасного использования штамма *E.coli* BL21(DE3) в генно-инженерных работах. Данный штамм успешно используется для получения рекомбинантных белков, в том числе белков *M. tuberculosis* и, в частности, рекомбинантного белка TB10.4 [249, 250].

Выделенная плазмидная ДНК рЕТ-28a(+)*FliCAg85bTb10.4* подготавливалась к переносу в клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) по методике, описанной в п. 2.7.1.. Клетки *E.coli* штамма BL21(DE3) по п.2.2. подготавливались по п. 2.6.1., и далее осуществлялась их трансформация выделенной плазмидной ДНК, по методике, описанной в п. 2.6.2.. Выросшие на чашке Петри с канамицином клоны *E.coli* анализировались на наличие искомой плазмидной ДНК по п.2.6.3. (ПЦР), с одновременным переносом анализируемых клонов клеток *E.coli* на отдельные чашки Петри с селективной средой.

На электрофореграмме, полученной по п. 2.7.3. (рисунок 15), в результате анализа результатов скрининга нескольких клонов, была выявлена фракция, соответствующая

гибридному гену, что позволило отобрать клон клеток *E.coli* для дальнейшего анализа с использованием методики, описанной в п. 2.7.2..

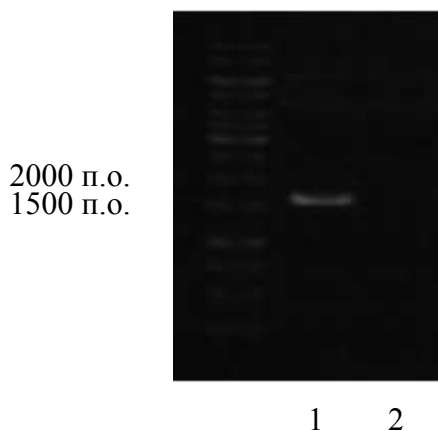


Рисунок 15 - Электрофореграмма фрагмента ДНК, полученного в результате проведения ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмидной ДНК, выделенной из выросшего на селективной среде клона *E.coli* BL21(DE3), 0,8% агарозный гель, 1 – опыт, 2 – отрицательный контроль

Для выделенной из созданного клона клеток *E.coli* BL21(DE3) плазмидной ДНК подтвердилось наличие фрагмента, соответствующего по размеру рассчитанному гибриднему гену (рисунок 15), что говорит о том, что трансформация данных клеток прошла созданной на предыдущем этапе (п.3.1.3.) плазмидной ДНК.

Для того, чтобы удостовериться, что последовательность целевого гена не претерпела изменений, проводилось ее секвенирование согласно методике, описанной в п. 2.7.2., с предварительной обработкой плазмидной ДНК по п. 2.7.1..

С использованием специализированных компьютерных программ, по п. 2.9.2., была сформирована хроматограмма просеквенированной последовательности ДНК для ее визуализации (Приложение 3). Удостоверившись в успешности прохождения реакции, - выявив большую часть последовательности в виде ровных пиков, был осуществлен переход к анализу полученного сиквенса с использованием специализированных компьютерных программ, по п. 2.9.2..

Полученная последовательность нуклеотидов выравнивалась относительно нуклеотидной последовательности, рассчитанной после оптимизации по кодонному составу для экспрессии в клетках *E.coli* (референсной), с использованием программы BioEdit (Приложение 4). Анализ полученного сиквенса выявил соответствие гена, выявленного в плазмидной ДНК, выделенной из полученного клона 1 на основе клеток *E.coli* BL21(DE3), гибриднему гену, рассчитанному с

учетом оптимизации по кодонному составу для экспрессии в клетках *E.coli*, что говорит о об отсутствии мутаций в полученной плазмидной ДНК в анализируемой области.

Клон 1 на основе клеток *E.coli* BL21(DE3) выбран для дальнейшей работы по получению гибридного белка FliCAg85bTb10.4 и изучению его иммуногенных свойств. Таким образом, для получения белка FliCAg85bTb10.4 создан штамм-продуцент *E.coli* BL21(DE3)pET-28a(+)-FliCAg85bTb10.4.. Соответствие полученных результатов ожидаемым было подтверждено. Далее создавались музейные образцы такого клона клеток, по методике, описанной в п. 2.6.6.

3.1.5. Индукция экспрессии гибридного гена

3.1.5.1. Индукция экспрессии гибридного гена ИПТГ

Осуществлялась индукция экспрессии гибридного гена *FliCAg85bTb10.4* по методике, описанной в п. 2.6.4. Анализ экспрессии гена осуществлялся методом диск-электрофореза белков, по п. 2.8.1., в качестве отрицательного контроля использовалась культура клеток, к которым не добавлялся индуктор. Результаты электрофореза в ПААГ приведены на рисунках 16 - 18.

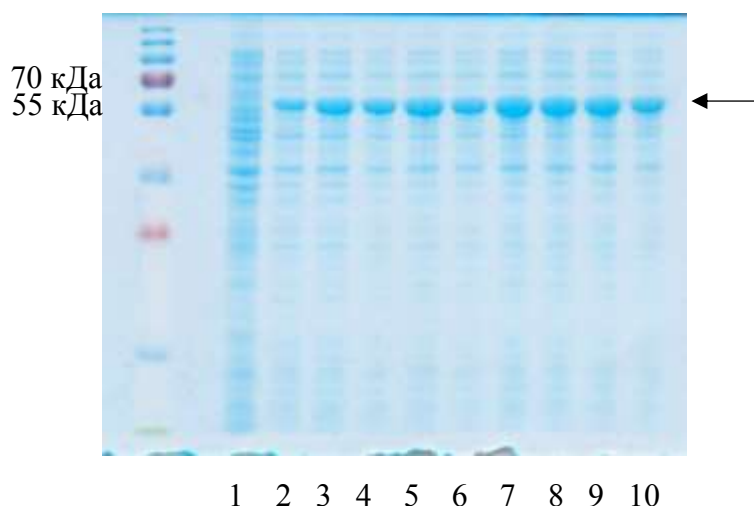


Рисунок 16 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)-FliCAg85bTb10.4 после индукции 1 мМ ИПТГ, 1-до индукции, 2-10 – 1-9 ч после индукции, соответственно

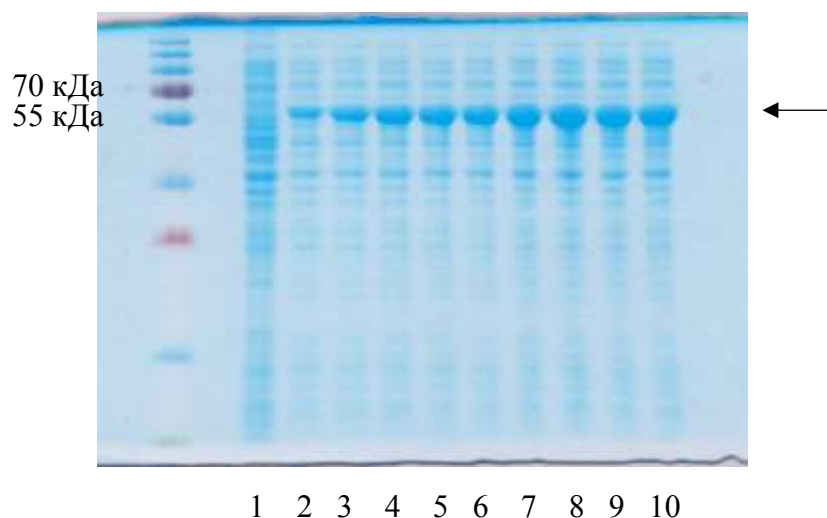


Рисунок 17 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliC*Ag85bTb10.4 после индукции 0,5 мМ ИПТГ при 37°C, 1-до индукции, 2-10 – 1-9 ч после индукции, соответственно

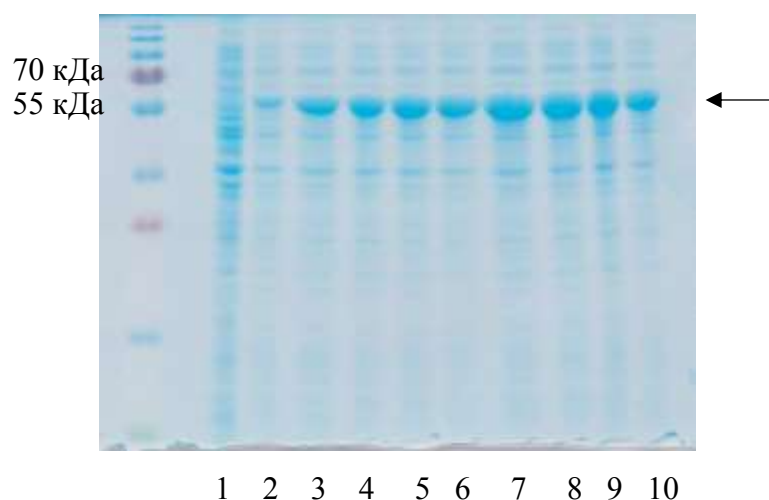


Рисунок 18 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliC*Ag85bTb10.4 после индукции 0,1 мМ ИПТГ, 1-до индукции, 2-10 – 1-9 ч после индукции, соответственно

На рисунках 16-18 представлены электрофореграммы спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliC*Ag85bTb10.4., отобранных каждый час в течение 9 часов после начала индукции экспрессии при 37°C 1, 0,5 и 0,1 мМ ИПТГ, соответственно, целевой белок отмечен символом «стрелка». Из представленных рисунков видно, что после индукции экспрессии (дорожка 2) на электрофореграмме выявляется фракция белка с молекулярной массой около 59,4 кДа, соответствующая целевому рекомбинантному белку. В лизате клеток без индукции экспрессии (дорожка 1) данная фракция белка отсутствует,

что говорит об отсутствии конститутивной экспрессии целевого гена, причем при индукции экспрессии ИПТГ во всех исследованных концентрациях.

Дополнительно было проведено исследование экспрессии целевого гена при температуре 16°C в течение 16 ч (рисунок 19).

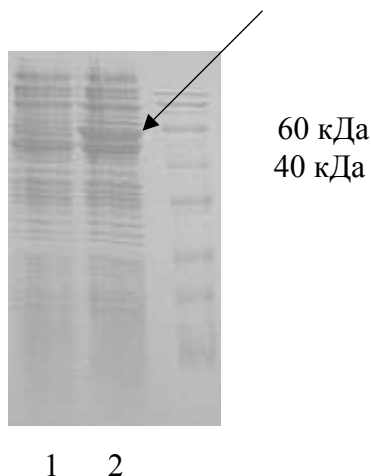


Рисунок 19 - Электрофореграмма фракций белков, полученных из лизатов клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4* после индукции 0,5 мМ ИПТГ при 16°C в течение 16 ч, 1-до индукции, 2 – после индукции, символ «стрелка» указывает на целевой белок

Исходя из рисунка 19, режим индукции 0,5 мМ ИПТГ при 16°C в течение 16 ч также позволяет получить целевой белок.

3.1.5.2. Индукция экспрессии гибридного гена 0,2% лактозой

Осуществлялась индукция экспрессии гибридного гена *FliCAg85bTb10.4* по методике, описанной в п. 2.6.5. Анализ экспрессии гена осуществлялся методом диск-электрофореза белков, по п. 2.8.1., в качестве отрицательного контроля использовалась культура клеток, к которым не добавлялся индуктор. Результаты электрофореза в ПААГ приведены на рисунке 20.

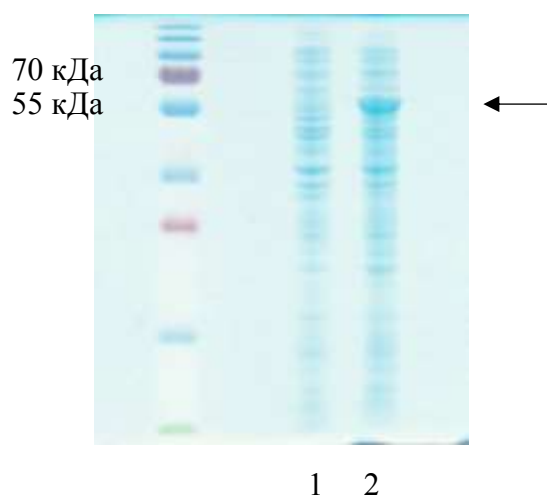


Рисунок 20 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4*. после индукции 0,2% лактозой, 1-до индукции, 2 – после индукции

На рисунке 20 представлена электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4*., отобранных после индукции экспрессии при 37°C 0,2% лактозой по методу Штудиера, символ «стрелка» указывает на целевой белок. Из представленного рисунка видно, что после индукции экспрессии (дорожка 2) на электрофореграмме выявляется фракция с молекулярной массой около 59,4 кДа, соответствующая целевому рекомбинантному белку. В лизате клеток без индукции экспрессии (дорожка 1) данная фракция отсутствует, что говорит об отсутствии конститутивной индукции экспрессии целевого гена исследуемым индуктором.

3.1.6. Анализ уровня экспрессии гибридного гена

Из представленных результатов видно, что синтез целевого рекомбинантного белка происходит при температуре культивирования клеток штамма-производителя и 37°C, и 16°C при индукции экспрессии и ИПТГ, и 0,2% лактозой. Далее оценивался уровень экспрессии целевого гена при исследуемых режимах культивирования.

Полученные электрофореграммы анализировались с использованием программы ImageJ: строились хроматограммы спектра белков анализируемых проб (Приложение 5), на них выявлялась относительная интенсивность бандов, соответствующих гибриднему белку (рисунок 21, а также Приложение 5).



Рисунок 21 - График изменения относительной интенсивности бандов, соответствующих гибриднему белку, в ПААГ в зависимости от длительности индукции ИПТГ

По рисунку 21 видно, что наибольшая относительная интенсивность бандов, соответствующих гибриднему белку, в ПААГ достигается при индукции 1 и 0,1 мМ ИПТГ через 6 ч после добавления индуктора в среду со штаммом-продуцентом, 0,5 мМ ИПТГ – через 7 ч.

Далее осуществлялся расчет процента содержания гибридного белка по отношению к общему клеточному белку при всех исследуемых типах индукции экспрессии. Для этого анализировались полученные с использованием ImageJ хроматограммы: измерялось отношение площади пика, соответствующего гибриднему белку, к площади всех выявленных на хроматограмме пиков, включая указанный пик.

Через 6 ч после начала индукции ИПТГ в концентрации 1 мМ был выявлен уровень экспрессии целевого гена, составляющий 18% от общего клеточного белка, 0,1 мМ – 23%. При индукции экспрессии целевого гена ИПТГ в концентрации 0,5 мМ через 7 ч после добавления индуктора в среду со штаммом-продуцентом был получен уровень экспрессии целевого гена, соответствующий таковому при индукции 0,1 мМ ИПТГ в течение 6 ч. Индукция экспрессии гена в описанных случаях проводилась при 37°C.

При анализе электрофореграмм спектра белков, полученных из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)-FliCAg85bTb10.4. после индукции экспрессии 0,2% лактозой по п. 2.6.5. и ИПТГ в концентрации 0,5 мМ в течение 16 ч при 16°C по п. 2.6.4., было выявлено более низкое содержание целевого белка, по отношению к общему клеточному белку, - 10% и 3%, соответственно, по сравнению с таковым при индукции ИПТГ при 37°C при меньшем времени экспозиции.

Таким образом, самый высокий уровень экспрессии наблюдался при использовании индуктора ИПТГ в концентрации 0,1 мМ, - 23% от общего клеточного белка через 6 ч после начала индукции.

Поскольку, по рисунку 22, высокий уровень экспрессии наблюдался уже через 3 ч после начала индукции, проанализирован выход целевого белка после индукции экспрессии 0,1 мМ ИПТГ при 37°C в это время. При анализе хроматограмм спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4 после описанного вида индукции экспрессии целевого белка, выявлен уровень экспрессии гена *FliCAg85bTb10.4* - 27% от общего клеточного белка, через 3 ч после начала индукции (рисунок 22).

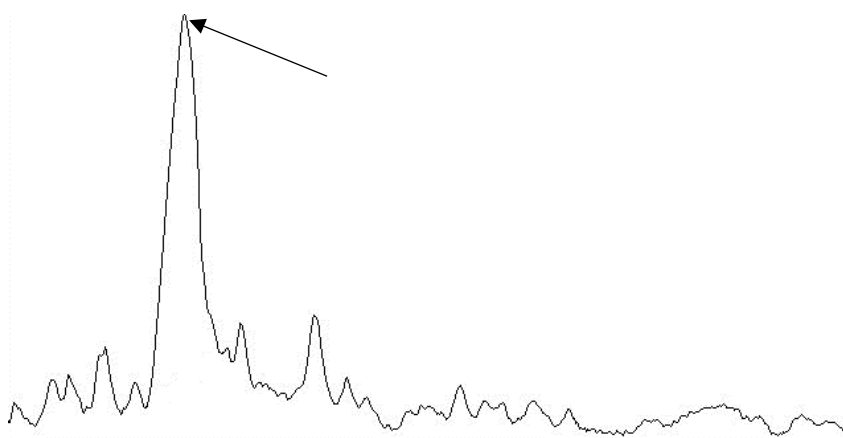


Рисунок 22 - Хроматограмма спектра белков через 3 ч после индукции экспрессии гибридного гена 0,1 мМ ИПТГ при 37°C, построенная с использованием программы ImageJ, стрелкой указан пик, соответствующий белку FliCAg85bTb10.4

Таким образом, выявлен оптимальный режим индукции экспрессии гена *FliCAg85bTb10.4* - 0,1 мМ ИПТГ, температура ферментации 37°C, время – 3 ч. Данный режим позволяет при наименьших затратах, временных и количества реагентов, получить достаточно высокий уровень экспрессии гибридного гена *FliCAg85bTb10.4*.

3.1.7. Исследование растворимости гибридного белка

Для оптимизации условий очистки гибридного была изучена его растворимость, по п. 2.8.2. (рисунки 23 и 24).

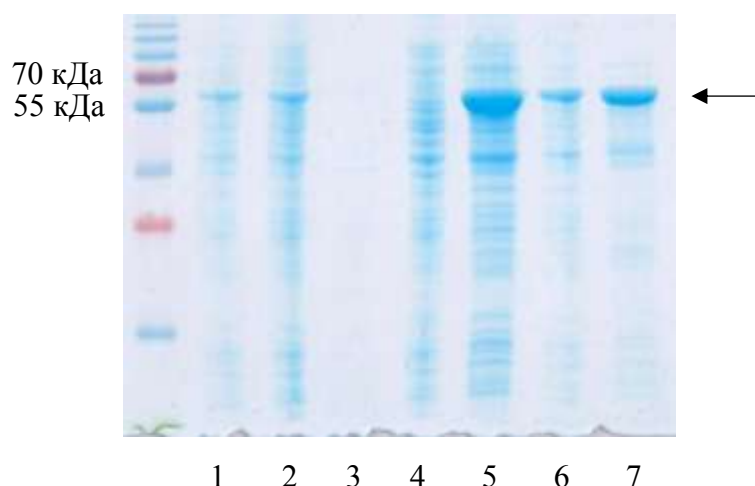


Рисунок 23 - Электрофореграмма спектра белков, полученного после центрифугирования лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4*: 1 - до индукции, 2 – после индукции 0,2% лактозой; после индукции 0,2% лактозой: 3 - супернатант лизата по п. 2.8.2., 4 - осадок лизата по п. 2.8.2.; 5 - после индукции 1 мМ ИПТГ; после индукции 1 мМ ИПТГ: 6 - супернатант лизата по п. 2.8.2., 7 - осадок лизата по п. 2.8.2.

По рисунку 23, при индукции экспрессии целевого гена 0,2% лактозой и последующем анализе растворимости белка *FliCAg85bTb10.4* данный белок не удалось выявить в растворимой (супернатант), либо нерастворимой (осадок - тельца включения) форме. При индукции экспрессии целевого гена 1 мМ ИПТГ и последующем анализе растворимости белка *FliCAg85bTb10.4* данный белок удалось выявить и в растворимой (супернатант), и в нерастворимой (осадок - тельца включения) форме, в последнем случае – в большем количестве.

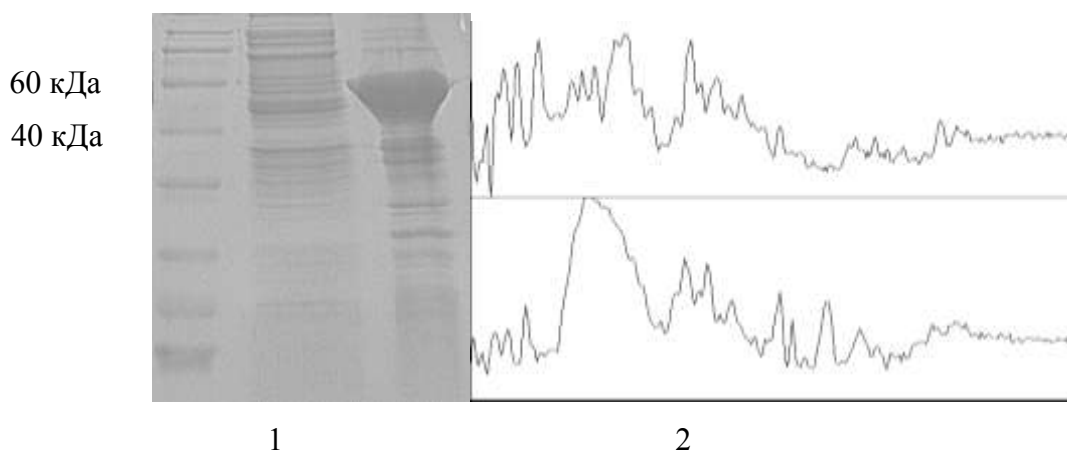


Рисунок 24 - Электрофореграмма (1) и хроматограммы (2) спектра белков, полученного после центрифугирования лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4* после индукции 0,1 мМ ИПТГ при 16°C в течение 16 ч, на 1 слева направо – дорожка 2 - супернатант лизата по п. 2.8.2., дорожка 3 – осадок лизата по п. 2.8.2., на 2 – сверху – фракции белков в супернатанте лизата по п. 2.8.2., снизу - фракции белков в осадке лизата по п. 2.8.2.

По рисунку 24, при индукции экспрессии целевого гена 0,1 мМ ИПТГ при 16°C в течение 16 ч и последующем анализе растворимости белка FliCAg85bTb10.4 данный белок удалось выявить в нерастворимой форме - осадок - тельца включения.

Поскольку при индукции ИПТГ показано, что рекомбинантный белок FliCAg85bTb10.4 локализован в большей степени в нерастворимой форме, то есть в тельцах включения, после разрушения клеток штамма-продуцента ультразвуком, для выделения данного белка использовались тельца включения.

Известно, что часто при гиперэкспрессии чужеродных генов в клетках *E.coli* белки образуют тельца включения. Это, вероятно, происходит вследствие того, что бактерии не успевают произвести правильный фолдинг белка. Изучение растворимости гибридного рекомбинантного белка показало, что он локализован преимущественно в тельцах включения, что позволяет получать его в больших количествах, чем если бы данный белок имел иную растворимость и, соответственно, локализацию.

3.1.8. Нарботка и очистка гибридного белка

Для проведения исследований на лабораторных животных подготавливался гибридный белок. Для этого осуществлялось культивирование штамма-продуцента гибридного белка с индукцией экспрессии 0,1 мМ ИПТГ в течение трех часов, по п. 2.6.4.. По прошествии трех часов отбирались пробы на анализ по п.2.8.1., клетки *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)-FliCAg85bTb10.4 собирались центрифугированием.

Далее осуществлялась очистка гибридного белка по п. 2.8.3. После собирались фракции по 1 мл, анализировались электрофоретически в 12,5% ПААГ по п. 2.8.1., фракции с целевым белком объединялись, концентрация белка в них определялась по методу Бредфорд по п.2.8.5..

Осуществлялась дополнительная очистка гибридного белка с использованием методики, описанной в п. 2.8.4. Результаты анализировались с помощью электрофореза в 12,5% ПААГ по п. 2.8.1., концентрация белка в них определялась по методу Бредфорд.

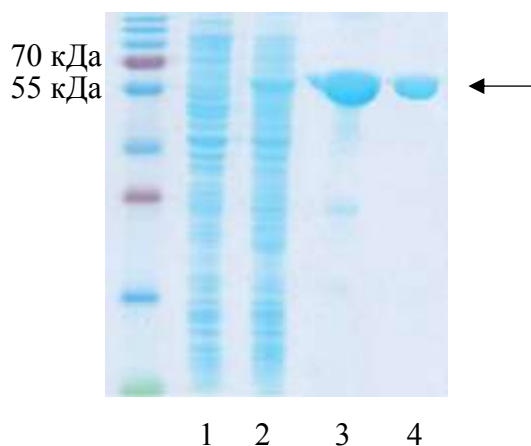


Рисунок 25 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)*FliCAg85bTb10.4*. до (1) и после индукции 0,1 мМ ИПТГ в течение 3 ч (2), а также очищенного по п. 2.8.3 (3) и дополнительно по п. 2.8.4 (4) белка

Белок нарабатывался и очищался многократно, после всех этапов очистки получался раствор гибридного белка в фосфатно-солевом буфере, см. таблицу 3.

Таким образом, получена эффективная экспрессионная система, которая в сочетании с подобранными условиями работы с ней и последующей очистки гибридного белка позволяет добиться высокого выхода белка. Разработанный гибридный белок *FliCAg85bTb10* является новым и нетривиальным, в связи с чем отсутствуют аналоги, и сравнение продуцентов не представляется возможным.

3.2. Получение плазмидных ДНК для исследований на лабораторных животных

3.2.1. Получение генов *ag85a* и *ag85b* *Mycobacterium tuberculosis*

Аминокислотная последовательность белка *Ag85a* *Mycobacterium tuberculosis* была найдена с использованием специализированного сайта *tuberculist*. Была рассчитана последовательность нуклеотидов гена, 1101 п.о., коллинеарная данной аминокислотной последовательности, с одновременной оптимизацией по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих и добавлением фланкирующих ген сайтов рестрикции *NheI* и *HindIII*, а также последовательности Козак до старт-кодона для инициации трансляции и сигнальной

последовательности ТРА для секреции синтезируемого белка из эукариотической клетки, и стоп-кодона, по п. 2.9.2., см. Приложение 6.

Осуществлялись синтез и амплификация рассчитанной последовательности нуклеотидов по п. 2.5.1. Результаты ПЦР анализировались по п. 2.7.3., см. рисунок 26. Далее осуществлялась очистка наработанного ПЦР-фрагмента с использованием методики, описанной в п. 2.7.4.

Аналогичные действия были проведены для белка Ag85b *Mycobacterium tuberculosis* (Приложение 7, а также рисунок 26).

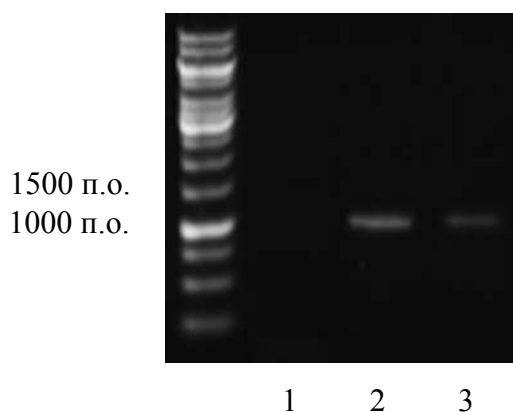


Рисунок 26 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов, кодирующих белки Ag85a (3) и Ag85b (2) *Mycobacterium tuberculosis*, полученных амплификацией синтезированных генов по п.2.5.1, 0,8% агарозный гель, 1 – отрицательный контроль ПЦР

Таким образом, в работе использованы оптимизированные по кодонному составу для организма-продуцента гены, кодирующие белки Ag85A и Ag85B *M. tuberculosis*, с лидерной последовательностью мРНК, содержащей последовательность Козак непосредственно перед стартовым кодоном ATG, а также секреторной последовательностью ТРА (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP_000921.1), оптимизированной по кодонному составу для млекопитающих. Преимущество использования секреторной последовательности ТРА - в обширном предшествующем клиническом опыте, а также в том, что показана высокая производительность в отношении синтеза белка с различных генов-мишеней и секреции.

Кодонная оптимизация проведена для увеличения уровня экспрессии целевого гена за счет увеличения эффективности считывания информации с соответствующей мРНК на рибосомах.

3.2.2. Получение штаммов *E.coli* DH10B/RpcDNA3.1(+)*Ag85a* и DH10B/RpcDNA3.1(+)*Ag85b*

В настоящем исследовании применяется плазмидная ДНК pcDNA3.1(+), для которой продемонстрирована возможность экспрессии клонированных генов, кодирующих белки *Ag85A* и *Ag85B M. tuberculosis* [252].

Осуществлялась рестрикция полученных очищенных ПЦР-фрагментов, а также вектора pcDNA3.1(+) по п.2.1.2., согласно методике, описанной в п. 2.5.2., с использованием рестриктаз, работающих по сайтам *NheI* и *HindIII*. Результаты анализировались с помощью электрофореза в агарозном геле по п. 2.7.3.. Далее полученные фрагменты очищались с использованием препаративного электрофореза по п. 2.7.4. и подвергались лигированию по п. 2.5.3.. Рассчитанная плазмидная ДНК составляет с учетом фрагмента, кодирующего белок *Ag85a*, 6504 п.о., *Ag85b* – 6465 п.о..

Для создания штаммов-продуцентов плазмидных ДНК, кодирующих белки *Ag85a* и *Ag85b M.tuberculosis*, использовались клетки *E.coli* штамма DH10B/R по п.2.2.. Данный штамм, как уже ранее сказано, успешно используется для получения рекомбинантных векторов, в том числе несущих гены *M. tuberculosis* [249]. Подготавливались компетентные клетки по п. 2.6.1., и далее осуществлялась их трансформация полученной лигазной смесью, по методике, описанной в п. 2.6.2.. Выросшие на чашке Петри с ампициллином клоны *E.coli* анализировались на наличие целевой плазмидной ДНК по п.2.6.3., с одновременным переносом анализируемых клонов клеток *E.coli* на отдельные чашки Петри с селективной средой.

Несколько полученных клонов использовались для получения плазмидной ДНК. Нарботка и выделение данной плазмидной ДНК осуществлялись с использованием методики, описанной в п. 2.7.5.. Выделенная плазмидная ДНК подвергалась рестрикционному анализу по п. 2.6.3. и п. 2.5.2. и анализу методом ПЦР по п. 2.5.1., результаты анализировались по п. 2.7.3. (Рис. 27 и 28).

Ожидалось получить при рестрикционном анализе с использованием рестриктазы *NheI* линейаризованные плазмидные ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85a* и pcDNA3.1(+)*Ag85b* размером 6504 п.о. и 6465 п.о., соответственно, рестриктаз *NheI* и *HindIII* – двух фрагментов, фрагмента, кодирующего ген интереса, 1091 п.о. и 1052 п.о., и линейаризованной плазмидной ДНК, 5412 п.о.. При нанесении пробы плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85a* или pcDNA3.1(+)*Ag85b* без воздействия рестриктаз(ы) ожидалось увидеть на электрофореграмме три формы плазмидной ДНК – кольцевую, линейную и суперскрученную.

В результате проведения ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмидных ДНК, выделенных из клонов клеток *E.coli* – потенциальных продуцентов плазмид pcDNA3.1(+)*Ag85a* и pcDNA3.1(+)*Ag85b*, ожидалось получение ПЦР-продуктов размером 1101 п.о. и 1062 п.о..

Соответствие полученных результатов ожидаемым было подтверждено (рисунки 27 и 28).

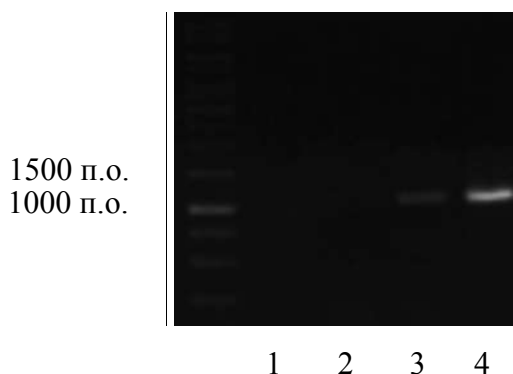


Рисунок 27 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов, кодирующих белки Ag85a (4) и Ag85b (3) *Mycobacterium tuberculosis*, полученных в результате скрининга выросших на селективной среде клонов *E.coli* с использованием ПЦР по п. 2.6.3. и п. 2.5.1., 0,8% агарозный гель, 1,2 – отрицательный контроль ПЦР для Ag85b и Ag85a, соответственно

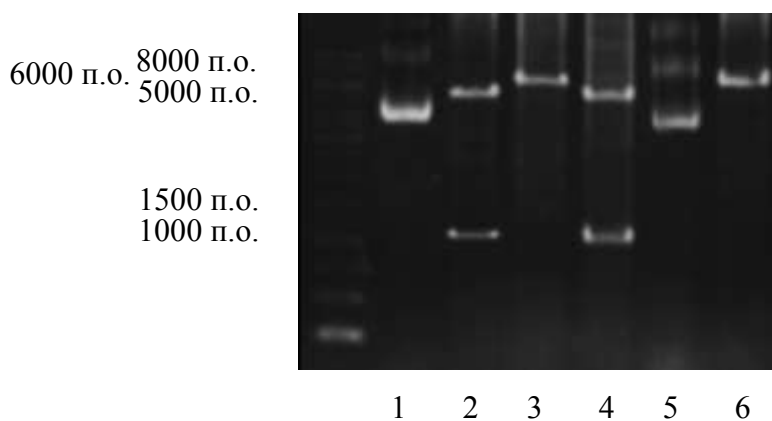


Рисунок 28 - Электрофореграмма плазмидных ДНК pсDNA3.1(+Ag85a (1-3) и pсDNA3.1(+Ag85b (4-6): 3, 6 – расщепленные рестриктазой NheI, 2, 4 – расщепленные рестриктазами NheI и HindIII, 1, 5 – отрицательный контроль (без обработки рестриктазами), 0,8% агарозный гель

Для того, чтобы удостовериться, что последовательности целевых генов не претерпели изменений, проводилось их секвенирование согласно методике, описанной в п. 2.7.2., с предварительной обработкой плазмидной ДНК по п. 2.7.1..

С использованием специализированных компьютерных программ, по п. 2.9.2., сформированы хроматограммы просеквенированных последовательностей ДНК для их визуализации (Приложение 8, 9). Удостоверившись в успешности прохождения реакции, - выявив большую часть последовательности в виде ровных пиков, был осуществлен переход к

анализу полученного сиквенса с использованием специализированных компьютерных программ, по п. 2.9.2..

Полученная последовательность нуклеотидов выравнивалась относительно нуклеотидной последовательности, рассчитанной после оптимизации по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих (референсной), с введенными последовательностью Козак, старт-кодоном, сигнальной последовательностью ТРА, сайтами рестрикции, с использованием программы BioEdit (Приложение 10, 11). Анализ полученных сиквенсов выявил соответствие генов, выявленных в плазмидных ДНК, выделенных из полученного клона 1 на основе клеток *E.coli* DH10B/R, рассчитанным генам, что говорит об отсутствии мутаций в полученных плазмидных ДНК в анализируемых областях.

Клон 1 на основе клеток *E.coli* DH10B/R выбран для дальнейшей работы по получению плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85a*, клон 2 - pcDNA3.1(+)*Ag85b*, и изучению их иммуногенных свойств. Таким образом, для получения плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85a* создан штамм-продуцент *E.coli* DH10B/RpcDNA3.1(+)*Ag85a*, pcDNA3.1(+)*Ag85b* - *E.coli* DH10B/R pcDNA3.1(+)*Ag85b*. Соответствие полученных результатов ожидаемым было подтверждено. Далее создавались музейные образцы таких клонов клеток, по методике, описанной в п. 2.6.6.

Полученные штаммы *E.coli* DH10B/RpcDNA3.1(+)*Ag85a* и DH10B/RpcDNA3.1(+)*Ag85b* использовались для получения соответствующих плазмидных ДНК. Нарботка и выделение данных плазмидных ДНК осуществлялись с использованием методики, описанной в п. 2.7.5..

Концентрация полученных плазмидных ДНК определялась по п. 2.7.6.. Получены водные растворы плазмидных ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85a* и pcDNA3.1(+)*Ag85b* в количестве 5 мл с концентрацией 8,2 мг/мл и 8,7 мг/мл, соответственно (рисунок 28), которые использовались для создания вакцинных кандидатов.

Полученная плазмидная ДНК для доставки гена, кодирующего белок *Ag85A* или *Ag85B*, сочетает в себе такие свойства ДНК-вакцины, как высокий уровень экспрессии целевого гена в клетках млекопитающих, иммуногенность, и такие свойства вектора для генной терапии, как длительность экспрессии гена, например, за счет увеличения стабильности мРНК.

Элементы, обеспечивающие экспрессию гена, обуславливающего устойчивость к антибиотику неомицину, а также репликацию плазмиды в виде эписомы в клетках млекопитающих, не функционируют, поскольку такие клетки – клетки организма введения таких плазмидных ДНК - не содержат большой Т-антиген SV40. Вектор pcDNA3.1(+) не содержит транспозонов, а также элементов, отвечающих за трансмиссивность. Такая ДНК не встраивается в геном и не реплицируется в клетках млекопитающих.

Предпочтительными плазмидными ДНК для использования у человека являются векторы, проверенные на людях, содержащие описанные выше элементы с соответствующими регуляторными последовательностями, что позволяет уменьшить количество требуемых исследований для регистрации средства. Проведено множество клинических исследований ДНК-вакцин [253], на август 2016 года – 414 шт. [254], продемонстрировавших их безопасность [255]. Однако такие вакцины демонстрировали недостаточную иммуногенность, по сравнению с вакцинами на основе белков [255]. Но, учитывая сложность иммунного ответа против микобактерий туберкулеза, использование ДНК-вакцины может быть оправдано за счет профиля и степени индуцируемых иммунных реакций.

3.3. Исследование созданных молекул на лабораторных животных

Вакцины относят к иммунобиологическим лекарственным препаратам [256]. Методы доклинических исследований генно-инженерных вакцин против туберкулеза рассмотрены в главах 17 – 26 Раздела II Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. Миронова А.Н. [257]. Настоящее исследование является предварительным, чтобы оценить целесообразность и направление дальнейшей работы.

Исследование проводилось на мышах двух типов – белых беспородных мышах и мышах линии BALB/c. В данном исследовании животные служат инструментом измерения активности вакцин, и генотип несущественен, вопросы экстраполяции необязательны, поэтому для «биопробы» можно использовать гибриды как линейных животных, так и аутбредных [258].

Известно, что некоторые вакцины защищают от генерализованной инфекции, но не защищают от аэрозольного заражения или заражения через слизистую. Причины таких различий и механизмов защиты для внутриклеточных бактерий в целом остаются малоизученными. Кроме того, какие-либо достоверные и удобные для измерения корреляты эффективности вакцин против внутриклеточных патогенов не выявлены на сегодняшний день [259]. Однако поскольку данное исследование является предварительным, и важно было оценить целесообразность и направление дальнейшей работы, исследовалась эффективность разработанных вакцинных кандидатов для начала в модели, в которой является эффективной БЦЖ, - генерализованного туберкулеза.

Известно, что иммунный ответ против патогенов – это результат взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, а также антител, в особенности для патогенов внутриклеточной локализации [108],

в связи с чем изучение множества показателей и параметров является критичным для создания полной картины активности вакцинного кандидата против туберкулеза.

Для расчета показателей протективности осуществлялась регистрация биометрических показателей внутренних органов, оценивалась их пораженность специфическим процессом, определялось количество КОЕ микобактерий туберкулеза в них, осуществлялась морфологическая оценка срезов легких зараженных животных. Оценивалась иммуногенность созданных вакцинных кандидатов. Иммуногенность – способность создавать состояние иммунитета – устойчивости ко вторичному контакту с антигеном. Также проверялись функционирование доменов гибридного белка и экспрессия гена с используемой плазмидной ДНК.

Проводилась статистическая обработка полученных результатов, и для многих параметров указывался р-уровень значимости. Следует учесть, что P-value не обуславливает вероятность того, что нулевая гипотеза ложна, данный показатель обуславливает вероятность получения данных, по крайней мере настолько далеких, как те, что наблюдались бы, если бы нулевая гипотеза была верна [44].

Работа с животными, инфицируемыми микобактериями туберкулеза, а также планирование и проведение опытов и обработка данных, полученных с использованием таких животных, проводились совместно с лабораторией экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии.

3.3.1. Исследование созданных молекул в модели с использованием *M. tuberculosis*, устойчивых к противотуберкулезным препаратам

Осуществлялось изготовление вакцинных кандидатов смешиванием действующих веществ и компонентов, все указаны в таблице 3 (№ опыта - 1), п. 2.10.1.1..

Производилась иммунизация животных по п. 2.10.1.1. в соответствии с данными, указанными в таблице 3 (№ опыта - 1), двукратная, с интервалом в две недели. В данном исследовании гидроксид алюминия, в форме порошка, в количестве 37 мг добавлялся к 5 мл раствора с концентрацией белка FliCAg85bTb10.4 400 мкг/мл, осуществлялось связывание с белком в течение 10 мин., после чего осуществлялось дальнейшее разведение. Также данный адъювант добавлялся к разведенной БЦЖ (Имурон-вак). В качестве жидкой среды использовался физиологический раствор. Всего каждое животное получало по 40 мкг белка FliCAg85bTb10.4 и/или 100 мкг плазмидных ДНК, по 50 мкг каждой из плазмидных ДНК pcDNA3.1(+)-Ag85a и

pcDNA3.1(+)*Ag85b*. Исследовалось как внутримышечное введение гибридного белка, так и интраназальное.

Через 10 дней после второй иммунизации осуществлялось заражение по п. 2.10.1.1. животных по п. 2.3. и таблице 3 в п. 2.10.1.1. штаммом *M.tuberculosis* по п. 2.2., обладающим множественной лекарственной устойчивостью. Через 5 недель после заражения животные умерщвлялись по п. 2.10.1.1., у них осуществлялся забор легких. Далее оценивались показатели контроля тяжести течения инфекционного процесса по п. 2.10.6. -коэффициенты массы легких, индекс поражения легких и бактериологические показатели.

Результаты данного исследования, полученные через 5 недель после инфицирования, приведены на рисунках 29 - 33.

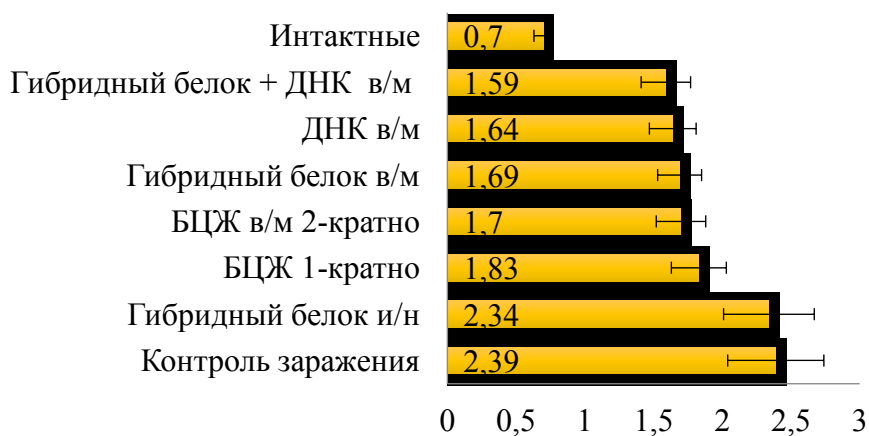


Рисунок 29 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанные по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №1

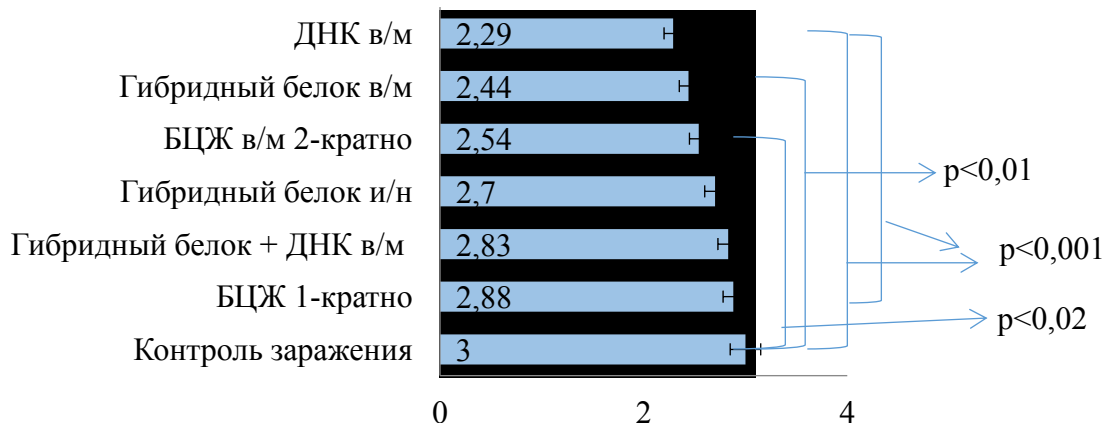


Рисунок 30 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы поражения легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанные по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №1

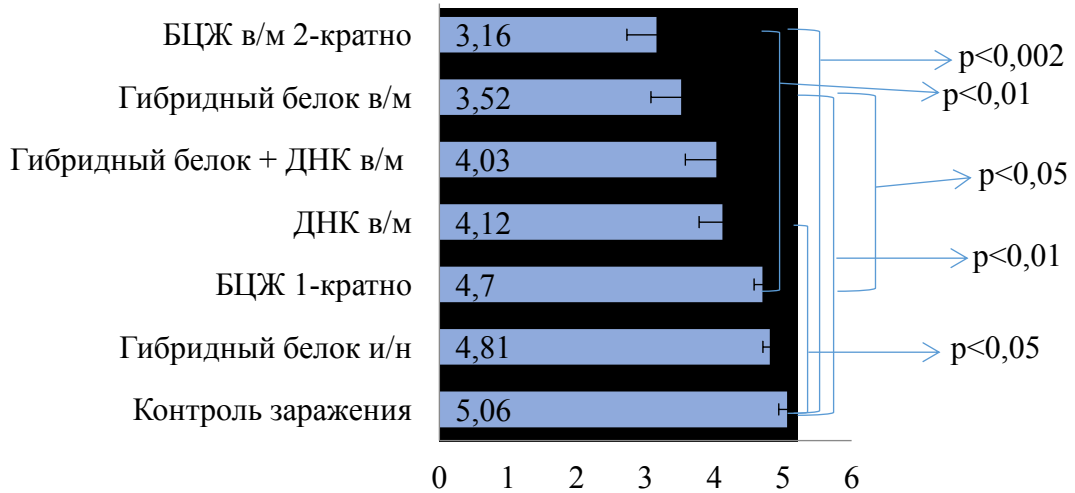


Рисунок 31 - Диаграмма, иллюстрирующая десятичные логарифмы числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №1

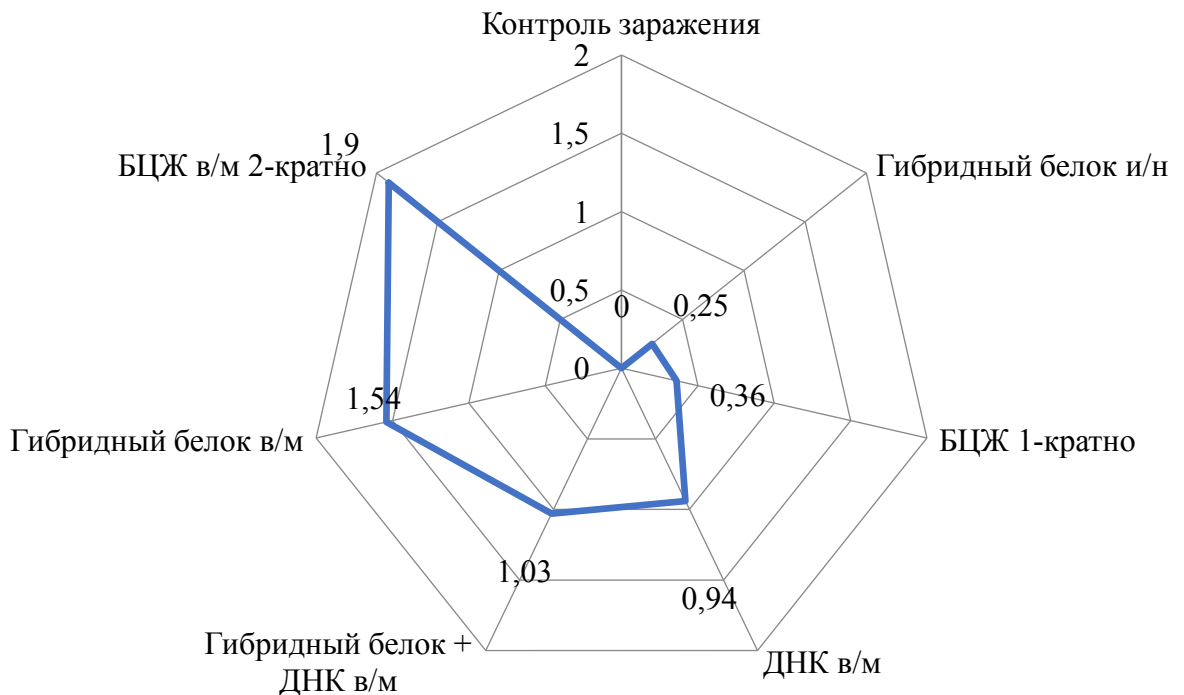


Рисунок 32 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с невакцинированными животными в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №1

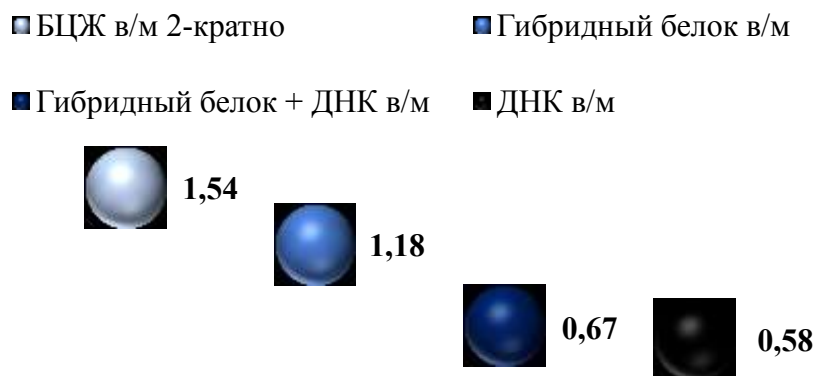


Рисунок 33 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №1

При оценке протективного действия иммунизации кандидатными вакцинами выявлена задержка развития экспериментального туберкулеза. По всем показателям продемонстрирована эффективность всех созданных кандидатных вакцин, по сравнению с контролем заражения.

Самое низкое значение коэффициента массы легких наблюдалось в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей разработанные и полученные гибридный белок и плазмидные ДНК, - он был на 34% ниже, чем группе контроля заражения. Другие созданные кандидатные вакцины также продемонстрировали эффективность, - значение коэффициента массы легких было на 31% ниже, чем в группе контроля заражения, в группе «ДНК в/м», и на 29% ниже в группе «гибридный белок в/м». Видно, что разница в результатах по данному критерию между тремя вариантами созданных кандидатных вакцин составляет всего 2-3%.

Самое низкое значение индекса поражения легких мышей наблюдалось в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей разработанные и полученные плазмидные ДНК pсDNA3.1(+)*ag85a* и pсDNA3.1(+)*ag85b*, - он был на 24% ниже, чем группе контроля заражения. Различия между данными группами считались достоверными, $p < 0,001$. Кандидатная вакцина на основе гибридного белка, вводимого внутримышечно, также продемонстрировала эффективность, - исследуемый коэффициент был на 19% ниже, чем группе контроля заражения, различия между данными группами считались достоверными, $p < 0,01$. Видно, что разница в результатах по данному критерию между созданными кандидатными вакцинами составляет всего 5%. Достоверные различия выявлены также между группами контроля заражения и БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, $p < 0,02$, разница

составила 15%, а также между группами БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «ДНК в/м», $p < 0,001$, разница составила 21%.

При морфологическом исследовании легких мышей таких групп кандидатных вакцин выявляется меньшая распространенность поражения, по сравнению с невакцинированными животными, отсутствует альтернативный компонент специфического воспаления, периваскулярные и перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты более выражены, что свидетельствует об активации местного иммунитета легочной ткани.

Самый низкий десятичный логарифм числа жизнеспособных бактерий в легких мышей наблюдался в группе животных, иммунизированных БЦЖ (Имурон-вак) двукратно в/м, различия с группой «контроль заражения» можно считать достоверными, $p < 0,002$, - он был на 38% ниже, чем группе контроля заражения. Кандидатная вакцина, содержащая разработанный и полученный гибридный белок FlicAg85bTb10, вводимая внутримышечно, также продемонстрировала эффективность по данному показателю, - он оказался меньше на 30%, чем в группе контроля заражения, различия считались достоверными, - $p < 0,01$. Кандидатные вакцины «гибридный белок + ДНК в/м» и «ДНК в/м» также продемонстрировали эффективность по данному показателю, - он оказался меньше на 20% и 19%, соответственно, чем в группе «контроль заражения», различия во втором случае считались достоверными, - $p < 0,05$. Достоверные различия выявлены также между группами БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «гибридный белок в/м», $p < 0,05$ и БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, $p < 0,01$.

Положительный эффект всех кандидатных вакцин, кроме таковой, содержащей гибридный белок, вводимой интраназально, продемонстрирован также по показателям индекса защиты легких мышей, по сравнению с невакцинированными животными, а также животными, иммунизированными БЦЖ по стандартной методике. Самый высокий индекс защиты легких мышей в обоих случаях наблюдался в группе животных, двукратно иммунизированных БЦЖ (Имурон-вак) внутримышечно, 1,9 lg КОЕ и 1,54 lg КОЕ, соответственно, среди кандидатных вакцин - кандидатной вакциной, содержащей разработанный и полученный гибридный белок FliCAg85bTb10, вводимой внутримышечно, 1,54 lg КОЕ и 1,18 lg КОЕ, соответственно. Стоит отметить, что по показателю «индекс защиты легких мышей, по сравнению с невакцинированными животными» вакцина БЦЖ, введенная по стандартной схеме, не продемонстрировала положительный эффект по задержке роста микобактерий, - данный показатель оказался 0,36 lg КОЕ.

Показано, что интраназальная двукратная иммунизация полученным гибридным белком позволила получить картину, несколько лучшую, чем без использования какой-либо иммунизации («контроль заражения»), по показателю «индекс защиты легких» мышей, однако данный вариант не обеспечил положительный эффект по задержке роста микобактерий, по

сравнению с невакцинированными животными, 0,25 Ig КОЕ микобактерий (менее 0,5 Ig), и, соответственно, провакцинированными БЦЖ по стандартной методике.

Также установлено, что двукратная иммунизация вакциной БЦЖ (Имурон-вак) внутримышечно обеспечивает большую степень защиты, чем однократная иммунизация БЦЖ по стандартной методике, что продемонстрировано по всем исследуемым показателям. Более того, по показателям высеваемости микобактерий из легких мышей, по десятичному логарифму числа жизнеспособных бактерий и, соответственно, индексам защиты по сравнению с невакцинированными животными и БЦЖ, введенной по стандартной методике, данный вариант вакцинации оказался наиболее эффективным, обеспечивая меньшую высеваемость патогена из тканей легких, по сравнению с исследуемыми кандидатными вакцинами по п. 2.10.1.1..

Таким образом, в модели туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью для исследуемых кандидатных вакцин продемонстрирован протективный потенциал, причем в случае кандидатных вакцин, вводимых внутримышечно, больший, по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике.

3.3.2. Исследование созданных молекул в модели с использованием *M. tuberculosis*, чувствительных к противотуберкулезным препаратам

3.3.2.1. Исследование протективности по показателям тяжести течения туберкулеза, опыт №2

Осуществлялось изготовление вакцинных кандидатов смешиванием компонентов, указанных в таблице 3 (№ опыта - 2), по п. 2.10.1.1, осуществлялась иммунизация животных по п. 2.10.1.1. в соответствии с данными, указанными в таблице 3 (№ опыта - 2) двукратная, с интервалом в 15 дней. В данном исследовании гидроксид алюминия, в форме порошка, в количестве 18,5 мг добавлялся к 2,5 мл раствора с концентрацией белка FliCAg85bTb10.4 400 мкг/мл, осуществлялось связывание с белком в течение 10 мин., после чего осуществлялось дальнейшее разведение. Также данный адъювант добавлялся к разведенной БЦЖ (Имурон-вак). В качестве жидкой среды использовался физиологический раствор. Всего каждое животное получало по 40 мкг белка FliCAg85bTb10.4 и(или) 71,6(86) мкг плазмидных ДНК, по 35,8(43) мкг каждой из плазмидных ДНК pсDNA3.1(+Ag85a и pсDNA3.1(+Ag85b. Исследовалось как внутримышечное введение гибридного белка, так и интраназальное.

Через две недели после второй иммунизации осуществлялось заражение по п. 2.10.1.1. животных по п. 2.3. и таблице 3 в п. 2.10.1.1. штаммом *M.tuberculosis Erdman* по п. 2.2., не обладающим устойчивостью к противотуберкулезным препаратам. Через 6 недель и 1 день после

заражения животные умерщвлялись по п. 2.10.1.1., у них осуществлялся забор легких. Далее оценивались показатели контроля тяжести течения инфекционного процесса по п. 2.10.6. - коэффициенты массы легких, индекс поражения легких и бактериологические показатели.

Результаты данного исследования, полученные через 6 недель и 1 день после инфицирования, приведены на рисунках 34 - 38.

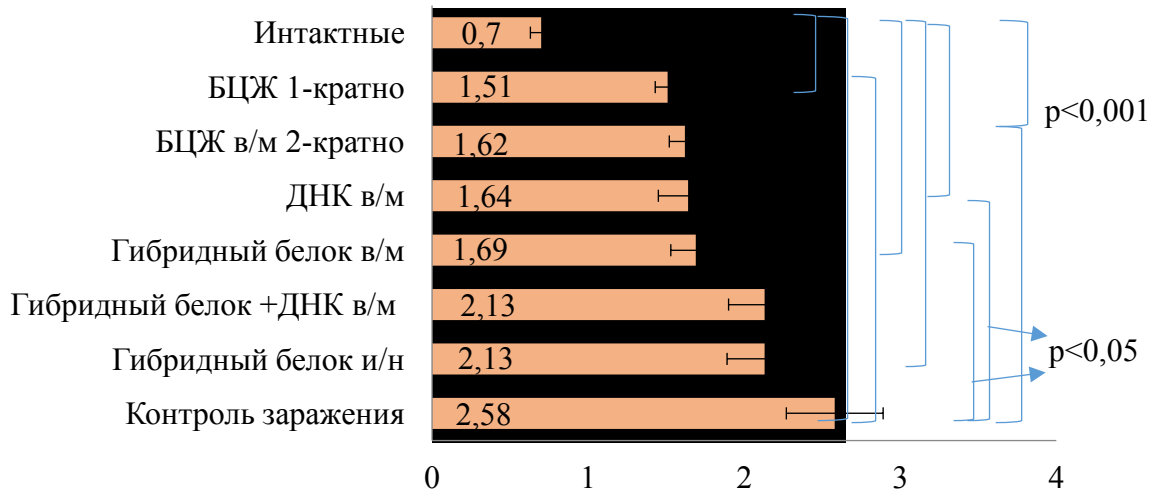


Рисунок 34 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10. 1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6, опыт №2

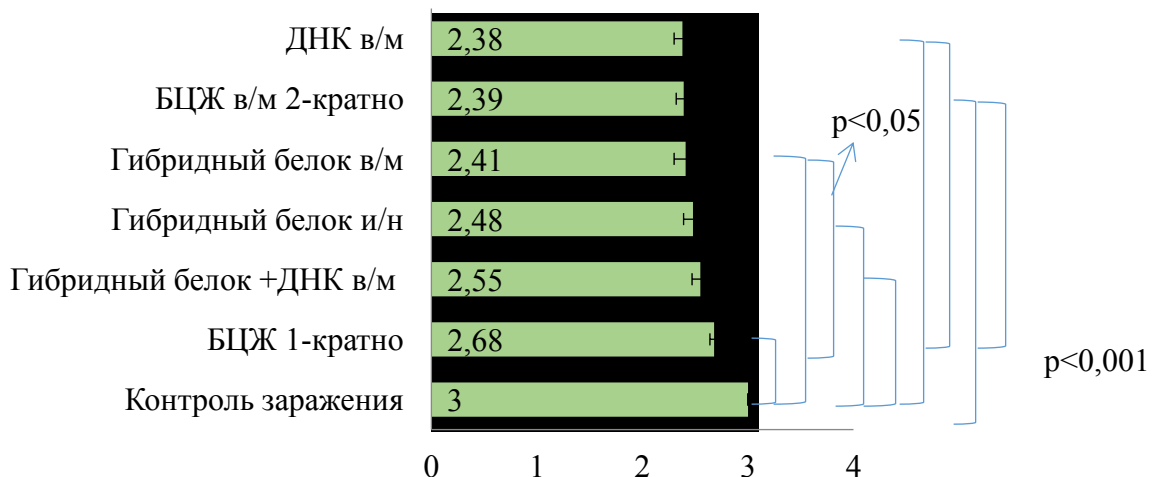


Рисунок 35 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы поражения легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №2

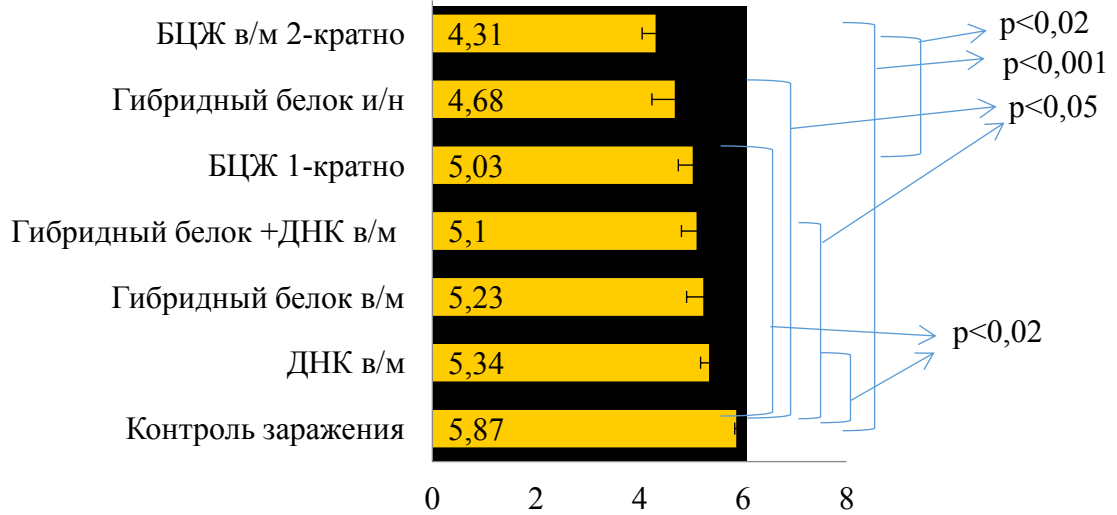


Рисунок 36 - Диаграмма, иллюстрирующая десятичные логарифмы числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №2

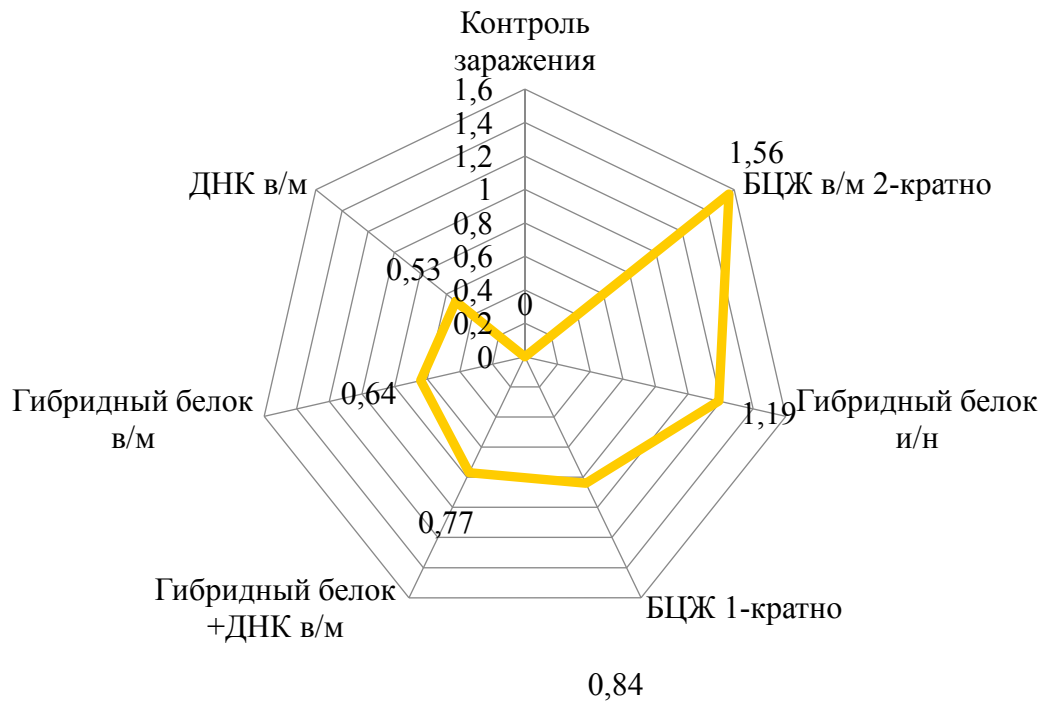


Рисунок 37 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с невакцинированными животными в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №2



Рисунок 38 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №2

При оценке протективного действия иммунизации кандидатными вакцинами в опыте №2 выявлена задержка развития экспериментального туберкулеза. По всем показателям продемонстрирована эффективность всех созданных кандидатных вакцин, по сравнению с контролем заражения.

Самое низкое значение коэффициента массы легких наблюдалось в группах животных, иммунизированных БЦЖ, - согласно стандартной методике - ниже на 42%, двукратно внутримышечно (Имурон-вак), - ниже на 37%, чем таковой в группе контроля заражения, различия считались достоверными, $p < 0,001$. Среди исследуемых кандидатных вакцин самое низкое значение коэффициента массы легких наблюдалось в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей разработанные и полученные плазмидные ДНК, - ниже на 36%, чем таковой в группе контроля заражения, а также в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей гибридный белок, вводимой в/м, - ниже на 35%; различия считались достоверными, $p < 0,05$. В группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей гибридный белок и ДНК, вводимой внутримышечно, и таковой, содержащей гибридный белок, вводимой интраназально, наблюдался одинаковый коэффициент массы легких мышей, - ниже на 17%, чем таковой в группе контроля заражения. Достоверные различия также выявлены между группами «интактные животные» и всеми остальными группами животных, кроме группы «гибридный белок + ДНК в/м», везде $p < 0,001$.

Самое низкое значение индекса поражения легких мышей наблюдалось в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей разработанные и полученные плазмидные ДНК pcDNA3.1(+)*ag85a* и pcDNA3.1(+)*ag85b*, - ниже на 21%, чем

такового в группе контроля заражения. Данное значение оказалось на 1% выше, чем группе «ДНК в/м», в группе БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м (20%), и группе «гибридный белок в/м» (20%). Еще на 3% меньше оказалась разница между группой «контроль заражения» и «гибридный белок и/н» (17%), на 5% - и «гибридный белок + ДНК в/м» (15%). Различия между группой «контроль заражения» и каждой из вышеперечисленных групп считались достоверными, $p < 0,001$. Достоверные различия также выявлены между группами БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «ДНК в/м», и БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, и «ДНК в/м», везде $p < 0,001$, и «гибридный белок в/м», $p < 0,05$.

Самый низкий десятичный логарифм числа жизнеспособных бактерий в легких мышей наблюдался в группе животных, иммунизированных БЦЖ (Имурон-вак) двукратно внутримышечно, - ниже на 27%, чем таковой в группе контроля заражения, различия считались достоверными, $p < 0,001$; среди разработанных кандидатных вакцин - в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей разработанный и полученный гибридный белок FliCAg85bTb10, вводимой интраназально, - ниже на 20%, чем таковой в группе контроля заражения, различия считались достоверными, $p < 0,05$, данный показатель - ниже, чем в группе животных, иммунизированных БЦЖ по стандартной методике, - ниже на 14%, чем таковой в группе контроля заражения, различия считались достоверными, $p < 0,02$. Всего на 1% данный показатель оказался выше в группе «гибридный белок + ДНК в/м» (13%), различия считались достоверными, $p < 0,05$, и на 2% - в группе «гибридный белок в/м» (11%). Достоверные различия выявлены также между группами «контроль заражения» и «ДНК в/м», $p < 0,02$, БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, и БЦЖ, введенная по стандартной схеме, $p < 0,02$.

Положительный эффект всех исследованных кандидатных вакцин продемонстрирован также по показателю «индекс защиты легких» мышей (более 0,5 lg), по сравнению с невакцинированными животными. По сравнению с животными, иммунизированными БЦЖ по стандартной методике, кандидатная вакцина на основе гибридного белка, вводимая интраназально, продемонстрировала большую эффективность, - индекс защиты, 0,35 lg КОЕ, превышал таковой, полученный в сравниваемой группе. Самый высокий индекс защиты в обоих случаях наблюдался в группе животных, иммунизированных БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации внутримышечно, - 1,56 lg КОЕ и 0,72 lg КОЕ, соответственно.

Также установлено, что двукратная иммунизация вакциной БЦЖ (Имурон-вак) внутримышечно обеспечивает большую степень защиты, чем однократная иммунизация БЦЖ по стандартной методике, что продемонстрировано по всем исследуемым показателям, кроме коэффициента массы легких мышей. Более того, по показателям высеваемости микобактерий из легких мышей, по десятичному логарифму числа жизнеспособных бактерий и индексам защиты по сравнению с невакцинированными животными и БЦЖ, введенной по стандартной методике,

данный вариант вакцинации оказался наиболее эффективным, обеспечивая меньшую высеваемость патогена из тканей легких, по сравнению с другими исследуемыми кандидатными вакцинами по п. 2.10.1.1..

Таким образом, в модели туберкулеза, вызванного бактериями с отсутствующей лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, - чувствительными, - исследуемые кандидатные вакцины продемонстрировали протективный потенциал, причем в случае кандидатных вакцин, на основе гибридного белка, вводимого интраназально и плазмидных ДНК, вводимых внутримышечно, по ряду показателей больший, по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике.

3.3.2.2. Исследование протективности по показателям тяжести течения туберкулеза, опыт №3

Осуществлялось изготовление вакцинных кандидатов смешиванием компонентов, указанных в таблице 3 (№ опыта - 3), по п. 2.10.1.1, осуществлялась иммунизация животных по п. 2.10.1.1. в соответствии с данными, указанными в таблице 3 (№ опыта - 3) двукратная, с интервалом в две недели. В данном исследовании гидроксид алюминия, в форме порошка, добавлялся к раствору белка, а также БЦЖ (Имурон-вак). В качестве жидкой среды использовался PBS. Всего каждое животное получало по 20 мкг белка FliCAg85bTb10.4 и/или 50 мкг плазмидных ДНК, по 25 мкг каждой из плазмидных ДНК pсDNA3.1(+)*Ag85a* и pсDNA3.1(+)*Ag85b*. Исследовалось внутримышечное введение вакцинных кандидатов.

Через две недели после второй иммунизации осуществлялось заражение по п. 2.10.1.1. животных по п. 2.3. и таблице 3 в п. 2.10.1.1. штаммом *M.tuberculosis Erdman* по п. 2.2., не обладающим устойчивостью к противотуберкулезным препаратам. Через 4 недели и 5 дней после заражения животные умерщвлялись по п. 2.10.1.1., у них осуществлялся забор легких и селезенки. Далее оценивались летальность и показатели контроля тяжести течения инфекционного процесса по п. 2.10.6. - коэффициенты массы легких и селезенки, индекс поражения легких и бактериологические показатели, а также показатели фагоцитоза.

Результаты данного исследования, полученные через 4 недели и 5 дней после инфицирования, приведены на Рис. 39 - 44.

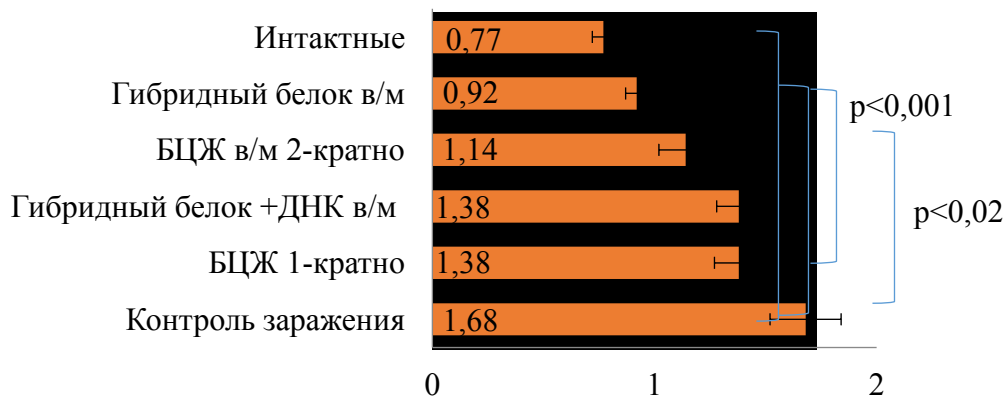


Рисунок 39 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6, опыт №3



Рисунок 40 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы поражения легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №3

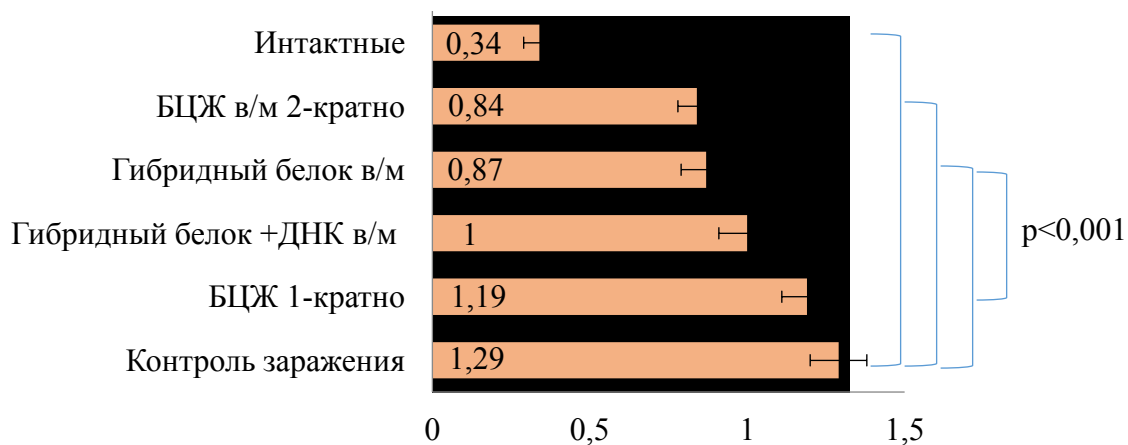


Рисунок 41 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы селезенки мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6, опыт №3

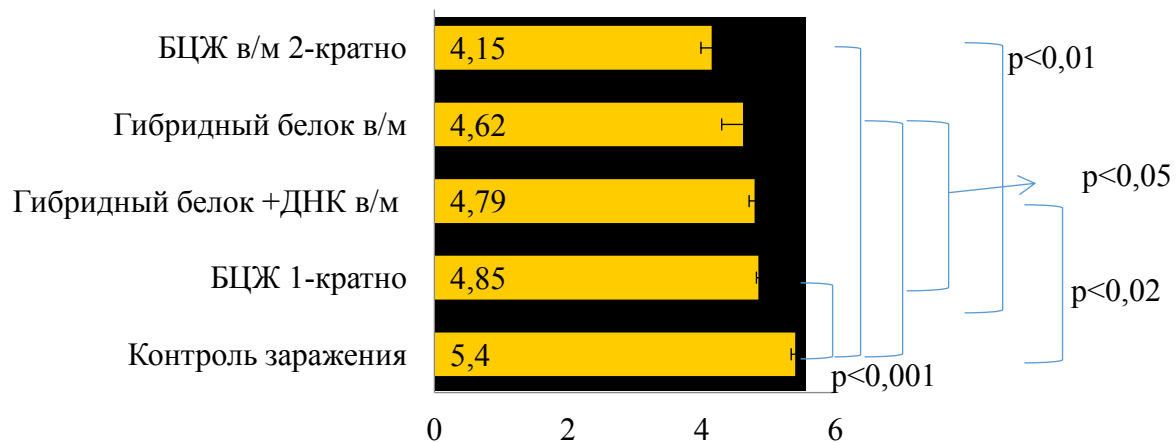


Рисунок 42 - Диаграмма, иллюстрирующая десятичные логарифмы числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №3

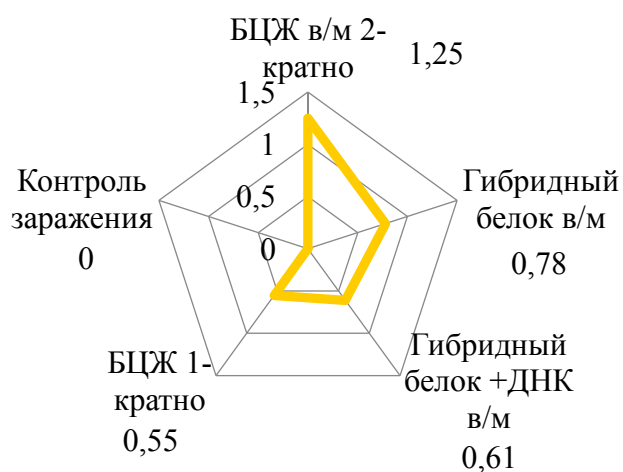


Рисунок 43 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с невакцинированными животными в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №3

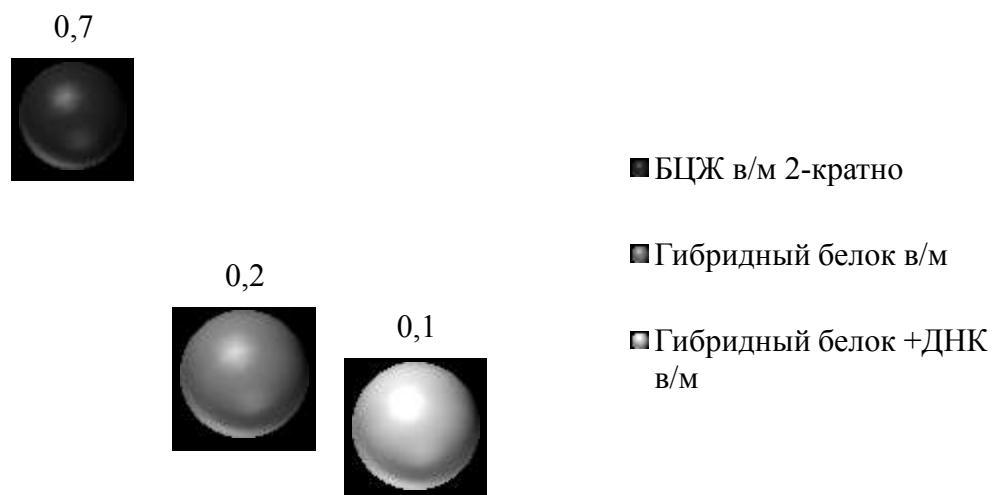


Рисунок 44 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №3

Летальность от туберкулеза составила 25% от исходного количества мышей в группе «контроль заражения», а также 5,9% - в группе БЦЖ, вводимой по стандартной методике. В группах животных, проиммунизированных кандидатными вакцинами, все животные выжили на дату окончания эксперимента.

При оценке протективного действия иммунизации кандидатными вакцинами в опыте №3 выявлена задержка развития экспериментального туберкулеза. По всем исследуемым показателям кандидатные вакцины продемонстрировали большую эффективность, чем БЦЖ, введенная по стандартной схеме.

Самое низкое значение коэффициента массы легких наблюдалось в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей разработанный и полученный гибридный белок, вводимой внутримышечно. В данной группе показатель был на 45% ниже, чем в группе контроля заражения. Результаты, полученные по группам БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и смесь гибридного белка с ДНК, в/м, оказались одинаковыми, - исследуемый показатель оказался на 18% ниже, чем в группе «контроль заражения». Таким образом, выявлено превосходство в 2,5 раза группы «гибридный белок в/м», по сравнению с группой БЦЖ, введенной по стандартной схеме, по коэффициенту массы легких. Достоверные различия выявлены между группами «контроль заражения» и «интактные животные», и «гибридный белок в/м», везде $p < 0,001$, и БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, $p < 0,02$. Достоверные различия также выявлены между группами БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «гибридный белок в/м».

По остальным исследуемым показателям наилучший результат наблюдался в группе животных, проиммунизированных двукратно БЦЖ (Имурон-вак) в/м, причем следующей по эффективности оказывалась кандидатная вакцина, содержащая разработанный и полученный гибридный белок FliC_{Ag85bTb10}, вводимая внутримышечно. Кандидатная вакцина, содержащая, помимо гибридного белка, плазмидные ДНК, демонстрировала показатели, не намного уступающие таковым группы «гибридный белок в/м».

Индекс поражения легких мышей в группе «гибридный белок в/м» оказался на 32% ниже, чем в группе «контроль заражения», причем эта величина всего на 2% больше, чем таковая в группе БЦЖ (Имурон-вак) (34%), и на 1% меньше, чем в группе «гибридный белок + ДНК в/м» (31%). Достоверные различия выявлены между группами «контроль заражения» и всеми остальными группами животных, кроме «БЦЖ 1-кратно», а также между группами БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «гибридный белок в/м», и БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, везде $p < 0,001$.

Коэффициент массы селезенок в группе «гибридный белок в/м» оказался на 33% ниже, чем в группе «контроль заражения», причем эта величина всего на 2% больше, чем таковая в группе БЦЖ (Имурон-вак) (35%) и на 10% меньше, чем таковая в группе «гибридный белок + ДНК в/м» (23%). Достоверные различия выявлены между группами «контроль заражения» и группами БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, и «гибридный белок в/м», и «интактные животные», а также между группами БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «гибридный белок в/м», везде $p < 0,001$.

Десятичный логарифм числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в группе «гибридный белок в/м» оказался на 14% ниже, причем эта величина всего на 3% меньше, чем таковая в группе «гибридный белок + ДНК в/м» (11%); в группе БЦЖ (Имурон-вак) – на 23%, чем в группе «контроль заражения». Достоверные различия выявлены между группами «контроль заражения» и всеми остальными исследованными группами, кроме группы БЦЖ, вводимой по стандартной методике, $p < 0,02$ в случае сравнения с группой «гибридный белок + ДНК в/м» и $p < 0,001$ во всех остальных случаях. Также достоверные различия выявлены между группами БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «гибридный белок в/м», $p < 0,05$, и БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, $p < 0,01$.

Положительный эффект всех исследованных кандидатных вакцин продемонстрирован также по показателю «индекс защиты легких» мышей (более 0,5 lg), по сравнению с невакцинированными животными. По сравнению с животными, иммунизированными БЦЖ по стандартной методике, все кандидатные вакцины также продемонстрировали большую эффективность, - индекс защиты превышал таковой, полученный в сравниваемой группе. Самый высокий индекс защиты в обоих случаях наблюдался в группе животных, иммунизированных

БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации внутримышечно. В группах «гибридный белок в/м» и «гибридный белок + ДНК в/м» разница между полученными значениями данных двух показателей была незначительной – 13% и 15%, соответственно.

Также установлено, что двукратная иммунизация вакциной БЦЖ (Имурон-вак), разведенной PBS, с добавлением гидроксида алюминия, внутримышечно обеспечивает большую степень защиты, чем однократная иммунизация БЦЖ по стандартной методике, что продемонстрировано по всем исследуемым показателям.

Таким образом, в модели туберкулеза, вызванного бактериями с отсутствующей лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, - чувствительными, - все исследуемые кандидатные вакцины продемонстрировали протективный потенциал, причем по всем показателям больший, по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике.

3.3.2.3. Исследование фагоцитоза в культуре перитонеальных макрофагов, опыт №3

Выделялись перитонеальные макрофаги по п.2.10.6., оценивались показатели фагоцитоза по п.2.10.7. Полученные результаты приведены на рисунках 45 - 48.

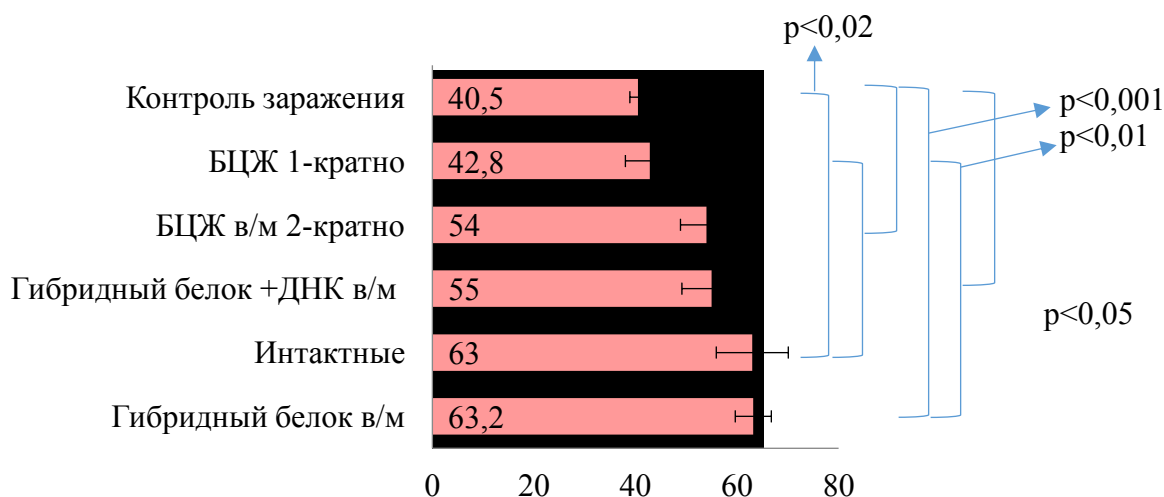


Рисунок 45 - Диаграмма, иллюстрирующая фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (%), исследованную по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3

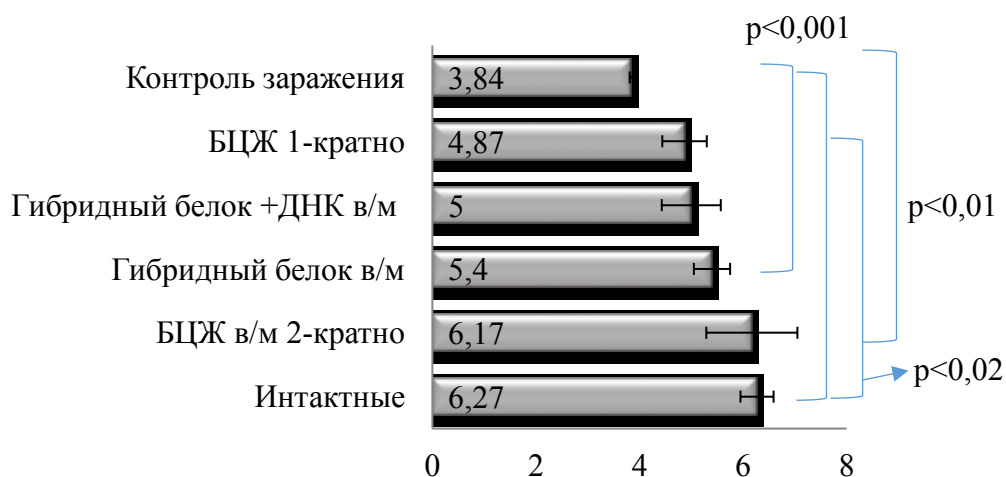


Рисунок 46 - Диаграмма, иллюстрирующая фагоцитарное число, исследованное по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3

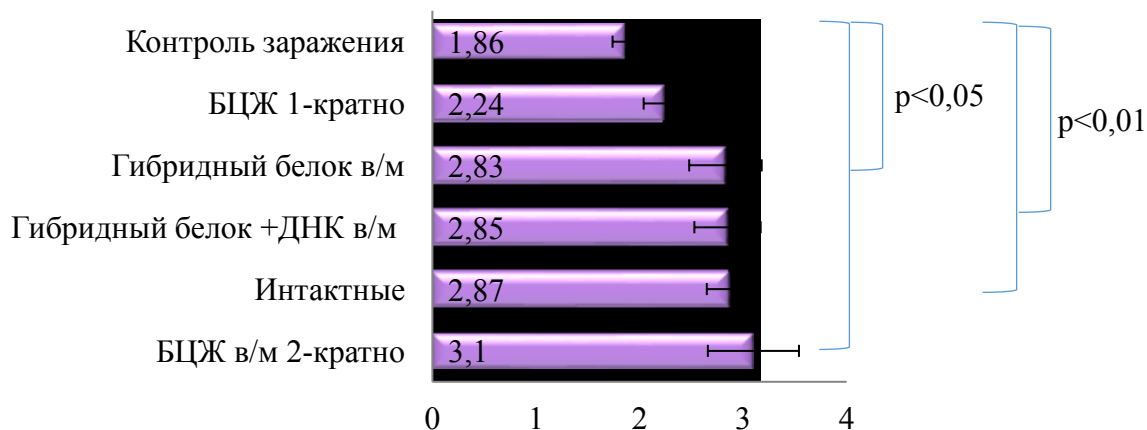


Рисунок 47 - Диаграмма, иллюстрирующая индекс завершенности фагоцитоза (усл. ед.), исследованный по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3

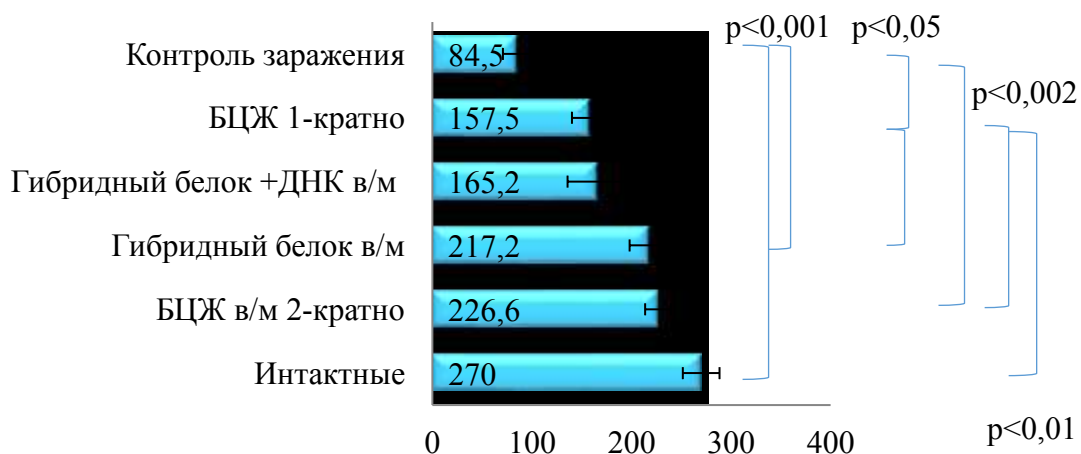


Рисунок 48 - Диаграмма, иллюстрирующая показатель завершенности фагоцитоза, исследованный по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3

Самое большое значение показателя «фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов (%)» выявлено в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей разработанный и полученный гибридный белок, вводимой внутримышечно. В данной группе показатель был на 36% выше, чем в группе контроля заражения. Данный показатель оказался немного выше, чем таковой в группе интактных животных, разница составила менее 1%. Различия считались достоверными между каждой из данных двух групп и группой контроля заражения, везде $p < 0,001$. Значение данного показателя оказалось больше, чем в группе БЦЖ, введенной по стандартной методике, на 32%. При этом различия между данными группами считались достоверными, $p < 0,01$. Различия между группами «контроль заражения» и всеми остальными группами, кроме группы «БЦЖ 1-кратно», считались достоверными. Результаты, полученные по группам «гибридный белок + ДНК в/м», и БЦЖ (Имурон-вак), введенная двукратно внутримышечно, оказались сходными, - значение исследуемого показателя оказалось на 26% и 25%, соответственно, меньше, чем в группе «контроль заражения», различия между каждой из данных двух групп и группой контроля заражения считались достоверными, $p < 0,05$ и $p < 0,001$, соответственно. Достоверные различия выявлены и между группами «контроль заражения» и «интактные животные», $p < 0,02$, и БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «интактные животные», $p < 0,05$.

По остальным исследуемым показателям наилучший результат наблюдался в группе животных, проиммунизированных двукратно БЦЖ (Имурон-вак) в/м, причем следующей по эффективности оказывалась одна из исследуемых кандидатных вакцин, чаще - содержащая разработанный и полученный гибридный белок FliCAg85bTb10, вводимая внутримышечно.

Значение показателя «фагоцитарное число» в группе «гибридный белок в/м» оказалось на 29% больше, чем в группе «контроль заражения», причем эта величина всего на 5% больше, чем таковая в группе «гибридный белок + ДНК в/м» (на 23% выше, чем в группе «контроль заражения»). Различия между группами «контроль заражения» и «гибридный белок в/м» и «интактные животные» считались достоверными, везде $p < 0,001$, и БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, $p < 0,01$. Достоверные различия также выявлены между группами БЦЖ, введенная по стандартной схеме, и «интактные животные», $p < 0,02$.

Индекс завершенности фагоцитоза в группе «гибридный белок + ДНК в/м» оказался на 35% выше, чем в группе «контроль заражения», причем эта величина всего на 1% больше, чем таковая в группе «гибридный белок в/м» (на 34% выше, чем в группе «контроль заражения»). При этом данный индекс в группе БЦЖ, введенной внутримышечно двукратно, оказался выше такового в группе «контроль заражения» на 40%. Выявленные различия считались достоверными - между группами «контроль заражения» и группами БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной

иммунизации в/м, и «гибридный белок в/м», везде $p < 0,05$, и «интактные животные», и «гибридный белок + ДНК в/м», везде $p < 0,01$.

Показатель завершенности фагоцитоза в группе «гибридный белок в/м» оказался в 2,6 раз выше, чем в группе «контроль заражения», различия считались достоверными, $p < 0,001$, причем эта величина всего на 0,1 меньше, чем таковая в группе БЦЖ (Имурон-вак), - в 2,7 раз, различия считались достоверными, $p < 0,002$, в группе «гибридный белок + ДНК в/м» – в 2 раза. Также достоверными считались различия между группами БЦЖ, вводимой по стандартной методике, и «гибридный белок в/м», $p < 0,05$, и БЦЖ (Имурон-вак) при двукратной иммунизации в/м, а также «интактные животные», везде $p < 0,01$.

Также установлено, что двукратная иммунизация вакциной БЦЖ (Имурон-вак), разведенной PBS, с добавлением гидроксида алюминия, внутримышечно обеспечивает большую степень защиты, чем однократная иммунизация БЦЖ по стандартной методике, что продемонстрировано по всем исследуемым показателям.

При использовании гибридного белка достоверно увеличивалась поглотительная активность макрофагов, выражаемая фагоцитарной активностью (ФА) и фагоцитарным числом, на 35% ($p < 0,001$) и переваривающая, выражаемая показателем (ПЗФ) и индексом завершенности фагоцитоза, на 60% ($p < 0,001$), по сравнению с контролем заражения. При использовании гибридного белка совместно с ДНК достоверно увеличивалась поглотительная активность макрофагов на 26% ($p < 0,001$), по сравнению с контролем заражения. Таким образом, выявлено стимулирующее действие исследованных вакцинных кандидатов на фагоцитоз перитонеальных макрофагов в модели с использованием чувствительного к ПТП штамма микобактерий (Рисунок 49).

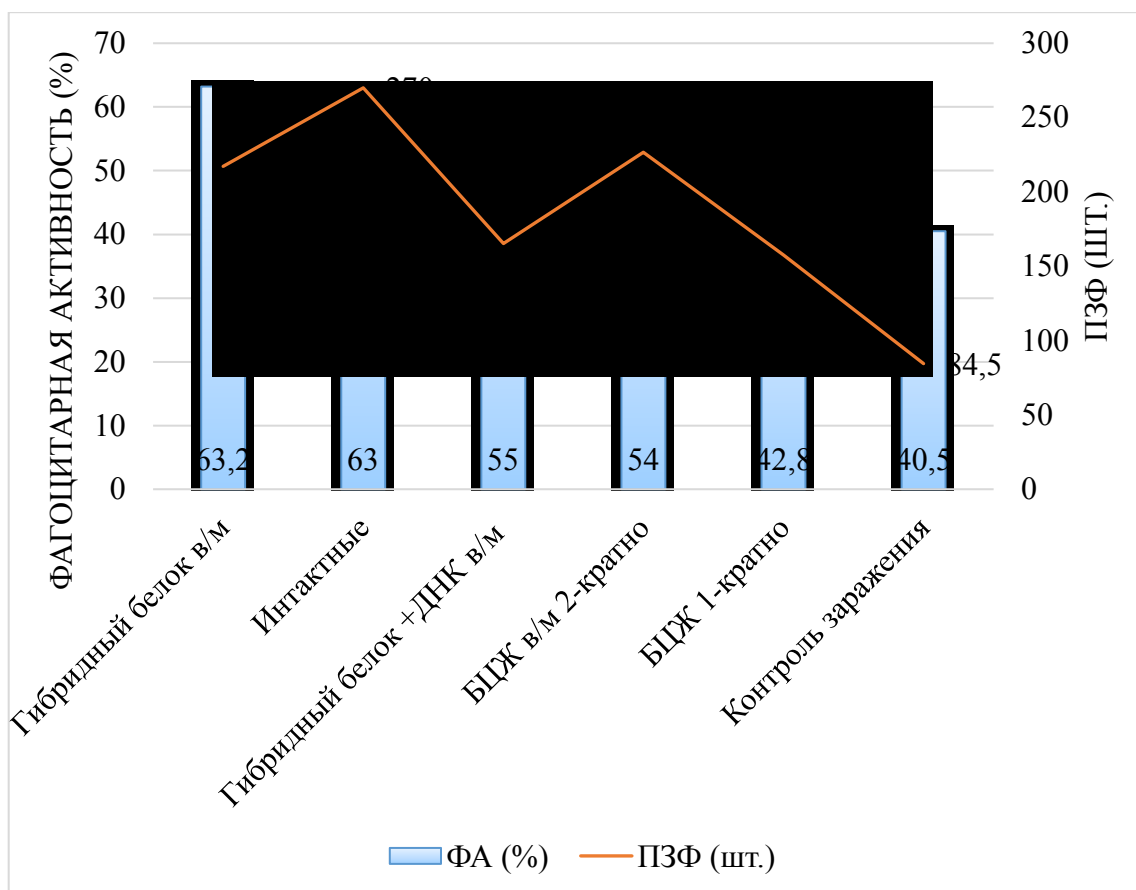


Рисунок 49 - Диаграмма, иллюстрирующая фагоцитарную активность и показатель завершенности фагоцитоза, исследованные по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3

Таким образом, в модели туберкулеза, вызванного бактериями с отсутствующей лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, - чувствительными, - по показателям фагоцитоза в культуре перитонеальных макрофагов все исследуемые кандидатные вакцины продемонстрировали протективный потенциал, причем по всем показателям больший, по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике.

3.3.2.4. Исследование Т-лимфоцитов, опыт №3

Выделялись спленоциты белых беспородных мышей исследованных групп животных по п.2.10.2, затем поверхностные антигены и внутриклеточные цитокины окрашивались по п. 2.10.3.. Подготовленные клетки анализировались с использованием проточной цитофлуориметрии по п.2.10.4.. Полученные результаты приведены на рисунках 50 и 51. В

качестве отрицательного контроля к клеткам вносили среду RPMI, в качестве положительного контроля – стафилококковый энтеротоксин В.

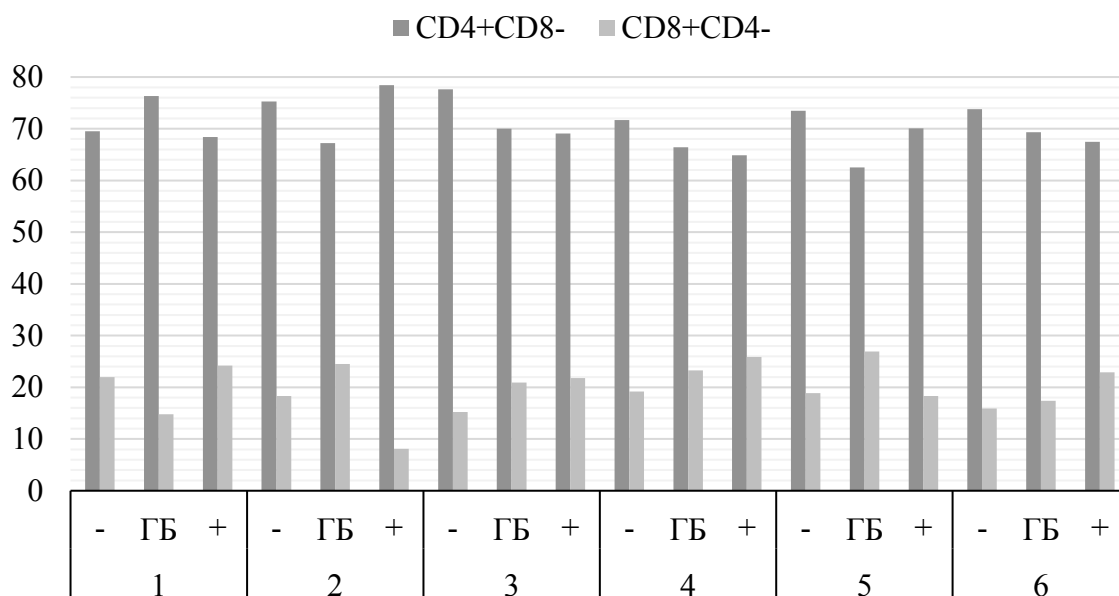


Рисунок 50 - Диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп, вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов; - отрицательный контроль, ГБ – стимуляция гибридным белком FliCAg85bTb10.4 в концентрации 40 мкг/мл, + положительный контроль, 1 – «интактные животные», 2 – «контроль заражения», 3 – «БЦЖ 1-кратно», 4 – «БЦЖ 2-кратно в/м», 5 – «гибридный белок в/м», 6 – «гибридный белок + ДНК в/м»

Анализ субпопуляционной структуры лимфоцитов исследуемых мышей выявил следующее.

В отсутствии стимуляции во всех группах количество CD4+ Т-лимфоцитов было больше, а CD8+ Т-лимфоцитов – меньше, чем у интактных животных, однако при стимуляции гибридным белком, в отличие от группы интактных животных, во всех остальных группах количество CD4+ Т-лимфоцитов уменьшалось, а CD8+ Т-лимфоцитов – увеличивалось. В отсутствии стимуляции среди групп, кроме интактных животных, самое малое количество CD4+ Т-лимфоцитов наблюдалось в группе животных, иммунизированных БЦЖ 2-кратно внутримышечно, далее - гибридным белком в/м, далее - гибридным белком и ДНК в/м, далее – «контроль заражения», далее – БЦЖ, введенной по стандартной методике. В тех же группах наблюдался тот же порядок распределения групп по количеству CD8+ Т-лимфоцитов, от самого большого к меньшему, соответственно, с разницей лишь в очередности групп «гибридный белок + ДНК в/м» и «контроль заражения».

При стимуляции гибридным белком FliCAg85bTb10.4 в концентрации 40 мкг/мл среди всех групп, по сравнению с интактными животными (самое большое значение), самое малое количество CD4+ Т-лимфоцитов наблюдалось в группе животных, иммунизированных гибридным белком в/м, далее - БЦЖ 2-кратно внутримышечно, далее – «контроль заражения», далее - гибридным белком и ДНК в/м, далее – БЦЖ, введенной по стандартной методике. В тех же группах наблюдался тот же порядок распределения групп по количеству CD8+ Т-лимфоцитов, от самого большого к меньшему, соответственно, с разницей лишь в очередности групп «БЦЖ 2-кратно внутримышечно» и «контроль заражения», а также «гибридный белок + ДНК в/м» и БЦЖ, введенной по стандартной методике.

При стимуляции SEB количество CD8+ Т-лимфоцитов было больше такового группы интактных животных только в группе «БЦЖ 2-кратно в/м», далее порядок групп по уменьшению количества таких лимфоцитов - следующий: «гибридный белок + ДНК в/м», «БЦЖ 1-кратно», «гибридный белок в/м», «контроль заражения». При стимуляции SEB количество CD4+ Т-лимфоцитов было меньше такового группы интактных животных только в группах «гибридный белок + ДНК в/м» и «БЦЖ 2-кратно в/м», по убывающей, в остальных группах - больше, по возрастающей, в группах «БЦЖ 1-кратно», «гибридный белок в/м», «контроль заражения».

По внеклеточным антигенам Т-лимфоцитов CD3, CD4 и CD8 выявлено, что во всех группах количество Т-хелперов превышало количество CD8+ Т-лимфоцитов, как минимум, в два раза.

Без стимуляции минимальное различие наблюдалось в группе «интактные животные» - наблюдалось превышение в 3,2 раза; в группе «БЦЖ 2-кратно в/м» – в 3,7 раз, в группе «гибридный белок в/м» – в 3,9 раза, в группе «контроль заражения» – в 4,1 раза. В группах «гибридный белок + ДНК в/м», а также «БЦЖ 1-кратно» наблюдалась самая большая разница – в 4,6 и 5,1 раз, соответственно.

При стимуляции гибридным белком FliCAg85bTb10.4 минимальное различие наблюдалось в группе «гибридный белок в/м» – наблюдалось превышение в 2,3 раза; в группе «контроль заражения» – в 2,7 раз, «БЦЖ 2-кратно в/м» – в 2,9 раз, в группе «БЦЖ 1-кратно» – в 3,4 раза. В группах «гибридный белок + ДНК в/м», а также «интактные животные» наблюдалась самая большая разница – в 4 и 5,2 раз, соответственно.

При стимуляции стафилококковым энтеротоксином В минимальное различие наблюдалось в группе «БЦЖ 2-кратно в/м» - превышение в 2,5 раз; в группе «интактные животные» – в 2,8 раз, в группе «гибридный белок + ДНК в/м» – в 2,9 раз, в группе «БЦЖ 1-кратно» - в 3,2 раза, в группе «гибридный белок в/м» – в 3,8 раз. Самая большая разница наблюдалась в группе «контроль заражения» – в 9,7 раз.

При стимуляции гибридным белком, по сравнению с отсутствием стимуляции, количество Т-хелперов увеличилось, в 1,6 раз, только в группе «интактные животные». В остальных группах при стимуляции гибридным белком превалирование Т-хелперов становилось меньше, чем при отсутствии стимуляции, причем самая большая разница наблюдалась в группе «гибридный белок в/м», - на 40%. На 34% становилось меньше превалирование Т-хелперов в группе «БЦЖ 1-кратно» и на 33% - в группе «контроль заражения».

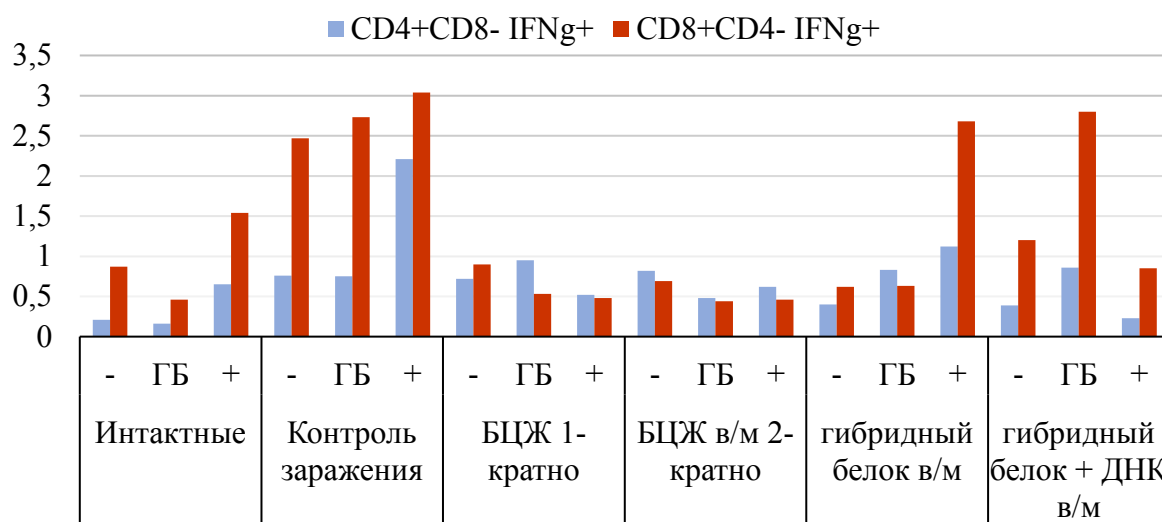


Рисунок 51 - Диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп, вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма; - отрицательный контроль, ГБ – стимуляция гибридным белком FliCAg85bTb10.4 в концентрации 40 мкг/мл, + положительный контроль, 1 – «интактные животные», 2 – «контроль заражения», 3 – «БЦЖ 1-кратно», 4 – «БЦЖ 2-кратно в/м», 5 – «гибридный белок в/м», 6 – «гибридный белок + ДНК в/м»

В отсутствии стимуляции и при стимуляции гибридным белком во всех группах количество CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих $IFN\gamma$, было больше, чем у интактных животных, при стимуляции SEB – кроме групп «БЦЖ 1-кратно», «БЦЖ 2-кратно в/м» и «гибридный белок + ДНК в/м».

В отсутствии стимуляции количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих $IFN\gamma$, было больше, чем у интактных животных, во всех группах, кроме групп «БЦЖ 2-кратно в/м» и «гибридный белок в/м», где наблюдалась обратная ситуация. При стимуляции гибридным белком количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих $IFN\gamma$, было больше, чем у интактных животных, во всех группах, кроме группы «БЦЖ 2-кратно в/м», при стимуляции SEB - кроме групп также «БЦЖ 1-кратно», «БЦЖ 2-кратно в/м» и «гибридный белок + ДНК в/м».

В отсутствии стимуляции среди групп, кроме интактных животных, самое малое количество CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдалось в группе животных, иммунизированных гибридным белком и ДНК в/м, далее – гибридным белком в/м, далее - БЦЖ, введенной по стандартной методике, далее – «контроль заражения», далее – «БЦЖ 2-кратно внутримышечно». В отсутствии стимуляции среди всех групп самое малое количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдалось в группе животных, иммунизированных гибридным белком в/м, далее – БЦЖ 2-кратно внутримышечно, далее – «интактные животные», далее - БЦЖ, введенной по стандартной методике, далее – гибридным белком и ДНК в/м, далее – «контроль заражения».

При стимуляции гибридным белком количество CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, увеличивалось, по сравнению с отсутствием стимуляции, в отличие от остальных групп, в группах «БЦЖ 1-кратно» и «гибридный белок в/м», а таких CD8+ Т-лимфоцитов – в группах «гибридный белок в/м», «контроль заражения» и «гибридный белок + ДНК в/м», по нарастающей.

При стимуляции гибридным белком FliCAg85bTb10.4 в концентрации 40 мкг/мл среди всех групп, по сравнению с интактными животными (самое малое значение), самое малое количество CD4+ Т-лимфоцитов наблюдалось в группе животных, иммунизированных БЦЖ 2-кратно внутримышечно, далее – «контроль заражения», далее - гибридным белком в/м, далее - гибридным белком и ДНК в/м, далее – БЦЖ, введенной по стандартной методике. Среди всех групп самое малое количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдалось в группе животных, иммунизированных БЦЖ 2-кратно внутримышечно, далее – «интактные животные», далее - БЦЖ, введенной по стандартной методике, далее – гибридным белком в/м, далее – «контроль заражения», далее - гибридным белком и ДНК в/м.

При стимуляции SEB количество и CD4+, и CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, увеличивалось, в отличие от остальных групп, в группах контроль заражения, «интактные животные» и «гибридный белок в/м», по нарастающей.

При стимуляции SEB количество CD8+ Т-лимфоцитов было наименьшим в группе «БЦЖ 2-кратно в/м», далее порядок групп по увеличению количества таких лимфоцитов - следующий: «БЦЖ 1-кратно», «гибридный белок + ДНК в/м», «интактные животные», «гибридный белок в/м», «контроль заражения». При стимуляции SEB количество CD4+ Т-лимфоцитов было меньше такового группы интактных животных, по возрастанию, в группах «гибридный белок + ДНК в/м», «БЦЖ 1-кратно» и «БЦЖ 2-кратно в/м», в группах «гибридный белок в/м», «контроль заражения» - больше, по возрастающей.

По внутриклеточному антигену Т-лимфоцитов IFN γ выявлено, что в группах «интактные животные», «контроль заражения» и «гибридный белок + ДНК в/м» количество CD8+ Т-

лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество Т-хелперов, синтезирующих интерферон гамма, причем, как минимум, на 27%.

В группе «БЦЖ в/м 2-кратно» количество Т-хелперов, синтезирующих IFN γ , превышало количество CD8 $^+$ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , на 8-26%, в зависимости от того, чем осуществлялась стимуляция клеток.

В группе «БЦЖ 1-кратно» количество Т-хелперов превышало количество CD8 $^+$ Т-лимфоцитов при стимуляции стафилококковым энтеротоксином В и гибридным белком, на 8 и 44%, соответственно, однако при отсутствии стимуляции количество CD8 $^+$ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , превалировало, на 20%.

В группе «гибридный белок в/м» количество Т-хелперов, синтезирующих IFN γ , превышало количество CD8 $^+$ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , при стимуляции гибридным белком, на 24%, при стимуляции же стафилококковым энтеротоксином В и без стимуляции было выявлено большее количество CD8 $^+$ Т-лимфоцитов, чем Т-хелперов, синтезирующих IFN γ , в 2,4 раза и на 39%, соответственно.

Превалирование CD8 $^+$ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , над такими Т-хелперами при стимуляции гибридным белком FliC_{Ag85bTb10.4}, по сравнению с отсутствием стимуляции, увеличивалось в группах «гибридный белок + ДНК в/м», «контроль заражения», «БЦЖ 2-кратно в/м» на 6%, 8% и 11%, соответственно. Данный показатель уменьшался в остальных группах, в 2,2 раза в группе «БЦЖ 1-кратно», в 2 раза в группе «гибридный белок в/м» и на 31% в группе «интактные животные».

Количество CD8 $^+$ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких CD4 $^+$ Т-лимфоцитов без стимуляции во всех группах, кроме группы «БЦЖ 2-кратно внутримышечно», последовательность по убывающей – «интактные животные», «контроль заражения», «гибридный белок + ДНК в/м», «гибридный белок в/м», «БЦЖ 1-кратно»; при стимуляции гибридным белком - в группах «контроль заражения», «гибридный белок + ДНК в/м», «интактные животные», по убывающей; при стимуляции SEB - в группах «гибридный белок + ДНК в/м», «гибридный белок в/м», «интактные животные».

Количество CD4 $^+$ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких CD8 $^+$ Т-лимфоцитов без стимуляции в группе БЦЖ, вводимой 2-кратно внутримышечно, при стимуляции гибридным белком - в группах, «БЦЖ 1-кратно», «гибридный белок в/м», «БЦЖ 2-кратно внутримышечно», по убывающей; при стимуляции SEB - в обеих группах БЦЖ, в большей степени – вводимой 2-кратно внутримышечно.

3.3.2.5. Исследование протективности по показателям тяжести течения туберкулеза, опыт №4

Осуществлялось изготовление вакцинных кандидатов смешиванием компонентов, указанных в таблице 3 (№ опыта - 4), по п. 2.10.1.1, осуществлялась иммунизация животных по п. 2.10.1.1. в соответствии с данными, указанными в таблице 3 (№ опыта - 4) двукратная, с интервалом в две недели. Дополнительно были добавлены три группы: «белок ТВ10.4 внутримышечно двукратно», «белок ТВ10.4 + CRM197 внутримышечно двукратно» и «белок ТВ10.4 внутримышечно двукратно + IL-7 п/к 7-кратно до первой иммунизации». Каждая из данных кандидатных вакцин содержала гидроксид алюминия, в качестве растворителя использовался физиологический раствор. Одна доза кандидатной вакцины содержала 20 мкг белка в объеме 200 мкл: либо 20 мкг ТВ10.4, либо 10 мкг ТВ10.4 и 10 мкг CRM197.

Через две недели после второй иммунизации осуществлялось заражение по п. 2.10.1.1. животных по п. 2.3. и таблице 3 в п. 2.10.1.1. штаммом *M.tuberculosis Erdman* по п. 2.2., не обладающим устойчивостью к противотуберкулезным препаратам. Через 6 недель после заражения животные умерщвлялись по п. 2.10.1.1., у них осуществлялся забор легких и селезенки. Далее оценивались показатели контроля тяжести течения инфекционного процесса по п. 2.10.6. - коэффициенты массы легких, селезенки, индекс поражения легких и бактериологические показатели.

Результаты данного исследования, полученные через 6 недель после инфицирования, приведены на рисунках 52 - 57.

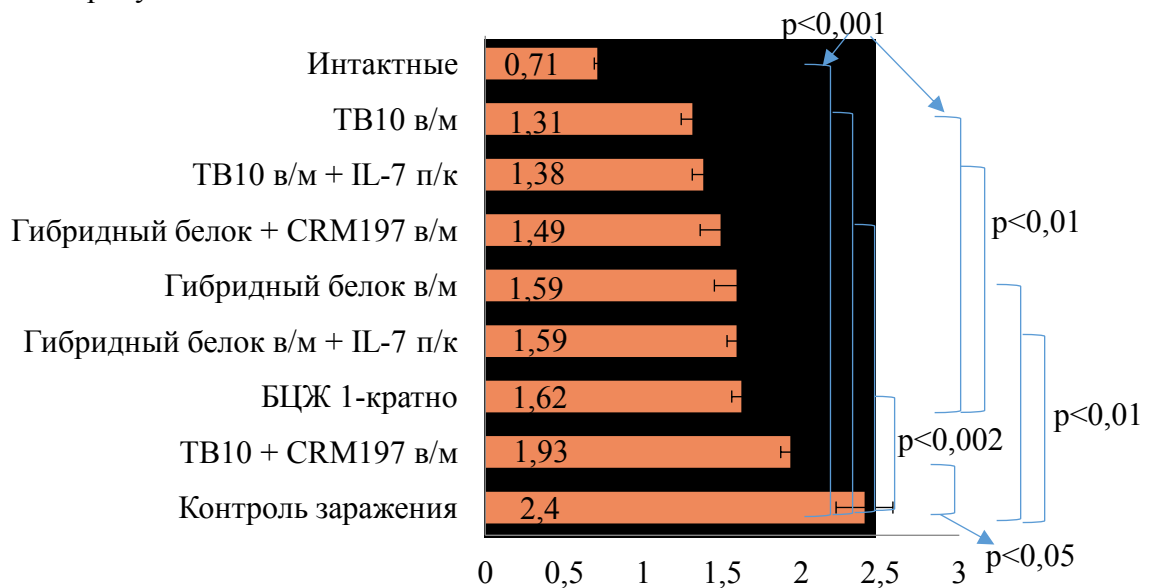


Рисунок 52 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициент массы легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6, опыт №4

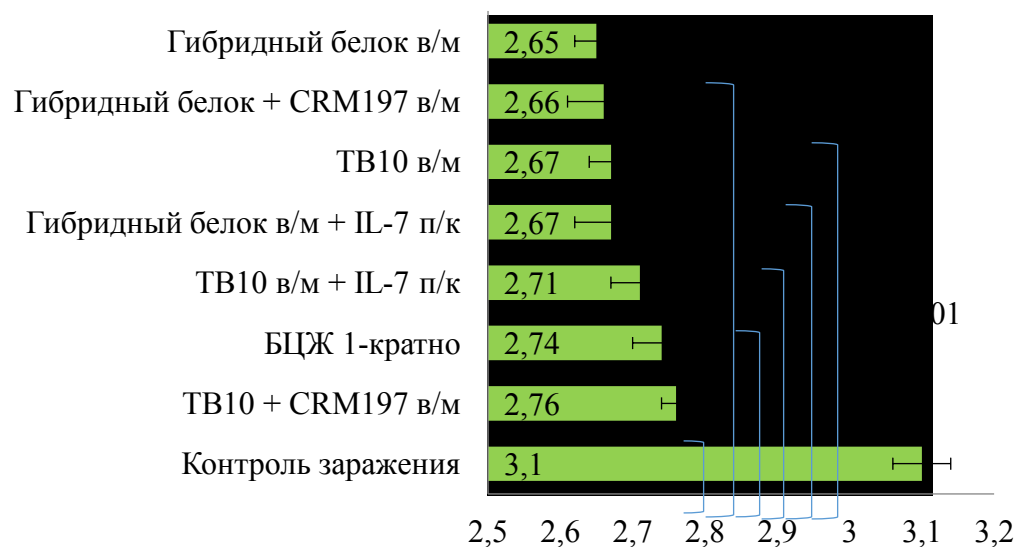


Рисунок 53 - Диаграмма, иллюстрирующая индекс поражения легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №4

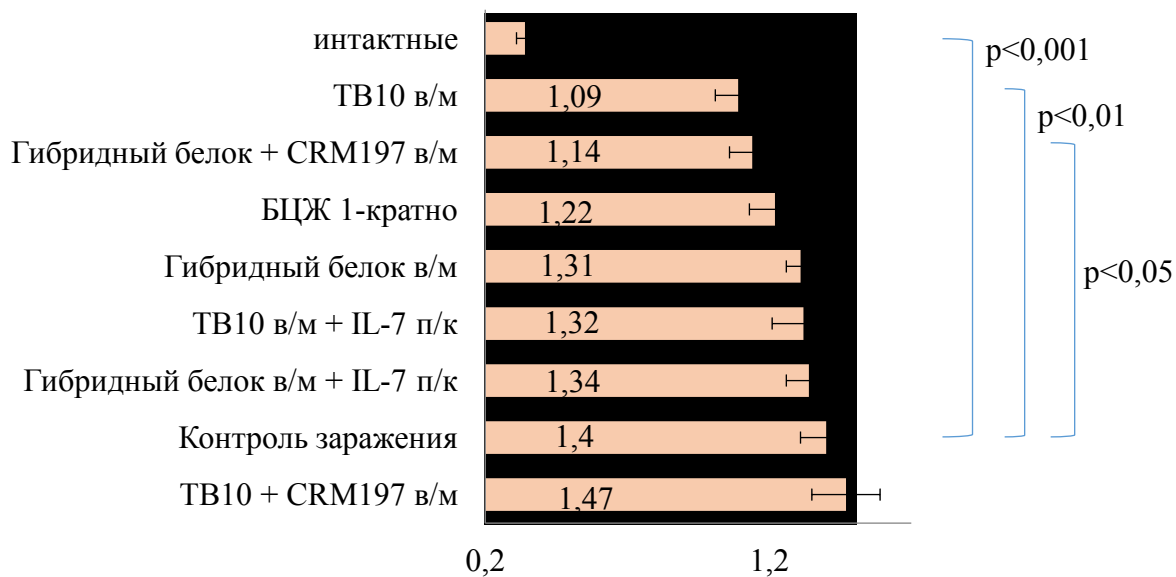


Рисунок 54 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициент массы селезенки мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №4

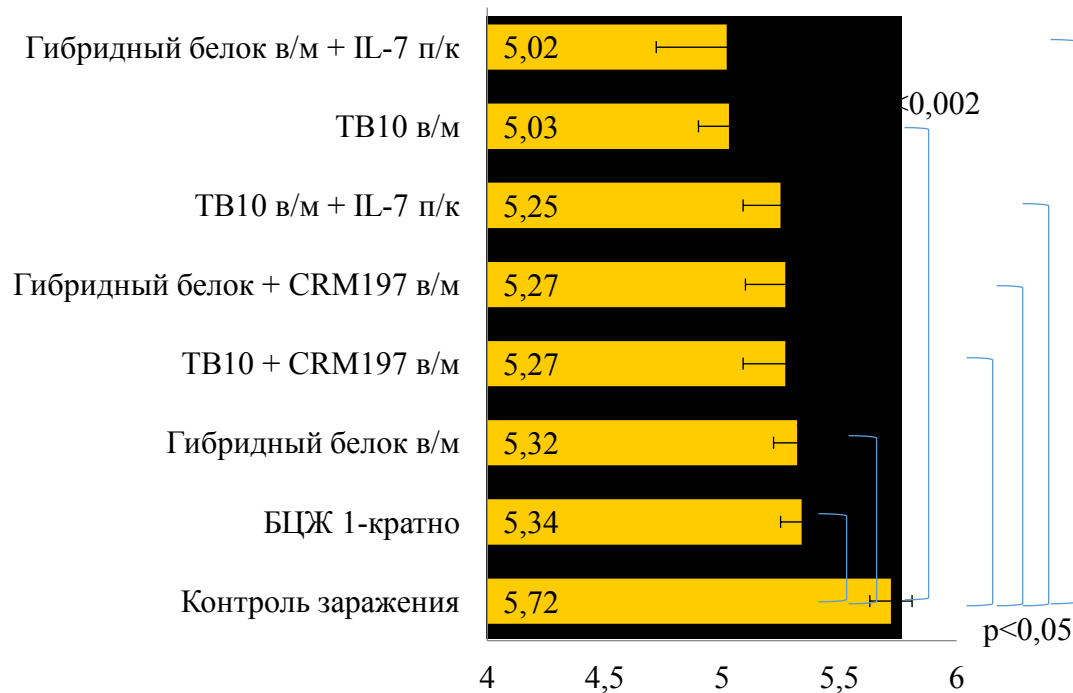


Рисунок 55 - Диаграмма, иллюстрирующая десятичные логарифмы числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №2

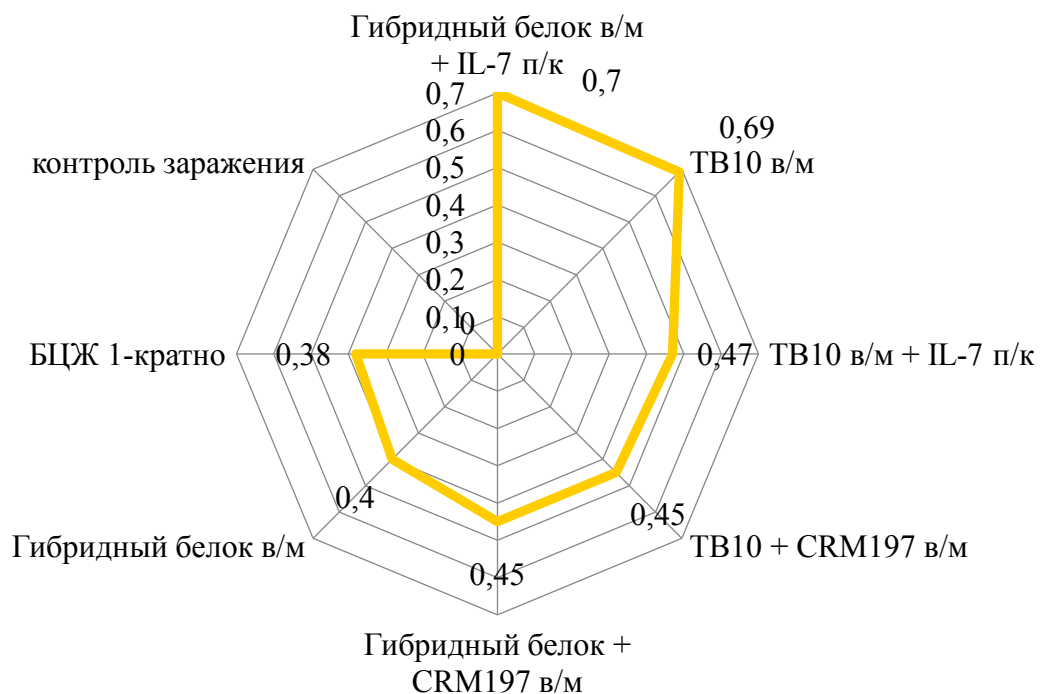


Рисунок 56 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с невакцинированными животными в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №4

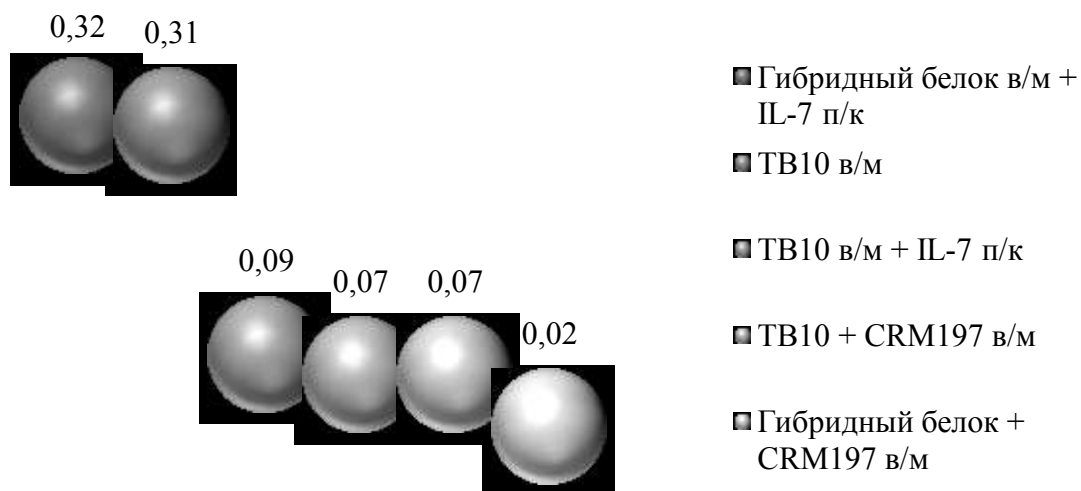


Рисунок 57 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт

№4

При оценке протективного действия иммунизации кандидатными вакцинами в опыте №4 выявлена задержка развития экспериментального туберкулеза. По показателям «коэффициент массы легких» мышей и «индекс поражения легких» мышей все кандидатные вакцины продемонстрировали эффективность. По данным показателям кандидатная вакцина на основе белка ТВ10.4, вводимого в/м совместно с CRM197, показала результат худший, чем БЦЖ, введенная по стандартной методике, в отличие от всех остальных исследуемых кандидатных вакцин. По коэффициенту массы селезенки мышей данная кандидатная вакцина показала результат худший, чем в контроле заражения.

Самый низкий показатель «коэффициента массы легких» наблюдался в группе животных, иммунизированных кандидатной вакциной, содержащей белок ТВ10.4, - «ТВ10 в/м». В данной группе показатель был на 45% ниже, чем в группе «контроль заражения», различия считались достоверными, $p < 0,002$. Показатель на 2% больше (43%) наблюдался в группе «ТВ10 в/м + IL-7 п/к». Показатель еще на 5% больше (38%) наблюдался в группе «гибридный белок + CRM197 в/м», различия с группой контроль заражения считались достоверными, $p < 0,002$. Результаты, полученные по группам «гибридный белок в/м» и «гибридный белок в/м + IL-7 п/к», оказались одинаковыми, - исследуемый показатель оказался на 34% ниже, чем в группе контроль заражения, различия с группой «контроль заражения» считались достоверными, $p < 0,01$. Достоверные различия выявлены между группами «контроль заражения» и всеми остальными группами, кроме группы группы «ТВ10 в/м + IL-7 п/к», а также между группами БЦЖ, введенной по стандартной схеме, и «ТВ10 в/м» и «ТВ10 в/м + IL-7 п/к», $p < 0,01$.

Индекс поражения легких мышей в группе «гибридный белок в/м» оказался на 15% ниже, чем в группе контроль заражения, в группах «гибридный белок + CRM197 в/м», «ТВ10 в/м» и

«гибридный белок в/м + ПЛ-7 п/к» – на 14%, в группе «ТВ10 в/м + ПЛ-7 п/к» – на 13%. Достоверные различия выявлены между группами «контроль заражения» и всеми остальными группами животных, кроме «БЦЖ 1-кратно», везде $p < 0,001$.

Коэффициент массы селезенки в группе «ТВ10 в/м» оказался на 26% ниже, чем в группе «контроль заражения», различия считались достоверными, $p < 0,001$; причем эта величина всего на 4% меньше, чем таковая в группе «гибридный белок + CRM197 в/м» (22%), различия с группой «контроль заражения» считались достоверными, $p < 0,05$, и на 9% меньше, чем таковая в группе «БЦЖ 1-кратно» (17%). Достоверные различия также выявлены между группами «контроль заражения» и «интактные животные», $p < 0,001$.

По остальным исследуемым показателям наилучший результат наблюдался в группе «гибридный белок в/м + ПЛ-7 п/к», следующей по эффективности оказывалась кандидатная вакцина, содержащая белок ТВ10.4, вводимая внутримышечно.

Десятичный логарифм числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в группах «гибридный белок в/м + ПЛ-7 п/к» и «ТВ10 в/м» оказался на 12% ниже, чем в группе «контроль заражения», различия считались достоверными, $p < 0,05$ и $p < 0,002$, соответственно. В остальных группах различия с группой «контроль заражения» составляли менее 10%, однако различия были достоверными.

По показателю «индекс защиты легких» мышей, по сравнению с невакцинированными животными, положительный эффект (более 0,5 lg) продемонстрировали кандидатные вакцины на основе гибридного белка в/м с предварительным введением ПЛ-7 п/к и на основе белка ТВ10, вводимого в/м, 0,7 lg КОЕ и 0,69 lg КОЕ, соответственно. По сравнению с животными, иммунизированными БЦЖ по стандартной методике, все кандидатные вакцины продемонстрировали большую эффективность, - индекс защиты превышал таковой, полученный в сравниваемой группе. Однако, учитывая величину lg КОЕ, необходимую для того, чтобы считать кандидатную вакцину эффективной, по сравнению с животными, иммунизированными БЦЖ по стандартной методике, эффективными можно назвать также только указанные выше две группы. Вакцина БЦЖ, введенная по стандартной методике, не обеспечила в данном опыте защиту легких мышей.

Таким образом, в модели туберкулеза, вызванного бактериями с отсутствующей лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, - чувствительными, - все исследуемые кандидатные вакцины, кроме таковой на основе белка ТВ10.4, вводимого в/м совместно с CRM197, продемонстрировали протективный потенциал, причем по ряду показателей больший, по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике.

3.3.2.6. Исследование Т-лимфоцитов и уровня антител, опыт №5

Осуществлялось изготовление вакцинных кандидатов смешиванием компонентов, указанных в таблице 3 (№ опыта - 2), по п. 2.10.1.1, осуществлялась иммунизация мышей линии Balb/c по п. 2.10.1.1. в соответствии с данными, указанными в таблице 3 (№ опыта - 2) двукратная, с интервалом в 2 недели. В данном исследовании гидроксид алюминия, в форме порошка, добавлялся к раствору белка, а также БЦЖ (Имурон-вак). В качестве жидкой среды использовался PBS. Всего каждое животное получало по 100 мкг белка FliCAg85bTb10.4. Исследовалось внутримышечное введение данного белка.

Через две недели после второй иммунизации осуществлялось заражение по п. 2.10.1.1. животных по п. 2.3. и таблице 3 в п. 2.10.1.1. штаммом *M.tuberculosis Erdman* по п. 2.2., не обладающим устойчивостью к противотуберкулезным препаратам. Через 5 недель и 6 дней после заражения животные умерщвлялись по п. 2.10.1.1., у них осуществлялся забор селезенки и крови. Далее оценивались субпопуляционная структура Т-лимфоцитов и уровень антител к созданному гибриднему белку.

3.3.2.6.1. Исследование субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов

Выделялись спленоциты мышей линии Balb/c исследованных групп животных по п.2.10.2, затем поверхностные антигены и внутриклеточные цитокины окрашивались по п. 2.10.3.. В качестве отрицательного контроля к клеткам вносилась среда RPMI, в качестве положительного контроля – стафилококковый энтеротоксин В. Подготовленные клетки анализировались с использованием проточной цитофлуориметрии по п.2.10.4.. Полученные результаты приведены на рисунках 58 и 59.

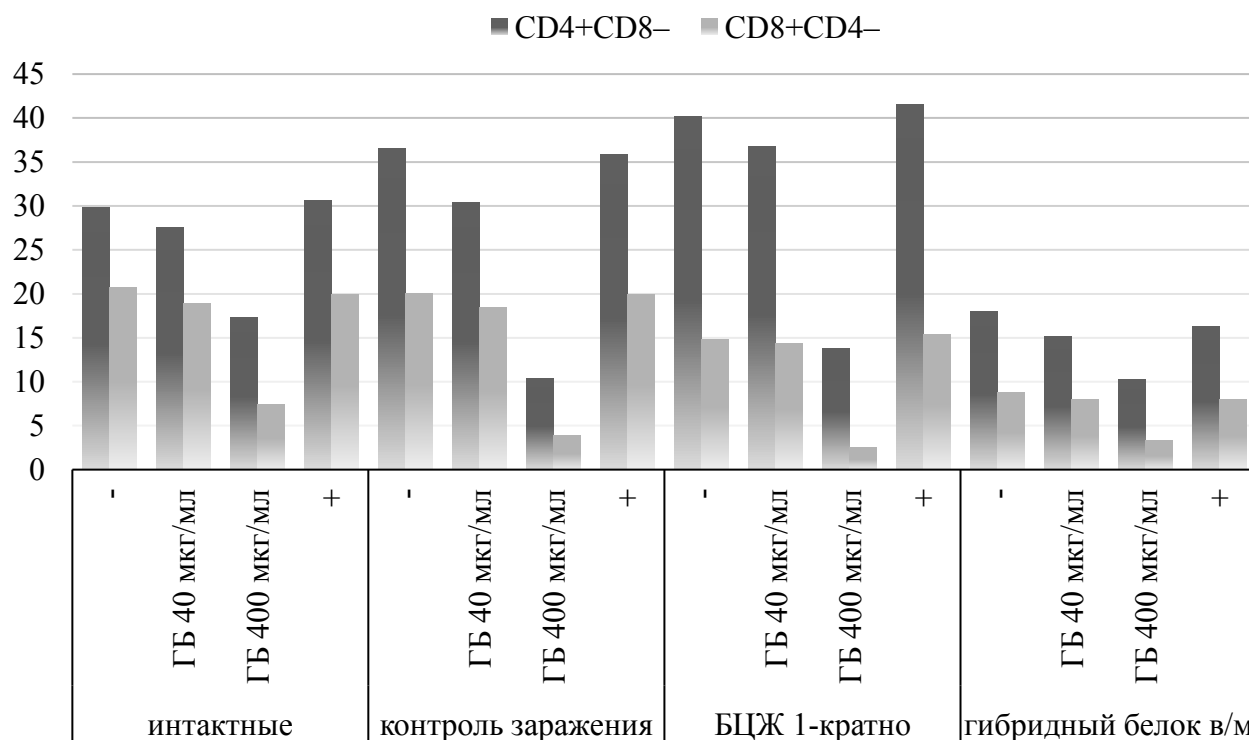


Рисунок 58 - Диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп, вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов; - отрицательный контроль, ГБ – стимуляция гибридным белком в концентрации, + положительный контроль

В отсутствии стимуляции и при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл в группах «контроль заражения» и «БЦЖ 1-кратно» количество CD4+ Т-лимфоцитов было больше, в группе «гибридный белок в/м» – меньше, а CD8+ Т-лимфоцитов – во всех группах меньше, чем у интактных животных, при стимуляции гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл (10-кратная концентрация) количество и CD4+, и CD8+ Т-лимфоцитов было меньше такового группы интактных животных.

В отсутствии стимуляции среди всех групп самое малое количество CD4+ Т-лимфоцитов наблюдалось в группе животных, иммунизированных гибридным белком в/м, далее – «интактные животные», далее – «контроль заражения», далее – БЦЖ, введенная по стандартной методике. Распределение групп по количеству CD8+ Т-лимфоцитов, от самого большого к меньшему, такое же, разве что группа «гибридный белок в/м» продемонстрировала самое малое число CD8+ Т-лимфоцитов среди всех исследованных групп.

При стимуляции гибридным белком FliCAg85bTb10.4 в концентрации 40 мкг/мл среди всех групп самое малое количество CD4+ Т-лимфоцитов наблюдалось в группе животных, иммунизированных гибридным белком в/м, далее – «интактные животные», далее – «контроль заражения», далее - БЦЖ, введенной по стандартной методике. В этих группах наблюдалось

распределение по количеству CD8+ Т-лимфоцитов, от самого большого к меньшему, следующим образом, - «интактные животные», «контроль заражения», БЦЖ, введенная по стандартной методике, «гибридный белок в/м».

При стимуляции SEB количество CD8+ Т-лимфоцитов было больше такового группы интактных животных только в группе «контроль заражения», далее порядок групп по уменьшению количества таких лимфоцитов - следующий: «интактные животные», «БЦЖ 1-кратно», «гибридный белок в/м». При стимуляции SEB количество CD4+ Т-лимфоцитов было меньше такового группы интактных животных только в группе «гибридный белок в/м», в остальных группах - больше, по возрастающей, в группах контроля заражения, «БЦЖ 1-кратно».

По внеклеточным антигенам Т-лимфоцитов выявлено, что во всех группах количество Т-хелперов превышало количество CD8+ Т-лимфоцитов, как минимум, в два раза.

Без стимуляции минимальное различие наблюдалось в группе интактных животных - наблюдалось превышение в 1,4 раза; в группе контроль заражения – в 1,8 раз, в группе «гибридный белок в/м» – в 2 раза. В группе «БЦЖ 1-кратно» наблюдалась самую большую разницу – в 2,7 раз.

При стимуляции стафилококковым энтеротоксином В минимальное различие наблюдалось в группе интактных животных – в 1,5 раз, в группе контроля заражения – в 1,8 раз, в группе «гибридный белок в/м» – в 2 раза. Самая большая разница наблюдалась в группе «БЦЖ 1-кратно» - в 2,7 раз.

При стимуляции гибридным белком FliC_{Ag85bTb10.4} в концентрации 40 мкг/мл минимальное различие наблюдалось в группе интактных животных – наблюдалось превышение в 1,5 раза; в группе контроля заражения – в 1,6 раз, «гибридный белок в/м» – в 1,9 раз. В группе «БЦЖ 1-кратно» наблюдалась самая большая разница – в 2,6 раз.

При стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл, по сравнению с отсутствием стимуляции, превалирование Т-хелперов незначительно увеличилось, на 1%, причем только в группе интактных животных. В остальных группах при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл превалирование Т-хелперов становилось меньше, чем при отсутствии стимуляции, причем самая большая разница наблюдалась в группе контроля заражения, - на 10%. На 8% становилось меньше превалирование Т-хелперов в группе «гибридный белок в/м» и на 6% - в группе «БЦЖ 1-кратно».

В опыте 5 для всех групп животных продемонстрировано незначительное уменьшение числа CD8+ Т-лимфоцитов и большее уменьшение количества CD4+ Т-лимфоцитов при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл.

При стимуляции же гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл, по сравнению с отсутствием стимуляции, превалирование Т-хелперов увеличилось во всех исследованных

группах. Самая большая разница наблюдалась в группе «БЦЖ 1-кратно» – в 2 раза. В 1,6 раз становилось больше превалирование Т-хелперов в группе «интактные животные» и меньше всего - в 1,5 раз - в группах «контроль заражения» и «гибридный белок в/м».

Стимуляция гибридным белком в концентрации 40, либо 400 мкг/мл показала, что более сильный ответ формируется при стимуляции с использованием меньшей концентрации белка. В группе «гибридный белок в/м» при стимуляции данным белком в концентрации 40 мкг/мл, у Т-хелперов результат стимуляции оказался практически аналогичным результату стимуляции стафилококковым энтеротоксином В, сходство порядка 93%, а у CD8+ лимфоцитов – аналогичным, сходство практически 100%, что среди всех групп является наилучшим показателем.

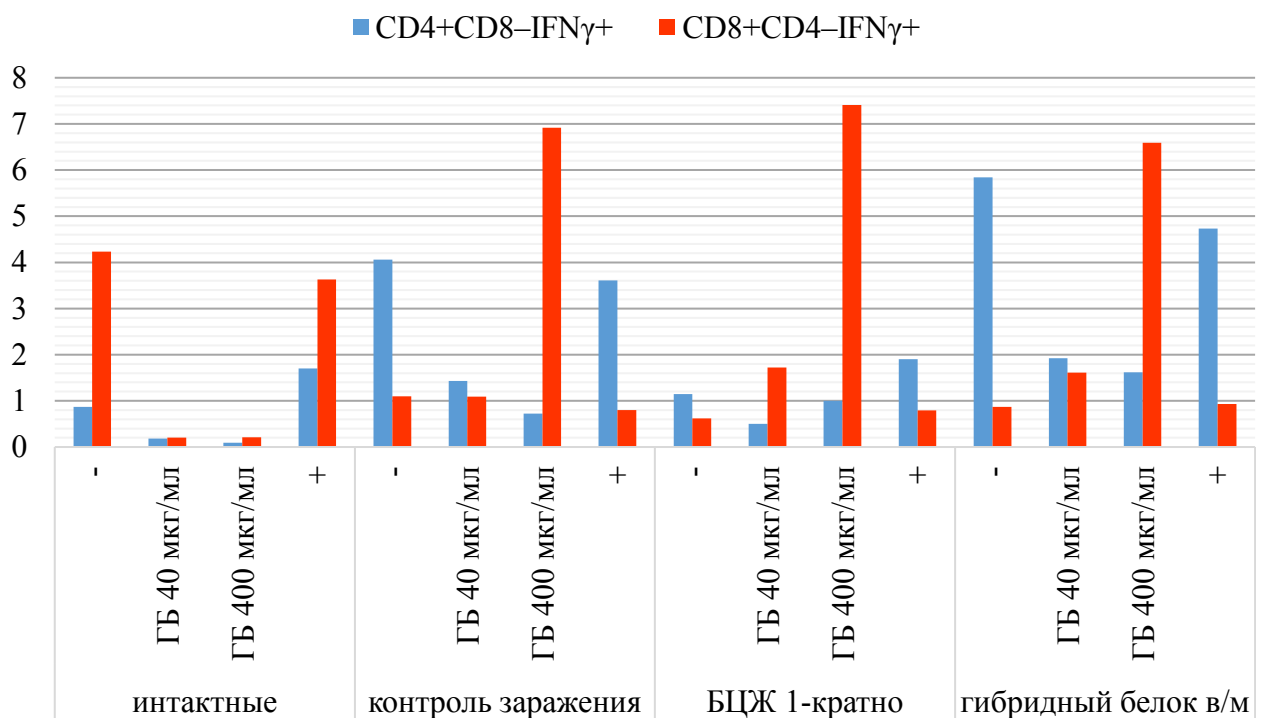


Рисунок 59 - Диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп, вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма; - отрицательный контроль, ГБ – стимуляция гибридным белком, + положительный контроль

В отсутствии стимуляции и при стимуляции гибридным белком в обеих концентрациях и SEB во всех группах количество CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было больше, чем у интактных животных.

В отсутствии стимуляции и при стимуляции SEB количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было меньше, чем у интактных животных, во всех группах, а при стимуляции гибридным белком в обеих концентрациях - больше.

В отсутствии стимуляции среди групп, кроме интактных животных, самое малое количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдалось в группе БЦЖ, введенной по стандартной методике, далее, по возрастаню, - «контроль заражения» и «гибридный белок в/м». В отсутствии стимуляции среди всех групп самое малое количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдалось в группе БЦЖ, введенной по стандартной методике, далее, по возрастаню – «гибридный белок», далее – «контроль заражения», «интактные животные».

При стимуляции гибридным белком в обеих концентрациях количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, уменьшалось, по сравнению с отсутствием стимуляции, во всех группах, а таких CD8⁺ Т-лимфоцитов – в контролях, а в группах «гибридный белок в/м» и «БЦЖ 1-кратно в/м» - увеличивалось, - при стимуляции гибридным белком FliC_{Ag85bTb10.4} в концентрации 40 мкг/мл, при стимуляции же 10-кратным количеством гибридного белка лишь в группе интактных животных количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, уменьшалось, во всех остальных группах – увеличивалось.

При стимуляции гибридным белком FliC_{Ag85bTb10.4} в концентрации 40 мкг/мл среди всех групп, по сравнению с интактными животными (самое малое значение), самое малое количество CD4⁺ Т-лимфоцитов наблюдалось в группе БЦЖ, введенной по стандартной методике, далее, по возрастаню, - контроль заражения и гибридный белок в/м. Среди всех групп самое малое количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдалось в группе «контроль заражения», далее – «гибридный белок в/м», далее - БЦЖ, введенная по стандартной методике.

При стимуляции гибридным белком FliC_{Ag85bTb10.4} в концентрации 400 мкг/мл среди всех групп, по сравнению с интактными животными (самое малое значение), самое малое количество CD4⁺ Т-лимфоцитов наблюдалось в группе контроля заражения, далее, по возрастаню, - БЦЖ, введенной по стандартной методике, и «гибридный белок в/м». Среди всех групп самое малое количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдалось в группе «гибридный белок в/м», далее - контроля заражения, далее - БЦЖ, введенной по стандартной методике.

При стимуляции SEB количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, увеличивалось в группах интактных животных и «БЦЖ 1-кратно» и уменьшалось в группах «гибридный белок в/м» и контроля заражения. При стимуляции SEB количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, увеличивалось в группах «БЦЖ 1-кратно» и «гибридный белок в/м» и уменьшалось в контрольных группах.

При стимуляции SEB количество CD8⁺ Т-лимфоцитов было наименьшим в группе «БЦЖ 1-кратно», далее порядок групп по увеличению количества таких лимфоцитов - следующий: «контроль заражения», «гибридный белок в/м», «интактные животные». При стимуляции SEB

количество CD4+ Т-лимфоцитов было наименьшим в группе интактных животных, далее, по возрастанью, «БЦЖ 1-кратно», «контроль заражения», «гибридный белок в/м».

По внутриклеточному антигену Т-лимфоцитов IFN γ только в группе «интактные животные» выявлено, что количество CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон гамма, превышало количество Т-хелперов, синтезирующих интерферон гамма, и при стимуляции гибридным белком в разных концентрациях, и стафилококковым энтеротоксином В, и при отсутствии стимуляции, причем, как минимум, на 10%. В группе «БЦЖ 1-кратно» превалирование CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , над Т-хелперами, синтезирующими IFN γ , наблюдалось при стимуляции гибридным белком в обоих вариантах концентрации, причем в 7,4 раз в случае стимуляции гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл, в 3,4 раза – 40 мкг/мл. В группах «гибридный белок в/м» и «контроль заражения» превалирование CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , над Т-хелперами, синтезирующими IFN γ , наблюдалось только при стимуляции гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл, в 4,1 раз и 9,6 раз, соответственно.

Превалирование CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , над такими Т-хелперами при стимуляции гибридным белком FliC_{Ag85bTb10.4}, по сравнению с отсутствием стимуляции, уменьшалось только в группе «интактные животные», в 2,1 раза при стимуляции указанным белком в концентрации 400 мкг/мл, и в 4,4 раза при стимуляции указанным белком в концентрации 40 мкг/мл. В остальных группах, наоборот, наблюдалось увеличение превалирования CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , над такими Т-хелперами при стимуляции гибридным белком FliC_{Ag85bTb10.4} в обеих исследуемых концентрациях. Так, в группе «контроль заражения» при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл выявлено увеличение превалирования в 2,8 раз, а при 400 мкг/мл - в 35 раз, это самый высокий полученный показатель, среди всех групп. В группе «БЦЖ 1-кратно» при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл выявлено увеличение превалирования в 6,4 раза, а при 400 мкг/мл - в 13,7 раз, в группе «гибридный белок в/м» – в 5,6 раз при 40 мкг/мл и в 27,3 раз - при 400 мкг/мл.

Количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких CD4+ Т-лимфоцитов без стимуляции во всех группах, кроме группы «БЦЖ 2-кратно внутримышечно», последовательность по убывающей – «интактные животные», «контроль заражения», «гибридный белок + ДНК в/м», «гибридный белок в/м», «БЦЖ 1-кратно»; при стимуляции гибридным белком - в группах «контроль заражения», «гибридный белок + ДНК в/м», «интактные животные», по убывающей; при стимуляции SEB - в группах «гибридный белок + ДНК в/м», «гибридный белок в/м», «интактные животные».

Количество CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких CD8+ Т-лимфоцитов без стимуляции в группе БЦЖ, вводимой 2-кратно внутримышечно, при стимуляции гибридным белком - в группах «БЦЖ 1-кратно», «гибридный белок в/м», «БЦЖ 2-кратно внутримышечно», по убывающей; при стимуляции SEB - в обеих группах БЦЖ, в большей степени – вводимой 2-кратно внутримышечно.

Графики распределения популяций Т-лимфоцитов приведены в Приложении 12.

3.3.2.6.1. Исследование уровня антител, опыт №5

Выделенные по окончании опыта №5, через 5 недель и 6 дней после инфицирования, образцы крови животных были использованы для получения пулированных (объединенных от животных одной группы) сывороток по п. 2.10.8. Сыворотки анализировались с использованием методики ИФА по п.2.8.7.1. Полученные результаты обрабатывались с использованием программы Microsoft Excel. Результаты приведены на рисунках 60 - 65.

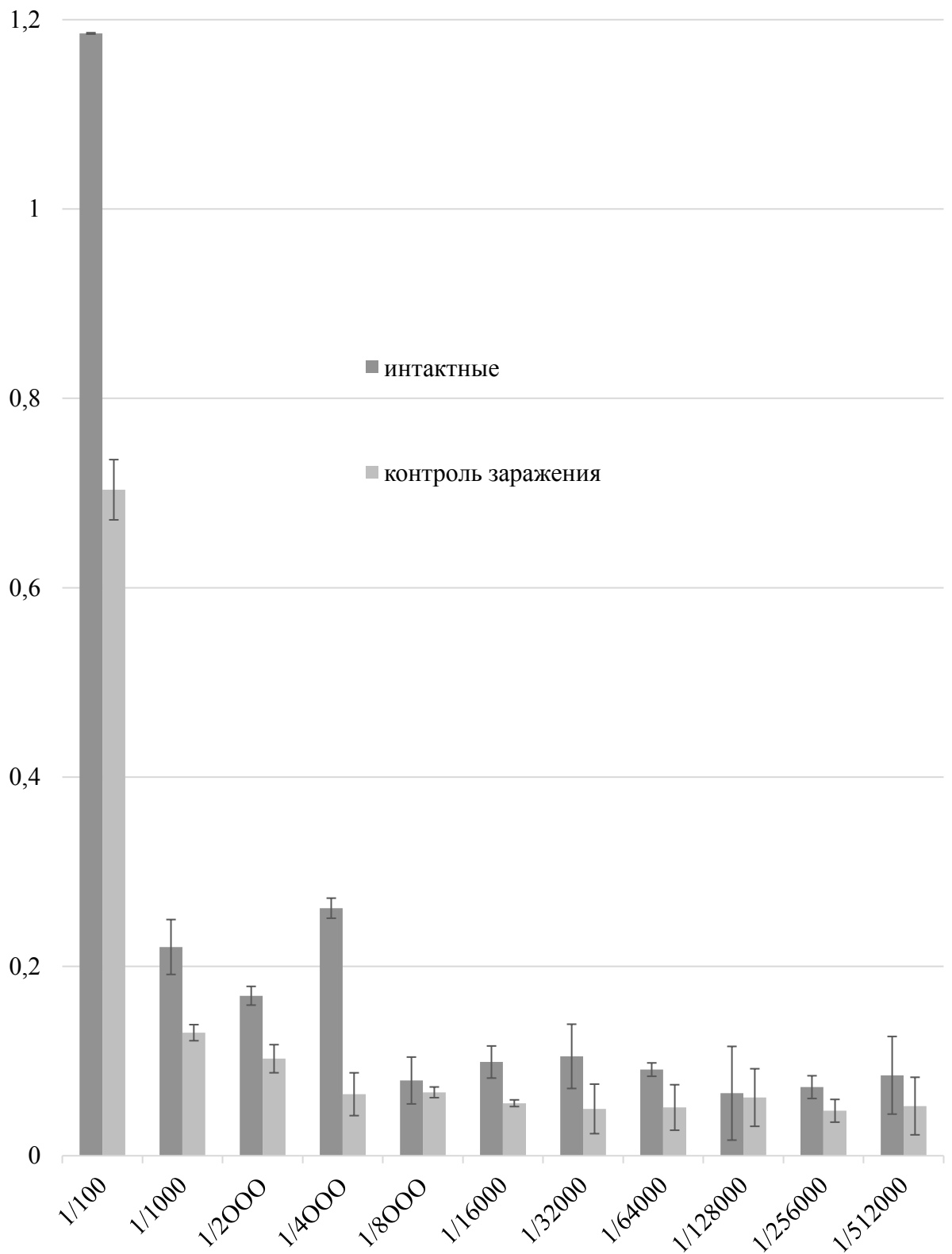


Рисунок 60 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «контроль заражения» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – гибридный белок FliCAg85bTb10.4

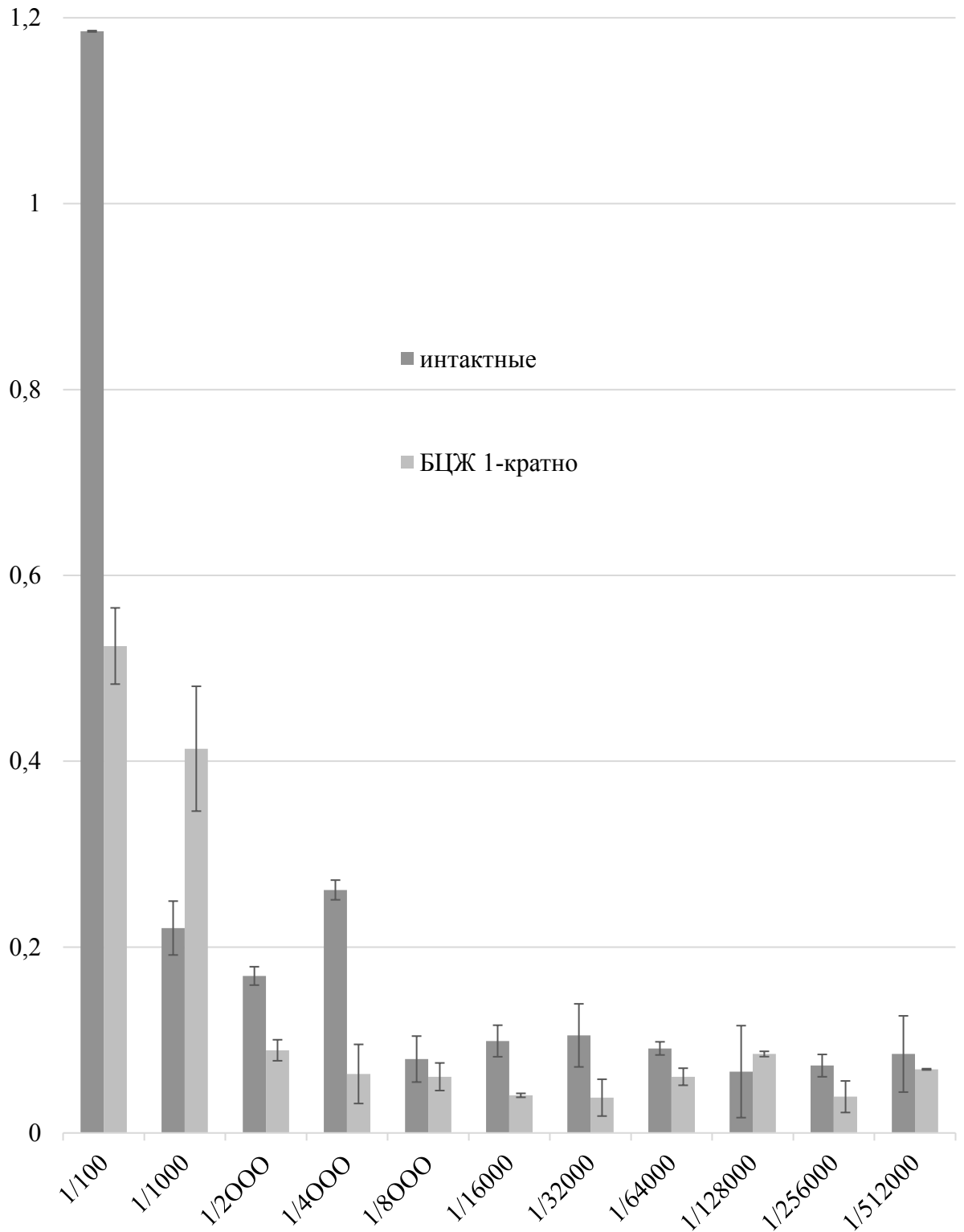


Рисунок 61 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «БЦЖ 1-кратно» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – гибридный белок FliCAg85bTb10.4

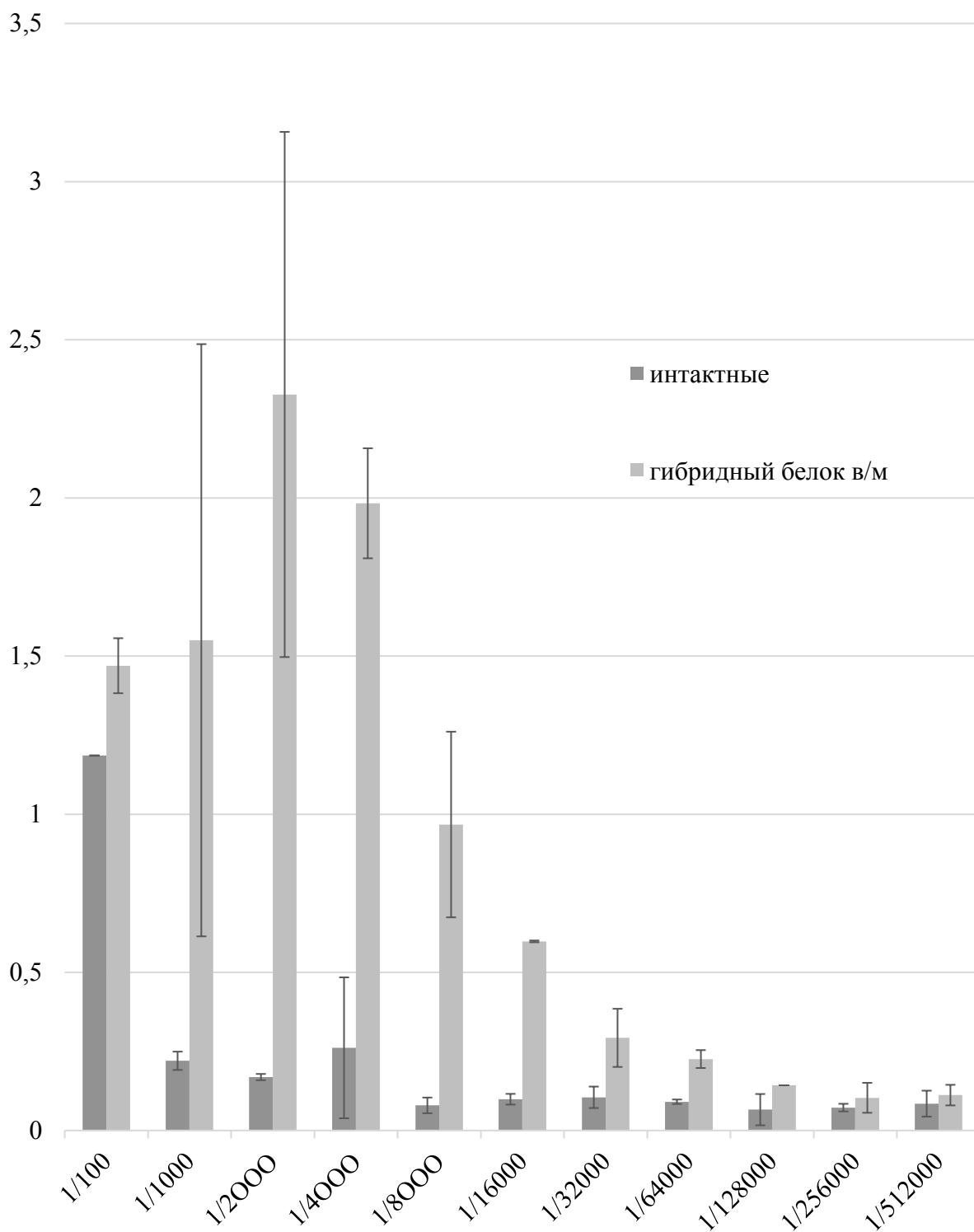


Рисунок 62 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «гибридный белок в/м» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – гибридный белок FliCAg85bTb10.4

Титр антител к гибриднему белку FliCAg85bTb10.4 выявлен только в группе «гибридный белок в/м», и составил 1:128000.

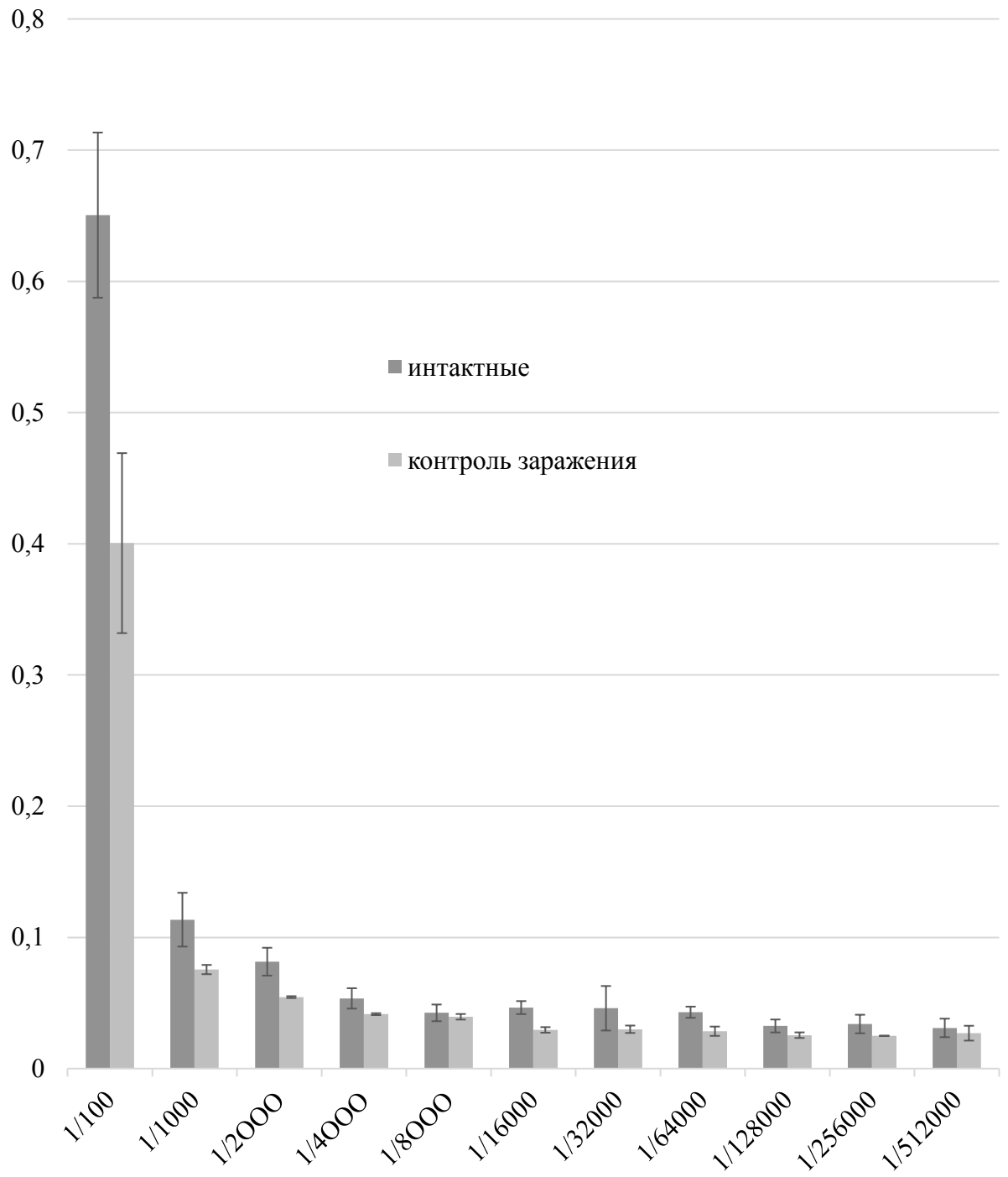


Рисунок 63 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «контроль заражения» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – белок Tb10.4

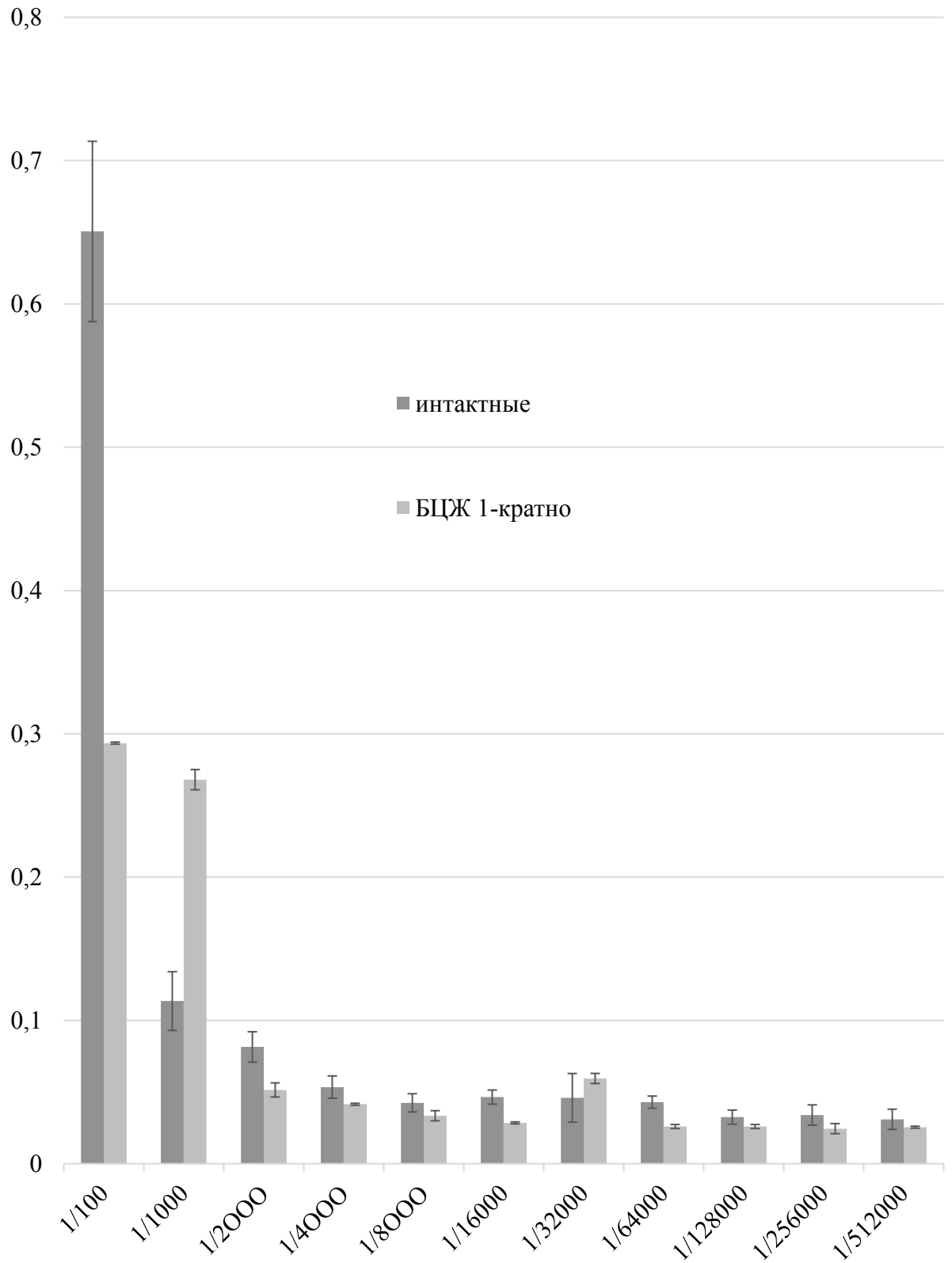


Рисунок 64 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «БЦЖ 1-кратно» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – белок Tb10.4

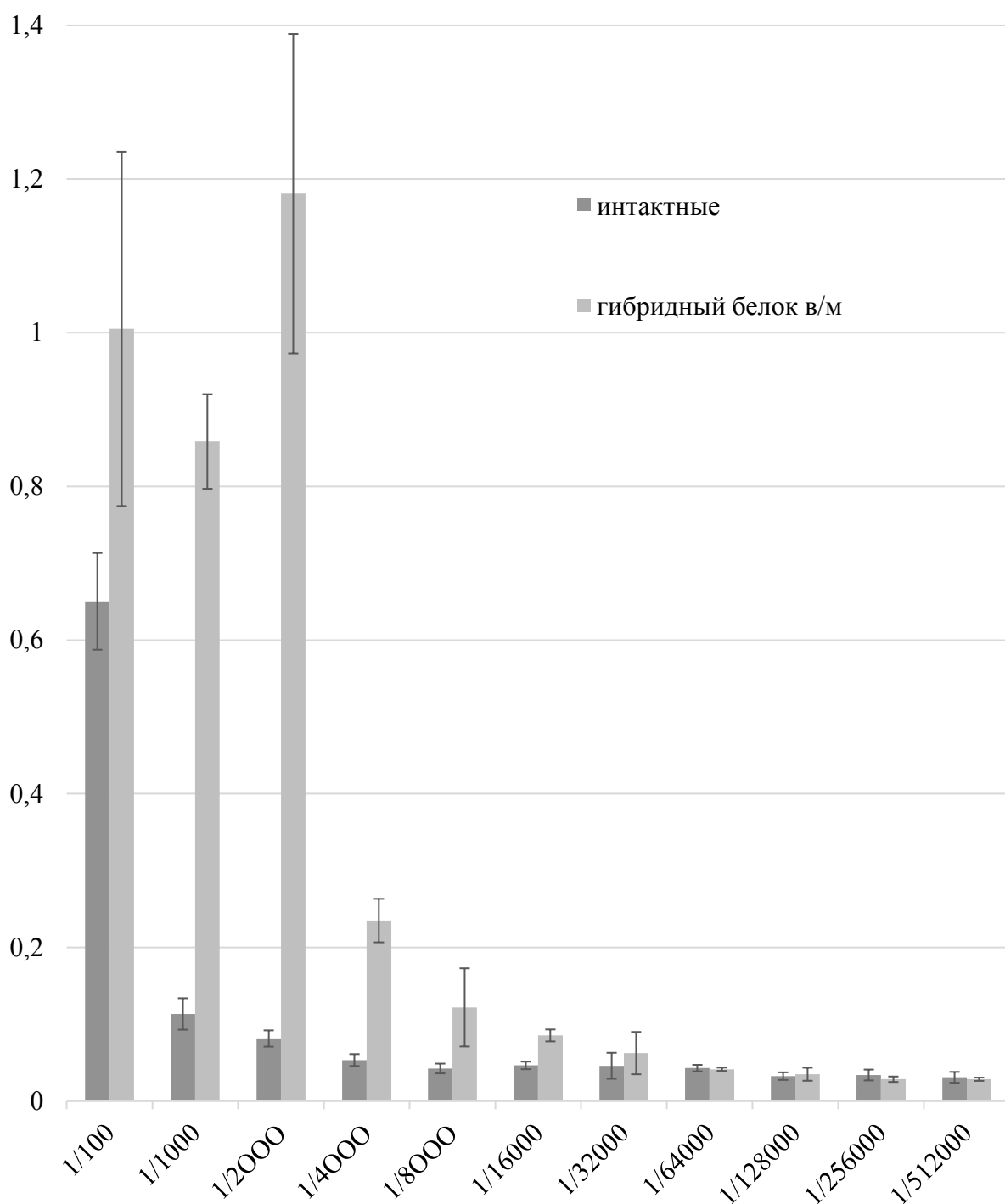


Рисунок 65 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «гибридный белок в/м» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – белок Tb10.4

Титр антител к белку Tb10.4 выявлен группах «БЦЖ 1-кратно» и «гибридный белок в/м» и составил 1:1000 и 1:8000, соответственно.

3.3.3. Исследование экспрессии целевого гена при введении плазмидной ДНК, а также антигенности синтезируемого белка, опыт №6

В опыте использовались белые беспородные мыши по п.2.3. Животным вводилась плазмидная ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85b* в количестве 50 мкг в PBS, в качестве отрицательного контроля использовались животные без введения какого-либо вещества. Животные умерщвлялись на 2, 5 и 7 день, у них отбиралась кровь, и приготавливались сыворотки по п. 2.10.8.

Полученные сыворотки анализировались электрофорезом в ПААГ по п.2.8.1. с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану и визуализацией целевого белка с использованием хемилюминесценции, по п.2.8.8.. Полученные результаты приведены на рисунке 66.

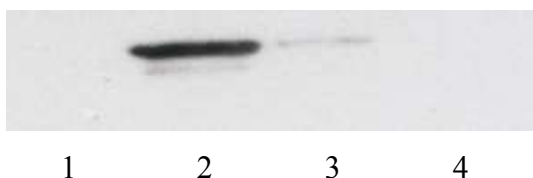


Рисунок 66 - Проявленная пленка после проведения анализа по п. 2.8.8., 1 – проба через 2 дня после введения плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85b*, 2 - проба через 5 дней после ее введения, 3 - проба через 7 дней после ее введения, 4 – отрицательный контроль

По рисунку 66 видно, что целевой ген, закодированный в плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)*Ag85b*, экспрессируется, причем максимальный уровень экспрессии наблюдается на пятый день после введения такой плазмидной ДНК, и белок присутствует и через неделю после этого, и что данный белок может связываться с антителами к гибриднему рекомбинантному белку *FliCAg85bTb10.4*.

Измерение концентрации данного антигена в сыворотке лабораторных животных - белых беспородных мышей – проводилось с помощью количественного ИФА по п.2.8.7.2. и показало наличие белка *Ag85b* и на второй день после иммунизации, концентрация в сыворотке (2 ± 1) нг/мл, на пятый день она составляла (30 ± 4) нг/мл, на седьмой день – (6 ± 2) нг/мл.

3.4. Анализ результатов, полученных в моделях с использованием *M. tuberculosis*, чувствительных и устойчивых к противотуберкулезным препаратам

3.4.1. Индекс поражения легких

Индекс поражения внутреннего органа рассчитывается, исходя из оценки изменений в них, выявленных макроскопически.

По результатам четырех экспериментов, 1-4, можно сделать вывод о том, что по индексу поражения легких все исследованные вакцинные кандидаты продемонстрировали большую эффективность, чем БЦЖ, введенная по стандартной методике, причем и при использовании чувствительного к ПТП штамма микобактерий, и устойчивого. При этом по данному показателю группа, в которой вводился гибридный белок внутримышечно, продемонстрировала лучшие результаты, чем остальные группы, во всех опытах, кроме третьего, где наилучший показатель продемонстрирован в группе вакцины БЦЖ, вводимой двукратно внутримышечно, и первого, где наилучший показатель продемонстрирован в группе, в которой вводились плазмидные ДНК внутримышечно. В данных опытах животные были умерщвлены через 5 недель после заражения, в отличие от остальных групп, в которых данное действие было осуществлено через 6 недель после заражения. Также компоненты кандидатных вакцин вводились в PBS в опыте 3, в отличие от остальных опытов, в которых введение осуществлялось в физиологическом растворе. Следует отметить, что в опыте 3 количество вводимого гибридного белка было в два раза меньше, чем в остальных опытах, - 10 мкг. Возможно, данные моменты в отдельности или в совокупности повлияли на различия в результатах.

При сравнении опытов с использованием штамма микобактерий, устойчивого к ПТП, опыт 1, и чувствительного, опыт 2, обнаружено сходство в том, что наилучшие показатели по индексу поражения легких наблюдались в группах «ДНК внутримышечно» и «гибридный белок внутримышечно», по убыванию, и показатели, близкие к таковому группы «контроль заражения», - в группах «БЦЖ 1-кратно» и «гибридный белок+ДНК внутримышечно», по убыванию. Группа «гибридный белок интраназально» показала в опыте с чувствительным к ПТП штаммом микобактерий лучший результат, чем в группе в группе с устойчивым к ПТП штаммом микобактерий, по сравнению в группой «БЦЖ 2-кратно внутримышечно». Использованный в исследовании штамм микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью способен противостоять ингибированию синтеза миколовых кислот, РНК, арабиногалактана,

белка [260]. Поскольку устойчивость у микобактерий обусловлена мутациями в генах, можно предположить, что используемый штамм имел немного иное строение клеточной мембраны и, возможно, клеточной стенки, чем штамм, чувствительный к антибиотикам, что могло обусловить наблюдаемую разницу в эффективности исследованных вакцинных кандидатов.

При сравнении опытов 2 и 3 наблюдалось аналогичное распределение результатов, по убыванию от таковой группы «контроль заражения», в группах «БЦЖ 1-кратно» и «гибридный белок+ДНК внутримышечно», что коррелирует с полученными результатами и в группе с использованием штамма микобактерий, устойчивого к ПТП. Однако в опыте 3, в отличие от опыта 2, в группе «БЦЖ 2-кратно внутримышечно» выявлен показатель лучше, чем в группе «гибридный белок внутримышечно». Возможно, это можно объяснить количеством белка и/или используемым буфером и/или временем между заражением животных и анализом материала.

3.4.2. Коэффициент массы легких

При развитии туберкулезного процесса масса паренхиматозных органов увеличивается, в то время как масса тела животных уменьшается, поэтому коэффициенты масс органов служат критерием их пораженности [261].

По результатам четырех экспериментов, 1-4, можно сделать вывод о том, что по коэффициенту массы легких все исследованные вакцинные кандидаты продемонстрировали эффективность. Большая эффективность, чем БЦЖ, введенной по стандартной методике, по данному критерию наблюдалась в группах исследованных вакцинных кандидатов в опытах 3 и 4. В опыте с использованием устойчивого к ПТП штамма микобактерий, опыт 1, вакцинный кандидат на основе гибридного белка, вводимый интраназально, единственный из созданных вакцинных кандидатов продемонстрировал результат хуже, чем таковой БЦЖ, введенной по стандартной методике. В опыте 2 такой результат также продемонстрирован в группе «гибридный белок+ДНК внутримышечно».

При этом по данному показателю группа, в которой вводился гибридный белок внутримышечно, продемонстрировала лучшие результаты, чем остальные группы, в опытах 3 и 4. Стоит отметить, что в опыте 4 удалось добиться лучшего результата, чем в группе «гибридный белок внутримышечно», в группе «гибридный белок + CRM197 внутримышечно». Что интересно, в опытах 3 и 4 вводимое количество гибридного белка в группах, продемонстрировавших лучшие показатели, т.е. «гибридный белок внутримышечно» и

«гибридный белок + CRM197 внутримышечно», соответственно, было 10 мкг - в два раза меньше, чем в остальных опытах.

При сравнении опытов с использованием штамма микобактерий, устойчивого к ПТП, опыт 1, и чувствительного, опыт 2, обнаружилось сходство в том, что группа «гибридный белок интраназально» хоть и продемонстрировала эффективность, однако показатель был ниже, чем в остальных группах. Эффективность остальных вакцинных кандидатов различалась в данных опытах. Так, в опыте 1 наилучшие показатели наблюдались в группах «гибридный белок+ДНК внутримышечно» и «ДНК внутримышечно», по убыванию, а в опыте 2 - в группах «БЦЖ 2-кратно внутримышечно» и «ДНК внутримышечно». В обоих опытах из вакцинных кандидатов только таковой на основе плазмидной ДНК, вводимой внутримышечно, продемонстрировал большую эффективность, чем БЦЖ, вводимая по стандартной методике.

При сравнении опытов 2 и 3 в группах вакцинных кандидатов наблюдалась схожая небольшая эффективность при введении гибридного белка и ДНК внутримышечно. В остальных группах показатели различались в данных опытах.

В противоположность таковому по показателю «индекс защиты легких», в опыте 2, в отличие от опытов 1 и 3, в группе «БЦЖ 2-кратно внутримышечно» выявлен показатель лучше, чем в группе «гибридный белок внутримышечно». Возможно, это можно объяснить временем между заражением животных и анализом материала.

3.4.3. Коэффициент массы селезенки

По результатам двух экспериментов, №3 и №4, можно сделать вывод о том, что по коэффициенту массы селезенки вакцинный кандидат на основе гибридного белка, вводимого внутримышечно, продемонстрировал эффективность. Большая эффективность, чем БЦЖ, введенной по стандартной методике, по данному критерию наблюдалась в опыте 3. Вводимое количество гибридного белка в данном опыте было 10 мкг - в два раза меньше, чем в опыте 4. Возможно, такие результаты можно объяснить и временем между заражением животных и анализом материала, - опыт 3 был завершен на 1 неделю и 2 дня раньше, чем опыт 4.

3.4.4. Индекс защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными

Индекс высеваемости микобактерий туберкулеза основан на среднем от количества КОЕ микобактерий туберкулеза в легких каждой группы, и с его помощью вычислялся десятичный логарифм числа жизнеспособных бактерий в данном органе. На основе данного показателя рассчитывался индекс защиты органа, по сравнению с невакцинированными животными и животными, иммунизированными БЦЖ, введенной по стандартной методике.

По результатам четырех экспериментов можно сделать вывод о том, что в опытах 1-3 по индексу защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными, все исследованные вакцинные кандидаты продемонстрировали эффективность. Большая эффективность, чем БЦЖ, введенной по стандартной методике, по данному критерию наблюдалась в группах исследованных вакцинных кандидатов в опыте 3. В опыте с использованием лекарственно устойчивого штамма микобактерий, опыт 1, вакцинный кандидат на основе гибридного белка, вводимый интраназально, единственный из созданных вакцинных кандидатов продемонстрировал результат хуже, чем таковой БЦЖ, введенной по стандартной методике, причем в данных двух группах показатель был ниже порога, демонстрирующего эффективность. В опыте 2 же только в группе «гибридный белок интраназально» результат оказался лучше, чем в таковой БЦЖ, введенной по стандартной методике. При введении гибридного белка Ag85a интраназально в 10-кратно меньшем количестве, но трехкратно, и с адьювантом, у мышей линии Balb/c была продемонстрирована также меньшая обсемененность микобактериями легких [146] (на основе данного показателя высчитывается индекс защиты органа). Возможно, не высокие показатели в опыте 1 были получены ввиду использования большой дозировки гибридного белка для интраназального введения.

При этом по данному показателю группа, в которой вводился гибридный белок внутримышечно, продемонстрировала лучшие результаты, чем остальные группы вакцинных кандидатов, в опытах 1 и 3. Группа «гибридный белок+ДНК внутримышечно» в этих опытах оказалась следующей за ней по эффективности.

При сравнении опытов с использованием штамма микобактерий, устойчивого к ПТП, опыт 1, и чувствительного, опыт 2, обнаружилось сходство в том, что группа «ДНК внутримышечно» хоть и продемонстрировала эффективность, однако показатель был ниже, чем в остальных группах, и том, что вакцинные кандидаты на основе только гибридного белка, вводимые внутримышечно, продемонстрировали наибольшую эффективность. Эффективность остальных вакцинных кандидатов различалась в данных опытах. Наибольшую эффективность среди вакцинных кандидатов в опыте 1 продемонстрировал таковой на основе гибридного белка,

вводимый внутримышечно, затем – на основе гибридного белка и плазмидной ДНК, вводимый внутримышечно, в опыте 2 - на основе гибридного белка, вводимый интраназально, затем – БЦЖ, вводимая по стандартной методике, далее – вакцинный кандидат на основе гибридного белка и плазмидной ДНК, вводимый внутримышечно и после него - на основе гибридного белка, вводимый внутримышечно.

При сравнении опытов 2 и 3 выявили, что показатели различались.

В противоположность таковому по показателю «индекс защиты легких», в опыте 2, в отличие от опытов 1 и 3, в группе «БЦЖ 2-кратно внутримышечно» выявлен показатель лучше, чем в группе «гибридный белок внутримышечно». Возможно, это можно объяснить временем между заражением животных и анализом материала.

3.5. Анализ результатов, полученных в модели с использованием микобактерий, чувствительных к противотуберкулезным препаратам

В опытах с использованием чувствительного к ПТП штамма микобактерий туберкулеза дополнительно оценивалось влияние добавления адъювантов на показатели тяжести течения инфекции, также оценивались показатели фагоцитоза перитонеальных макрофагов и субпопуляционная структура Т-лимфоцитов, их способность к синтезу интерферона гамма при стимуляции гибридным белком, с использованием проточной цитофлуориметрии, что является более точным методом анализа, чем ИФА, а также В-клеточный ответ.

3.5.1. Влияние добавления адъювантов на показатели тяжести течения инфекции

В опыте 4 оценивалось влияние добавления адъюванта CRM197, рекомбинантного белка, к вакцинному кандидату на основе гибридного белка, вводимого внутримышечно, либо введения адъюванта IL-7, рекомбинантного белка, подкожно до введения вакцинного кандидата. Также в данном опыте для сравнения использовался белок TB10.4 *M.tuberculosis*, он вводился без и с указанными выше адъювантами, а также с гидроксидом алюминия.

Показано, что вакцинный кандидат на основе гибридного белка, вводимого внутримышечно, продемонстрировал лучший результат среди всех сравниваемых групп, в том числе с адъювантами, по показателю «индекс поражения легких» мышей. По коэффициентам

массы органов, легких и селезенки, наблюдалась наибольшая эффективность при использовании адьюванта CRM197 совместно с данным гибридным белком. По индексу защиты, по сравнению с невакцинированными животными, наблюдалась наибольшая эффективность среди всех сравниваемых групп при использовании адьюванта IL-7 в совокупности с гибридным белком.

Использование IL-7 ухудшало результат применения гибридного белка внутримышечно, что наблюдалось по показателям коэффициентов масс легких и селезенки, а также индексу поражения легких, рассчитываемому на основе морфологии органа, при этом улучшало - по показателю «индекс защиты легких», коррелирующему с числом жизнеспособных микобактерий в данном органе. При этом применение IL-7 ухудшало результат применения белка ТВ10.4 внутримышечно, что наблюдалось по всем исследованным показателям.

Известно, что IL-7 играет важную роль в дифференцировке Т-клеток, В-клеток, естественных киллеров и дендритных клеток. Кроме того, ИЛ-7 имеет важное значение для клеточной пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток.

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты локализованы в барьерных органах и способны проявлять цитотоксичность в отношении в том числе инфицированных клеток организма. Циркулирующие $\gamma\delta$ Т-лимфоциты периферической крови имеют фенотип активированных клеток или клеток памяти и в большей своей массе являются аутореактивными. Некоторые $\gamma\delta$ IEL, циркулирующие, могут экспрессировать CD8. Резидентные $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, которых в слизистых оболочках 25-60% (также локализуются в эпителии и лимфоидных тканях), - главным образом, наивные клетки [262].

В отличие от $\alpha\beta$ Т-клеток, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты не активируются пептидными антигенами, презентруемыми молекулами МНС I и II класса, но способны отвечать на небелковые антигены, как собственной, так и чужеродной природы. Активированные $\gamma\delta$ Т-лимфоциты синтезируют перфорин, гранзимы, гранулизин, серглицин, катепсин С и серпины. Наряду с перфорин-гранзимовым путем лизис клеток-мишеней $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами может опосредоваться за счет экспрессии Fas/FasL, TRAIL и NKG2D [262].

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты вовлекаются в иммунорегуляцию дендритных клеток, макрофагов, $\alpha\beta$ Т-клеток, гранулоцитов и NK-клеток [263,264]. Человеческие $V\gamma 9V\delta 2$ +Т-лимфоциты способны индуцировать созревание дендритных клеток [262]. Также интраэпителиальные $\gamma\delta$ Т-лимфоциты могут захватывать антиген, мигрировать в близлежащее скопление лимфоидной ткани и там превращаться в дендритные клетки и экспонировать антиген на своей поверхности.

IL-7 способствует увеличению циркулирующих клеток лимфоидной ткани, а также обеспечивает размножение лимфоидных предшественников Т- и В-лимфоцитов. Также IL-7 является гемопоэтическим ростовым фактором, необходим для начала дифференцировки стволовой клетки в В-лимфоцит.

Введение ил-7 – возможно, при лечении, как дополнительный механизм. Так, экспериментально доказано участие циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в элиминации *M. tuberculosis*, *M. leprae*. Но при профилактике с помощью субъединичных вакцин оно не целесообразно, поскольку специфичные клетки памяти не формируются, лишь возможна подготовка антиген-презентирующих клеток. Кроме того, они обеспечивают интегративность эпителия [262].

В исследованном нами случае вакцинные кандидаты вводились внутримышечно, что, скорее всего, не позволяло реализовываться механизму превращения в антиген-презентирующую клетку, с презентацией требуемого антигена.

Использование CRM197 улучшало результат применения гибридного белка внутримышечно, что наблюдалось по практически всем исследованным показателям – коэффициентам масс легких и селезенки, а также индексу защиты легких, коррелирующих с числом микобактерий в данном органе, в том числе жизнеспособных. Однако по последнему показателю достичь результатов, демонстрирующих эффективность, не удалось. По показателю «индекс поражения легких» данный белок также не проявил адьювантное действие. При этом применение CRM197 значительно ухудшало результат применения белка ТВ10.4 внутримышечно, что наблюдалось по всем исследованным показателям.

Таким образом, по результатам данного исследования можно заключить, что применение адьювантов следует исследовать в каждом случае, поскольку один и тот же адьювант способен, как показало данное исследование, по-разному влиять на эффективность вакцинного кандидата. Также целесообразно изучение совместного применения гибридного белка и белка CRM197 в дальнейших исследованиях, - вакцинный кандидат на их основе может быть перспективным.

3.5.2. Показатели фагоцитоза в культуре перитонеальных макрофагов

Фагоцитарная активность макрофагов является важной для элиминации микобактерий.

В опыте 3 оценивалась такая активность перитонеальных макрофагов, по показателям «фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов (%)» - процент макрофагов, вовлеченных в фагоцитоз, «фагоцитарное число» - среднее количество дрожжей, поглощенных одним перитонеальным макрофагом, «индекс завершенности фагоцитоза» - отношение фагоцитарного числа за 1 час культивирования к фагоцитарному числу за 2,5 часа культивирования, «показатель завершенности фагоцитоза» - количество клеток дрожжей, переваренных макрофагами за 2,5 часа культивирования. Последние два показателя для данного

исследования особенно важны, поскольку в отношении микобактерий крайне важно добиться завершенности фагоцитоза, поскольку при недостижении этого реализуется механизм ухода микобактерий от иммунного ответа, который крайне важно не допустить.

По всем исследованным показателям фагоцитоза в культуре перитонеальных макрофагов продемонстрирован положительный эффект всех исследованных кандидатных вакцин, причем больший, чем таковой БЦЖ, вводимой по стандартной методике. По всем показателям, кроме показателей «фагоцитарная активность» и «индекс завершенности фагоцитоза», распределение исследованных групп по эффективности, по убыванию следующее – «БЦЖ в/м 2-кратно», «гибридный белок в/м», «гибридный белок + ДНК в/м». По трем из четырех показателей вакцинный кандидат на основе гибридного белка, вводимого внутримышечно, продемонстрировал результат лучше, чем таковой на основе гибридного белка и ДНК, вводимого внутримышечно.

Также наблюдалось сходство в распределении по эффективности исследованных вариантов вакцин по показателям «фагоцитарное число» и «показатель завершенности фагоцитоза», причем данное распределение наблюдалось и по показателю числа жизнеспособных бактерий в легких мышей, - была выявлена обратная сопряженность по таким двум группам показателей - между изменением фагоцитарной функции макрофагов и числом КОЕ жизнеспособных микобактерий в легких. В условиях генерализации туберкулезной инфекции у мышей группы контроля заражения наблюдалось выраженное угнетение поглотительной и переваривающей функции макрофагов. При увеличении показателей фагоцитоза макрофагов наблюдалось уменьшение высеваемости микобактерий, и наоборот, в исследованных группах животных. Данные результаты, полученные в опыте 3, также являются основанием для обобщенных выводов по эффективности исследованных вариантов вакцин. Выявлено стимулирующее действие кандидатных вакцин на фагоцитоз перитонеальных макрофагов

Проникновение микобактерий в макрофаг возможно с участием различных рецепторов *in vivo* [79]. Однако то, с использованием какого именно механизма происходит такой захват, опосредует во многом элиминацию или же размножение и/или персистенцию микобактерий.

3.5.3. Субпопуляционная структура Т-лимфоцитов и способность к синтезу интерферона гамма при стимуляции гибридным белком

Иммунный ответ на инфицирование бактерией, локализуемой внутриклеточно, более разнообразен, и его технически более сложно измерить, чем таковой – антительный – на инфицирование бактерией, локализуемой экстраклеточно. В настоящее время такие процессы, контролируемые Т-лимфоцитами, до конца не изучены. Так, самое главное, исследователи не смогли выявить какую-либо удобную для измерения иммунную реакцию (коррелят), которая может быть использована, чтобы предсказать, будет ли вакцина защищать от внутриклеточного патогена [259]. Более того, Т-клеточный ответ на патоген и на субъединичную вакцину, как показывают последние исследования, обуславливается скорее разными факторами, чем одинаковыми [265].

В настоящем исследовании изучалась совокупность показателей для данных целей. В их числе – исследование субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов, поскольку известно, что CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты, вероятно, являются крайне важными для элиминации микобактерий [266].

Для исследования субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов из селезенок мышей групп исследования выделялись спленоциты. Использовалась проточная цитофлуориметрия, клетки для анализа выявлялись с использованием специфичных красителей к молекулам CD3, CD4 и CD8. CD3 – маркер созревания Т-лимфоцитов. Если клетка содержит данную молекулу, то на ее поверхности есть Т-клеточный рецептор. CD4 – маркер, присутствующий и на Т-лимфоцитах, и на клетках моноцитарного ряда. CD8 – маркер, присутствующий и на Т-лимфоцитах, и на НКТ-клетках. НКТ-клетки несут и маркер CD3, они относятся к Т-клеткам, а также имеют спонтанные цитотоксические функции, похожие на таковые НК-клеток. НКТ-клетки также выделяют цитокины, под действием которых В-лимфоциты могут трансформироваться в макрофаги.

Выделенные клетки стимулировались либо гибридным белком, либо стафилококковым токсином В (SEB) – положительный контроль. SEB - антиген, на который реакция иммунной системы чрезмерна, суперантиген. Токсины-суперантигены связывают антигенраспознающие рецепторы Т-лимфоцитов не в участках их активных центров, а в других участках рецепторов. SEB связывается с боковыми участками альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TCR) Т-лимфоцитов и одновременно с V-областью МНС класса II. В результате они блокируют возможное связывание с TCR представляемых макрофагом специфических антигенов и вызывают активацию больших популяций Т-хелперных клеток при одновременном обходе

обычного процессинга и представления антигена. Вместо специфических антител ими индуцируется выброс нефизиологического количества провоспалительных цитокинов, в том числе IFN-гамма, вызывающих интенсивную воспалительную реакцию в месте аппликации токсина, гипотензию и интерстициальный отек легких [121,267].

Данное исследование проводилось в опытах 3 и 5, в опыте 3 использовалась доза 10 мкг белка на мышь, в опыте 5 - в 5 раз больше, 50 мкг. В опыте 3 также исследовалось введение гибридного белка совместно с плазмидными ДНК, доза – 10 мкг белка и 25 мкг плазмид. В опытах 3 и 5 использовались мыши разных линий.

Временные показатели, дозировка, пути введения и другие аспекты введения вакцины обуславливают обретение разных молекулярных профилей клеток, что позволяет намеренно программировать клетки, и это крайне важное достижение вакцинологии [268].

3.5.3.1. Субпопуляционная структура Т-лимфоцитов

В опыте 3 в группах «контроль заражения», «БЦЖ 1-кратно», «БЦЖ 2-кратно в/м», «гибридный белок в/м», «гибридный белок + ДНК в/м», в опыте 5 – в группах «контроль заражения» и «БЦЖ 1-кратно» выявлено в отсутствие стимуляции меньшее количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, чем в группе интактных животных, и большее – CD4⁺ Т-лимфоцитов (в опыте 5 – и в группе «гибридный белок в/м»), при стимуляции же гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл в таких группах, в отличие от группы интактных животных, в опытах 3 и 5 количество CD4⁺ Т-лимфоцитов уменьшалось, а CD8⁺ Т-лимфоцитов – в опыте 3 увеличивалось, а опыте 5 – уменьшалось, причем в опытах 3 и 5 в группе «гибридный белок в/м» выявлялось количество CD4⁺ Т-лимфоцитов меньшее и CD8⁺ Т-лимфоцитов - большее в опыте 3 и меньшее в опыте 5, чем в группах интактных животных и «БЦЖ 1-кратно». При стимуляции SEB количество CD8⁺ Т-лимфоцитов было больше такового группы интактных животных только в группе «БЦЖ 2-кратно в/м» в опыте 3 и группе «контроль заражения» в опыте 5, а количество CD4⁺ Т-лимфоцитов – меньше, в опыте 3, в опыте 5 – только в группе «гибридный белок в/м», по CD4⁺ Т-лимфоцитам – также в группе «гибридный белок + ДНК в/м» в опыте 3.

В опытах 3 и 5 было выявлено, что без каких-либо стимуляций самое большое превышение количества Т-хелперов над CD8⁺ Т-лимфоцитами наблюдалось в группе животных, иммунизированных БЦЖ по стандартной методике, - такая иммунизация способствует развитию преимущественно антительного ответа. Все вакцинные кандидаты же продемонстрировали меньшее превалирование Т-хелперов, причем в опыте 3 таковой на основе гибридного белка,

вводимый в/м, меньше, чем в группе контроль заражения. Это достаточно интересный результат, учитывая, что в составе вакцинных кандидатов использованы адъюванты, опосредующие преимущественно гуморальный иммунный ответ.

Адъювант на основе алюминия, как известно, не способен индуцировать в значительной степени цитотоксический Т-клеточный ответ [269], однако для формирования профилактического иммунитета против заражения последний не является настолько первостепенным, как для лечения хронических инфекций [265,270]. Гидроксид алюминия вводился в составе вакцинных кандидатов, содержащих гибридный белок, вводимых внутримышечно.

Использование агониста TLR в профилактической вакцине также считается перспективным, поскольку, как правило, он способствует улучшению величины и/или аффинности антиген-специфических антител, формирование которых индуцируется вакциной [265,271]. В составе гибридного белка использованы фрагменты флагеллина.

В опыте 3 для всех групп животных, кроме интактных, продемонстрирован рост количества CD8⁺ Т-лимфоцитов при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл, что демонстрирует, что такие лимфоциты узнают микобактериальные белки в составе гибридного белка. Такие результаты говорят об узнаваемости доменов гибридного белка такими лимфоцитами, а также о специфичности ответа. Однако в опыте 5 такого роста не было обнаружено ни в одной из групп, даже в группе, в которой вводился гибридный белок внутримышечно. Стимуляция гибридным белком в 10-кратной концентрации, 400 мкг/мл, проводимая в опыте 5, вызывала во всех группах значительное уменьшение количества CD8⁺ Т-лимфоцитов. При этом при стимуляции SEB в опыте 3 количество CD8⁺ Т-лимфоцитов в группах «интактные животные», БЦЖ и «гибридный белок + ДНК в/м» увеличивалось, а в группах контроля заражения и «гибридный белок в/м» уменьшалось, в последнем случае незначительно. При этом при стимуляции SEB в опыте 5 количество CD8⁺ Т-лимфоцитов практически не изменялось во всех группах.

В опыте 3 для всех групп животных, кроме интактных, продемонстрировано уменьшение количества CD4⁺ Т-лимфоцитов при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл, что демонстрирует сходство реакции у клеток животных, ранее встречавших микобактериальные белки - в составе гибридного белка, либо микобактерии, либо после работы плазмидных ДНК. В опыте 5 наблюдалось уменьшение количества CD4⁺ Т-лимфоцитов при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл во всех группах. Стимуляция гибридным белком в 10-кратной концентрации, 400 мкг/мл, проводимая в опыте 5, вызывала во всех группах значительное уменьшение количества CD4⁺ Т-лимфоцитов. При этом при стимуляции SEB в опыте 3 количество CD4⁺ Т-лимфоцитов в группе контроля заражения увеличивалось, а в остальных

группах уменьшалось. При этом при стимуляции SEB в опыте 5 количество CD4+ Т-лимфоцитов практически не изменялось во всех группах.

Что интересно, в опыте 3 количество CD8+ Т-лимфоцитов было несколько больше в группе «гибридный белок в/м», чем в группе контроля заражения, а также чем в группе БЦЖ, вводимой по стандартной методике, количество CD4+ Т-лимфоцитов – меньше, причем как при отсутствии стимуляции, так и при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл. Однако для самых лучших субъединичных вакцин настоящего времени показана индукция значительно меньшего цитотоксического ответа, чем для естественной инфекции, - они индуцируют меньшее количество CD8+ Т-лимфоцитов, чем требуемое для реализации терапевтического цитотоксического ответа [265]. Полученные же в настоящем исследовании данные демонстрируют терапевтический потенциал разработанного вакцинного кандидата. Объяснение тому может крыться в использовании в структуре гибридного белка агониста TLR, поскольку показано, что это способствует значительному увеличению захвата антигена, в результате значительно меньшие количества антигена презентуются эффективно [265]. Также стоит учитывать, что на Т-клеточный ответ, в частности на формирование клеток памяти, либо эффекторных клеток, влияет и то, какие метаболические пути в таких клетках индуцируются или не индуцируются вакциной, эта тема требует отдельного изучения [265].

Таким образом, по опытам 3 и 5 выявлены следующие закономерности в отношении Т-лимфоцитов.

При стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл в опытах 3 и 5 продемонстрировано уменьшение количества CD4+ Т-лимфоцитов для всех групп животных, по сравнению с отрицательным контролем, в опыте 3 - кроме интактных, при увеличении количества CD8+ Т-лимфоцитов в опыте 3, кроме группы интактных животных, и его уменьшении в опыте 5. Это демонстрирует сходство реакции у клеток животных, ранее встречавших микобактериальные белки - в составе гибридного белка, либо микобактерии. В группе интактных животных в опыте 3 обнаружено небольшое увеличение количества CD4+ Т-лимфоцитов и снижение количества CD8+ Т-лимфоцитов при стимуляции гибридным белком при такой концентрации.

При стимуляции в опыте 5 же гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл, в 10-кратном количестве, наблюдалось уменьшение количества и CD8+, и CD4+ Т-лимфоцитов, во всех группах.

При стимуляции SEB во всех группах в опыте 5 количество и CD8+, и CD4+ Т-лимфоцитов практически не изменялось. Это согласуется с данными о том, что линия мышей BALB/с малочувствительна к стафилококковой инфекции [258].

В опыте 3 наблюдалась обратная ситуация по CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитам во всех группах, кроме группы «интактные животные», где количество обоих типов Т-лимфоцитов практически не изменялось, и группы «гибридный белок в/м», где наблюдалось уменьшение количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, а количество CD8⁺ Т-лимфоцитов оставалось практически неизменным, - увеличение количества CD4⁺ Т-лимфоцитов и уменьшение количества CD8⁺ Т-лимфоцитов в группе контроля заражения и увеличение количества CD8⁺ Т-лимфоцитов и уменьшение количества CD4⁺ Т-лимфоцитов в группе БЦЖ.

В двух поставленных опытах получились различающиеся результаты по субпопуляциям лимфоцитов, у беспородных (опыт 3) и Balb/c (опыт 5) мышей. У беспородных мышей наблюдался более высокий уровень Т-хелперов, и при стимуляции гибридным белком во всех группах животных, кроме интактных, наблюдалось увеличение количества CD8⁺ Т-лимфоцитов при снижении количества Т-хелперов, что, возможно, объяснимо первичной встречей в данной группе с гибридным белком. В случае Balb/c мышей стимуляция гибридным белком в количестве 40 мкг/мкл не приводила к увеличению количества Т-лимфоцитов, а стимуляция гибридным белком в количестве 400 мкг/мкл приводила к уменьшению количества и CD4⁺, и CD8⁺ Т-лимфоцитов во всех исследованных группах животных, кроме группы, провакцинированной гибридным белком, - там наблюдалось отсутствие реакции в виде отсутствия изменения в количестве и CD4⁺, и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Следует учитывать, что существуют различия у мышей разных линий по иммунному ответу [258]. Возможно, роль сыграло и количество гибридного белка, которым иммунизировались животные: в опыте 3 его количество было в 5 раз меньше на дозу, чем в опыте 5. Учитывая также негативное влияние больших доз данного белка на количество живых Т-лимфоцитов, наблюдаемое в опыте 5, вероятно, следует использовать дозировку гибридного белка меньше, чем 50 мкг на мышью – 1 доза. Доза антигена или антигенная нагрузка является одним из ключевых факторов индукции успешного Т-клеточного ответа, и также важно при применении у человека увеличивать дозу антигена пропорционально [265].

Как известно, CD4⁺ Т-лимфоциты представлены Th1 и Th2. Во многих наблюдениях показана роль определенных факторов в детерминировании «переключения» иммунного ответа в сторону Th1 или Th2. Одними из факторов являются качество и доза антигена.

CD4⁺Т-лимфоциты, детерминированные по пути развития Th2, осуществляют взаимодействие с В-лимфоцитами, и последние продуцируют цитокин IL-10, который ингибирует CD8⁺Т-лимфоцитарные реакции, что вызывает снижение активности цитотоксических лимфоцитов. Таким образом, гуморальный ответ, развивающийся по такому механизму, ингибирует развитие цитотоксического ответа. Необходимо отметить, что продуцируемые антитела в данном случае будут принадлежать к изотипу IgG2 и IgG4. Th2 не вырабатывают интерферон гамма.

CD4+Т-лимфоциты, детерминированные по пути развития Th1, также осуществляют взаимодействие с В-лимфоцитами. Однако в данном случае не наблюдается ингибирование активности CD8+Т-лимфоцитов, так как Th1-лимфоциты не продуцируют IL-10. В такой ситуации возможно одновременное увеличение цитотоксического и гуморального ответов на иммуноген. Продуцируемые в данном случае антитела будут иметь изотип IgG1 [272]. Th1 вырабатывают интерферон гамма.

Для того, чтобы лучше разобраться в типе формируемого иммунного ответа, проводилось дополнительное исследование Т-лимфоцитов по уровню синтеза ими интерферона гамма.

3.5.3.2. Синтез интерферона гамма Т-лимфоцитами

Интерферон способствует усилению презентации через МНС 1 класса, что положительно сказывается на борьбе с патогеном. Данный цитокин важен для сдерживания микобактерий туберкулеза [273]. Он активирует макрофаги и является эффективным средством минимизации размножения микобактерий, расположенных внутриклеточно [274], а также их киллинга [84]. Интерферон гамма способствует созреванию и закислению фагосомы за счет сбора мембранных белков, ассоциированных с лизосомой, - LAMP-1 (Lysosomal-associated membrane protein 1), - и вакуолярной АТФазы. В фагосомах, содержащих живые микобактерии, данные структуры отсутствуют, как и катепсин Д и Rab7 [275]. Интерферон гамма синтезируется цитотоксическими Т-лимфоцитами и Т-хелперами первого типа.

При отсутствии стимуляции в опытах 3 и 5 в группах, встречавшихся ранее с микобактериальными белками – «контроль заражения», БЦЖ (опыт 3 - в двух типах введения), «гибридный белок (в опыте 3 – а также +ДНК) в/м», - количество CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было больше, чем у интактных животных. В группах «БЦЖ 2-кратно в/м» (опыт 3), «гибридный белок» (опыты 3 и 5) количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было меньше, чем у интактных животных.

При стимуляции гибридным белком в опытах 3 и 5 количество и CD4+, и CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было больше во всех группах, чем у интактных животных, в случае CD8+ Т-лимфоцитов - кроме группы «БЦЖ 2-кратно в/м» в опыте 3.

При стимуляции SEB количество и CD8+ (опыты 3 и 5), и CD4+ Т-лимфоцитов (опыт 3), синтезирующих IFN γ , было меньше, чем у интактных животных, в группах «БЦЖ 1-кратно», опыт 5 – также «БЦЖ 2-кратно в/м» и «гибридный белок + ДНК в/м». В опыте 5 количество CD8+

T-лимфоцитов, синтезирующих $IFN\gamma$, было больше в остальных группах, чем у интактных животных.

В опыте 3 было выявлено, что без каких-либо стимуляций во всех группах, кроме группы БЦЖ 2-кратно внутримышечно, количество $CD8+$ T-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких $CD4+$ T-лимфоцитов. В опыте 5 же наблюдалась обратная ситуация, и только в группе «интактные животные» обнаружено превышение количества $CD8+$ T-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, количества таких $CD4+$ T-лимфоцитов. Самая большая разница в опыте 3 обнаружена в группе «интактные животные», в 4,14 раз, далее по убывающей – в группе «контроль заражения», «гибридный белок + ДНК в/м», «гибридный белок в/м», «БЦЖ 1-кратно». Самая большая разница в опыте 5 обнаружена в группе «гибридный белок в/м», в 6,71 раза, далее по убывающей – в группе «интактные животные», «контроль заражения», «БЦЖ 1-кратно».

В опыте 3 было выявлено, что при стимуляции гибридным белком в группах «контроль заражения», «гибридный белок + ДНК в/м», «интактные животные», по убывающей, количество $CD8+$ T-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких $CD4+$ T-лимфоцитов. В опыте 5 такой результат продемонстрирован в группах «интактные животные» и «БЦЖ 1-кратно», по убывающей. Превышение количества $CD4+$ T-лимфоцитов, синтезирующих $IFN\gamma$, над таковым $CD8+$ T-лимфоцитов наблюдалось в опыте 3 в группах, по нарастающей, БЦЖ 2-кратно внутримышечно, «гибридный белок в/м», «БЦЖ 1-кратно», а в опыте 5 - в группах, по нарастающей, «гибридный белок в/м», «контроль заражения».

В опыте 3 было выявлено, что при стимуляции SEB в группах, по убывающей, «гибридный белок + ДНК в/м», «гибридный белок в/м», «интактные животные», количество $CD8+$ T-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких $CD4+$ T-лимфоцитов. Обратная ситуация наблюдалась в остальных группах: минимальное превышение количества $CD4+$ T-лимфоцитов, синтезирующих $IFN\gamma$, над таковым $CD8+$ T-лимфоцитов было выявлено в группе «БЦЖ 1-кратно», далее по нарастающей – в группе «БЦЖ 2-кратно внутримышечно». В опыте 5 аналогично из всех групп только в группе БЦЖ (1-кратно) наблюдалось превалирование $CD4+$ T-лимфоцитов, синтезирующих $IFN\gamma$, над таковым $CD8+$ T-лимфоцитов. Также аналогична последовательность по убывающей групп, в которых количество $CD8+$ T-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких $CD4+$ T-лимфоцитов, - «гибридный белок в/м», «интактные животные».

Таким образом, при двукратной иммунизации гибридным белком в количестве 10 мкг на животное одна доза T-хелперы первого типа играют значительно меньшую роль, чем при трехкратной встрече с данным антигеном, при это их роль не изменяется и высока при встрече с SEB и при иммунизации гибридным белком в 5-кратном количестве. Встреча с гибридным

белком Т-клеток после иммунизации гибридным белком совместно с плазмидными ДНК не изменяет тип иммунного ответа, как и встреча с SEB; а после иммунизации БЦЖ по стандартной методике изменяет – при превалировании количества Т-хелперов, синтезирующих интерферон гамма, над таковым CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферона гамма, ситуация меняется в обратную сторону, в отличие от встречи с SEB, при которой изменений в типе иммунного ответа не регистрируется.

По опытам 3 и 5 выявлены следующие закономерности в отношении Т-лимфоцитов, синтезирующих гамма-интерферон. Количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких CD4⁺ Т-лимфоцитов без стимуляции и при стимуляции только в группе «интактные животные». Количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, превышало количество таких CD8⁺ Т-лимфоцитов при стимуляции гибридным белком - в группе «гибридный белок в/м»; при стимуляции SEB - в группе «БЦЖ 1-кратно».

Полученные результаты позволяют предположить, что гибридный белок вызывает формирование и клеточного, и гуморального ответа, что делает его крайне привлекательным кандидатом для создания на его основе противотуберкулезной вакцины, применяемой как самостоятельно, так и в стратегии «prime-boost». Целесообразно исследовать и режимы иммунизации. Учитывая, что до настоящего момента субъединичные вакцины обеспечивали плохую защиту против внутриклеточных бактерий [259], разработанный гибридный белок является крайне перспективной молекулой.

Следует отметить, что в двух поставленных опытах получились различающиеся результаты по субпопуляциям лимфоцитов, синтезирующим интерферон гамма, у беспородных (опыт 3) и Balb/c (опыт 5) мышей. У беспородных интактных мышей наблюдался более низкий уровень Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, при отсутствии стимуляции, а при стимуляции гибридным белком у обоих типов мышей и количество Т-клеток обоих типов уменьшалось, по сравнению с таковым без стимуляции, при стимуляции SEB – увеличивалось, по сравнению с таковым без стимуляции, причем в случае Balb/c мышей больше, кроме такового CD8⁺ типа Balb/c мышей. В группе «контроль заражения» в отсутствии стимуляции и при стимуляции и гибридным белком, и SEB количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, у беспородных мышей было больше, чем у Balb/c мышей, а Т-хелперов – меньше. Интересно, что при этом у Balb/c мышей при стимуляции гибридным белком уменьшалось количество Т-хелперов, синтезирующих данный цитокин, при сохранении числа таких CD8⁺ Т-лимфоцитов, по сравнению с отсутствием стимуляции, а у беспородных мышей увеличивалось количество таких CD8⁺ Т-лимфоцитов при сохранении количества таких Т-хелперов. В группе БЦЖ, вводимой по стандартной методике, в отсутствии стимуляции

количество CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, у беспородных мышей было больше, чем у Balb/c мышей, а таких Т-хелперов – меньше, как и в группе контроля заражения, при стимуляции гибридным белком же наблюдалась обратная ситуация, что было справедливо и для стимуляции SEB в отношении таких CD8⁺ Т-лимфоцитов, однако количество таких Т-хелперов при стимуляции SEB было выше у Balb/c мышей. Интересно, что при этом у Balb/c мышей при стимуляции гибридным белком уменьшалось количество Т-хелперов, синтезирующих данный цитокин, при увеличении числа таких CD8⁺ Т-лимфоцитов, по сравнению с отсутствием стимуляции, а у беспородных мышей увеличивалось количество таких Т-хелперов и уменьшалось количество таких CD8⁺ Т-лимфоцитов. В группе введения гибридного белка внутримышечно у беспородных мышей наблюдался более низкий уровень Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, при отсутствии стимуляции и при стимуляции гибридным белком, при стимуляции SEB у Balb/c мышей количество Т-хелперов было выше, чем у беспородных мышей, а CD8⁺ Т-лимфоцитов – меньше. При стимуляции гибридным белком количество Т-хелперов значительно уменьшалось у Balb/c мышей, а CD8⁺ Т-лимфоцитов – увеличивалось, а у беспородных мышей количество Т-хелперов увеличивалось, а CD8⁺ Т-лимфоцитов оставалось неизменным. Следует учитывать, что существуют различия у мышей разных линий по иммунному ответу [258].

Количество CD8⁺ Т-лимфоцитов при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл, по сравнению с отсутствием стимуляции, у обоих типов мышей уменьшалось у интактных животных, в контроле заражения у Balb/c мышей оставалось неизменным, а у беспородных мышей увеличивалось, в группе, в которой вводилась БЦЖ 1-кратно, у Balb/c мышей увеличивалось, а у беспородных мышей уменьшалось, в группе, в которой вводился гибридный белок, у Balb/c мышей увеличивалось, а у беспородных мышей оставалось неизменным.

Количество Т-хелперов при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл, по сравнению с отсутствием стимуляции, у Balb/c мышей уменьшалось во всех исследованных группах - у интактных животных, в контроле заражения, в группе, в которой вводилась БЦЖ 1-кратно, и в группе, в которой вводился гибридный белок внутримышечно, а у беспородных мышей в группах «интактные животные» и иммунизированные гибридным белком внутримышечно оставалось неизменным, но в группе, в которой вводилась БЦЖ 1-кратно, у беспородных мышей - увеличивалось.

При стимуляции в опыте 5 гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл, в 10-кратном количестве, наблюдалось уменьшение количества и CD8⁺, и CD4⁺ Т-лимфоцитов, по сравнению с отсутствием стимуляции, в группе интактных животных, и уменьшение количества Т-хелперов всех остальных группах. Значительно увеличивалось количество CD8⁺ Т-лимфоцитов,

продуцирующего данный цитокин, в группах, встречавшихся ранее с микобактериальными белками.

Возможно, на результаты повлияла не только разница в строении иммунной системы данных линий мышей, но и количество гибридного белка, которым иммунизировались животные: в опыте 3 его количество было в 5 раз меньше на дозу, чем в опыте 5. Учитывая также негативное влияние больших доз данного белка на количество живых Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов, синтезирующих интерферон гамма, во всех группах, и таких CD8⁺ Т-лимфоцитов в группе, не встречавшейся ранее с гибридным белком, - «интактные животные»; наблюдаемое в опыте 5, вероятно, следует использовать дозировку гибридного белка меньше, чем 50 мкг на мышь – 1 доза.

Важным желаемым свойством ответа на вакцину является и его длительность. Как известно, ответ на различные патогены и на различные вакцины различается по длительности, как и В- и Т-клеточный иммунный ответ. Длительность Т-клеточной иммунологической памяти и времени жизни Т-клетки памяти также значительно различаются, - 8-15 лет против 30-160 дней, соответственно. Совсем недавно было показано, что длительность иммунологической памяти обусловлена клоном (популяцией) клеток памяти, но не временем жизни индивидуальной клетки памяти [268]. В дальнейших исследованиях изучение клеток памяти позволит составить более полное понимание эффективности разработанных вакцинных кандидатов.

3.5.4. Оценка гуморального ответа на разработанные молекулы

В-клетки влияют на созревание антиген-презентирующих клеток и на развитие клеточного иммунитета [276]. Также известно, что эффективная вакцина против туберкулеза должна, помимо индукции клеточно-опосредованного иммунитета, также индуцировать формирование «защитных» антител [84]. Показано при инфицировании иными микроорганизмами, что антитела могут способствовать усилению иммунитета за счет различных механизмов, в их числе нейтрализация токсинов, активация комплемента, запуск выброса цитокинов, усиление антитело-зависимой клеточной цитотоксичности и презентации антигена, опсонизация [79,277]. Для антител к микобактерии продемонстрировано способствование усилению связывания компонентов комплемента С3 и С4 с ней [79].

Роль опсонизирующих антител в защите от туберкулезной инфекции у мышей была отмечена в ряде исследований. Показано, что при захвате макрофагом микобактерии, опсонизированной антителами, значительно увеличивается синтез интерферона гамма и

интерлейкина 6, играющих важную роль в индукции микробицидных механизмов в макрофагах, выживаемость таких микобактерий значительно снижается [84].

Также показано, что антитела к микобактерии и компоненты комплемента по отдельности и совместно способствуют значительному усилению фагоцитоза, причем в последнем случае, возможно, данные опсоины действуют синергично [79]. Продемонстрировано, что микобактерии, покрытые антителами, более эффективно процессируются и презентуются дендритными клетками и стимулируют CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный ответ [278].

Учитывая, что компонент комплемента С3 является главным компонентом в сыворотке крови человека [279], при выработке антител, имеющих определенную структуру и свойства, к введенным белкам микобактерий это позволяет ожидать получение протективности.

С использованием анализа титра антител, способных связываться с гибридным белком FlіCАg85bТb10.4 и/или белком Тb10.4 или белком Аg85b оценивалась антигенность разработанных молекул, а также полноценность функционирования доменов в составе гибридного белка и способность разработанного вектора к экспрессии целевого гена. Антигенность – способность молекулы вызывать иммунный ответ, например, формирование антител.

В опыте 5 продемонстрирован высокий титр антител, способных связываться как с гибридным белком, 1:128000, так и с компонентом данного гибридного белка – белком ТВ10.4, 1:8000, сформировавшийся после двукратной иммунизации мышей линии Balb/c гибридным белком FlіCАg85bТb10.4 с последующим заражением микобактериями. Полученные данные подтверждают, помимо антигенности гибридного белка, полноценность функционирования домена, представленного белком ТВ10.4, в его составе. Также был выявлен титр антител, способных связываться с белком ТВ10.4, в группе животных, иммунизированных БЦЖ 1-кратно, 1:1000, а также, с учетом доверительного интервала, вероятно, можно говорить о титре таких антител, 1:100, в группе контроля заражения. Такие данные подтверждают, что белок ТВ10.4 микобактерий доступен для узнавания иммунной системой и в случае инфицирования, и при иммунизации БЦЖ, и в составе разработанного гибридного белка. Полученные титры антител, способных связываться с данным белком, соотносятся с типом и силой адаптивного иммунного ответа, характерными для встречи с тем или иным агентом микобактериального происхождения.

В опыте 6 была оценена способность разработанной плазмидной ДНК к экспрессии кодируемого целевого гена после введения в мышцы мышей, а также функционирование домена гибридного белка, представленного белком Аg85b. Продемонстрирован синтез белка Аg85b уже на вторые сутки после введения разработанной плазмидной ДНК, несущей кодирующий его ген, и в течение недели, причем максимальный уровень синтеза выявлен на пятые сутки после иммунизации. Это говорит о том, что используемый вектор позволяет осуществлять экспрессию

целевого гена в клетках млекопитающих, то есть потенциально демонстрирует и аналогичную работу второй плазмидной ДНК.

Поскольку в данном анализе использованы кроличьи антитела, полученные при введении гибридного белка, и поскольку показано, что они связываются с синтезируемым в клетках мышей белком Ag85b, можно говорить о полноценном функционировании и домена Ag85b в составе гибридного белка, а также самого белка Ag85b, синтезируемого с разработанной плазмидной ДНК, - за счет получения в форме, узнаваемой специфично иммунной системой.

Антигенность и иммуногенность зависят от гетерогенности молекул: чем более она разнородна, тем лучше распознается иммунной системой; а также от размера молекулы – белок должен быть более 10 кДа, - и от степени чужеродности. Это может объяснять эффективность разработанного гибридного белка.

Для индукции длительного ответа, связанного с реакцией герминативных центров, у человека интервал между первичной и вторичной иммунизациями целесообразно делать не менее, чем 1-2 месяца, оптимально – не менее 4-6 месяцев, для оптимального созревания аффинности В-клеток. При сокращении интервала бустерный ответ может быть меньше [81].

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Туберкулез является проблемой, которая наносит вред как на макроуровне - экономике стран и мира, так и на микроуровне - жизни человека и его семьи, окружения, забирая месяцы полноценной жизни и унося миллионы жизней ежегодно. В мировом сообществе поставлена цель на преодоление данного заболевания человечеством в обозримом будущем, и одной из основополагающих задач является создание эффективной противотуберкулезной вакцины.

В настоящей диссертации рассмотрено несколько разработанных отечественных вакцинных кандидатов, а именно их структура и действие. По результатам шести проведенных экспериментов можно заключить следующее.

По всем исследованным показателям, - индексу поражения легких, коэффициенту массы легких, коэффициенту массы селезенки, кроме индекса защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными, во всех опытах, где такие показатели анализировались, в модели генерализованного туберкулеза, продемонстрирована эффективность всех разработанных вакцинных кандидатов. В случае последнего названного показателя в одном из четырех опытов, №4, не удалось подтвердить эффективность ни вариантов БЦЖ, ни гибридного белка, введенного внутримышечно.

В группах исследованных вакцинных кандидатов наблюдали большую эффективность, чем БЦЖ, введенной по стандартной методике, во всех опытах по критерию индекс поражения легких, по коэффициенту массы легких - в опытах 1, кроме группы «гибридный белок интраназально», 2, кроме группы «гибридный белок + ДНК внутримышечно», 3 и 4, по коэффициенту массы селезенки – в одном из двух опытов - в опыте 3, по индексу защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными, - в одном из четырех опытов - в опыте 3.

При сравнении опытов, проводимых с использованием устойчивых и чувствительных к ПТП штаммов микобактерий, выявлено сходство при сравнении опытов 1 и 2, соответственно, по показателю «индекс поражения легких» в том, что все вакцинные кандидаты продемонстрировали большую эффективность, чем БЦЖ, вводимая по стандартной методике, и таковой на основе плазмидной ДНК, вводимой внутримышечно, - чем БЦЖ, вводимая двукратно внутримышечно. По иным показателям, приведенным выше, сходств между данными опытами не выявлено - эффективность остальных вакцинных кандидатов различалась в данных опытах. При сравнении опытов 2 и 3 по тем же показателям наблюдалась небольшая эффективность при введении вакцинного кандидата на основе гибридного белка и ДНК, вводимого внутримышечно. В остальных группах показатели различались в данных опытах.

Однако в опытах 1 и 3 было выявлено намного больше сходств по исследованным показателям. Так, по показателю «индекс поражения легких» вакцинный кандидат на основе гибридного белка и ДНК, вводимый внутримышечно, был хуже по эффективности, чем таковой на основе гибридного белка, вводимый внутримышечно, среди вакцинных кандидатов, но лучше, чем БЦЖ, вводимая по стандартной методике. По показателю «коэффициент массы легких» вакцинный кандидат на основе гибридного белка, вводимый внутримышечно, демонстрировал большую эффективность, чем БЦЖ, введенная двукратно внутримышечно, далее по убывающей по эффективности следует БЦЖ, введенная по стандартной методике. По показателю «индекс защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными» среди вакцинных кандидатов наибольшая эффективность продемонстрирована в случае такового на основе гибридного белка, вводимого внутримышечно. Следующим по эффективности является вакцинный кандидат на основе гибридного белка и плазмидной ДНК, вводимый внутримышечно. Данные вакцинные кандидаты продемонстрировали эффективность большую, чем БЦЖ, введенная по стандартной методике, и меньшую, чем БЦЖ, введенная двукратно внутримышечно.

Поскольку большее количество сходных черт выявлено по исследованным показателям между результатами, демонстрируемыми вакцинными кандидатами в опытах 1 и 3, чем 2 и 3, либо 1 и 2, вероятно, можно предположить, что иммунный ответ, который индуцируется предложенными вакцинными кандидатами, протективен вне зависимости от наличия или отсутствия устойчивости к ПТП у инфицирующего штамма микобактерий, что крайне важно в связи с широкой распространенностью штаммов микобактерий, устойчивых к ПТП. Аналогичных исследований, в отношении профилактики туберкулеза при заражении микобактериями туберкулеза, устойчивыми и чувствительными к ПТП, не было выявлено.

Также, вероятно, в опыте 2 лабораторные животные были не стерильными к началу эксперимента. Тем не менее, если учесть вероятность такого признака, исследуемые вакцинные кандидаты все равно продемонстрировали протективность по показателям тяжести течения инфекции, самые лучшие результаты по показателю «индекс поражения легких» наблюдались в группе плазмидной ДНК, вводимой внутримышечно, по индексу защиты, по сравнению с невакцинированными животными, - в группе гибридного белка, вводимого интраназально.

Вакцинный кандидат на основе гибридного белка, вводимый внутримышечно, исследован в шести опытах, опытах 1-4 - по всем показателям, указанным выше. Во всех опытах по показателю «индекс поражения легких» и в опытах 1, 3 и 4 по показателю «коэффициент массы легких» для данного кандидата продемонстрирована большая эффективность, чем БЦЖ, причем в опытах 1 и 2 и 1 и 3, соответственно, как БЦЖ, введенной по стандартной методике, так и двукратно внутримышечно. В опыте 2 по показателю «коэффициент массы легких» для вакцинного кандидата на основе гибридного белка, вводимого внутримышечно,

продемонстрирован результат немного менее высокий, чем в группах БЦЖ. При исследовании субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов в опыте 3 для данного вакцинного кандидата выявлено самое малое количество CD4+ Т-лимфоцитов и самое большое количество CD8+ Т-лимфоцитов среди исследованных групп животных, кроме интактных и иммунизированных БЦЖ внутримышечно двукратно, т.е. в том числе по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, при стимуляции гибридным белком и без стимуляции, а также самое малое превышение количества Т-хелперов над таковым CD8+ Т-лимфоцитов, при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл, а также после такового БЦЖ, введенной 2-кратно внутримышечно, базальный уровень; в группах, подвергнутых заражению микобактериями. При стимуляции же SEB Т-лимфоцитов данный вакцинный кандидат продемонстрировал самое высокое превышение количества CD8+ Т-лимфоцитов таковым Т-хелперов среди исследованных вариантов вакцин, однако меньшее, чем в группе контроля заражения. При этом в данной группе в опытах 3 и 5 в отсутствии стимуляции количество CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было больше, чем у интактных животных, а таких CD8+ Т-лимфоцитов – меньше. При стимуляции же гибридным белком в опытах 3 и 5 количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , становилось больше, чем у интактных животных, количество таких CD4+ Т-лимфоцитов также было большее, чем у интактных животных. По сравнению с отсутствием стимуляции, при стимуляции гибридным белком количество и CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, увеличивалось в опытах 3 и 5, таких CD4+ Т-лимфоцитов - увеличивалось в опыте 3 и уменьшалось в опыте 5. В данной группе в опыте 3 наблюдалось большее количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих гамма-интерферон, чем таких CD4+ Т-лимфоцитов (в опыте 5 – наоборот), в контролях, причем при стимуляции SEB выявлено соотношение количеств Т-клеток, второе в опыте 3 и первое в опыте 5 по размеру среди всех групп, но меньшее при стимуляции гибридным белком. Продемонстрировано по ряду показателей, что данный вакцинный кандидат при введении совместно с адьювантом CRM197 может действовать эффективнее.

Вакцинный кандидат на основе гибридного белка, вводимый интраназально, показал в опыте с чувствительным к ПТП штаммом микобактерий, опыт 2, лучший результат, чем в группе с устойчивым к ПТП штаммом микобактерий, опыт 1, по сравнению даже с группой «БЦЖ 2-кратно внутримышечно» по индексу поражения легких. Данный вакцинный кандидат в опыте 2 продемонстрировал большую эффективность, чем БЦЖ, введенная по стандартной методике, по индексу поражения легких, по коэффициенту массы легких, по индексу защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными, а в опыте 1 эффективность не продемонстрирована. По опыту 2 если предположить, что животные были не стерильными, то

данный вакцинный кандидат можно считать перспективным для терапевтического использования.

Вакцинный кандидат на основе плазмидной ДНК, вводимый внутримышечно, исследован в опытах 1 и 2 и по всем показателям, указанным выше, кроме коэффициента массы селезенки. По показателю «индекс поражения легких» во всех опытах для данного кандидата продемонстрирована наибольшая эффективность среди всех вариантов вакцин, в том числе БЦЖ, введенной как по стандартной методике, так и двукратно внутримышечно. По показателю «коэффициент массы легких» в опыте 2 для данного кандидата продемонстрирована наибольшая эффективность среди исследованных вакцинных кандидатов, в опыте 1 данный вакцинный кандидат оказался на втором месте по эффективности среди исследованных вакцинных кандидатов. По показателю «индекс защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными» данный вакцинный кандидат в обоих опытах оказался на последнем месте по эффективности среди исследованных вакцинных кандидатов.

Вакцинный кандидат на основе гибридного белка и плазмидной ДНК, вводимый внутримышечно, исследован в опытах 1-3 и по всем показателям, указанным выше, кроме коэффициента массы селезенки. Во всех опытах по показателю «индекс поражения легких» для данного кандидата продемонстрирована большая эффективность, чем БЦЖ, введенная по стандартной методике. По показателю «коэффициент массы легких» для вакцинного кандидата на основе гибридного белка и плазмидной ДНК, вводимого внутримышечно, в опыте 1 продемонстрирован самый лучший результат из всех исследованных вариантов вакцин. Однако в опытах 2 и 3 по данному показателю наблюдался самый худший результат из всех исследованных вариантов вакцин. По показателю «индекс защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными» во всех опытах данный вакцинный кандидат занимал второе место по эффективности среди созданных вакцинных кандидатов. При исследовании субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов в опыте 3 для данного вакцинного кандидата выявлено в отсутствии стимуляции меньшее количество CD4⁺ Т-лимфоцитов и большее - CD8⁺ Т-лимфоцитов, чем в группе БЦЖ 1-кратно, а также превышение количества Т-хелперов над таковым CD8⁺ Т-лимфоцитов, в контролях, меньшее, чем для БЦЖ, введенной по стандартной методике. В последнем случае наблюдалась самая большая разница. При стимуляции же гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл Т-лимфоцитов данный вакцинный кандидат продемонстрировал также более низкий уровень CD4⁺ Т-лимфоцитов, чем БЦЖ, введенная по стандартной методике, но больший, чем в группе «гибридный белок в/м», и меньший уровень CD8⁺ Т-лимфоцитов, чем БЦЖ, введенная по стандартной методике, и самое высокое превышение количества CD8⁺ Т-лимфоцитов таковым Т-хелперов. Вероятно, использование гибридного белка после иммунизации данным вакцинным кандидатом приведет к смещению

формирования иммунного ответа в сторону антительного в большей степени. При этом в данной группе – единственной из всех - в опыте 3 при отсутствии стимуляции и CD4+, и CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было больше, чем у интактных животных. При стимуляции гибридным белком увеличивалось количество таких CD8+ Т-лимфоцитов и уменьшалось - таких CD4+ Т-лимфоцитов, по сравнению с отсутствием стимуляции. Также наблюдалось большее количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих гамма-интерферон, чем CD4+ Т-лимфоцитов, и в контролях, и при стимуляции гибридным белком, причем данное превышение оказалось самым большим среди групп вариантов вакцин.

Крайне важно, что выживаемость в группах исследованных разработанных вакцинных кандидатов во всех опытах, в том числе и пятом, оказалась 100%, в отличие от таковой остальных групп.

Во всех опытах, где исследовалось введение БЦЖ двукратно внутримышечно, т.е. в опытах 1-3, по показателям «индекс поражения легких» и «индекс защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными», была показана ее большая эффективность, чем таковой, введенной по стандартной методике, а также в опытах 1 и 3 по показателю «коэффициент массы легких». По показателю «коэффициент массы легких» в опыте 2 данный вариант вакцины продемонстрировал обратный результат. При исследовании субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов в опыте 3 для данного вакцинного кандидата выявлено самое малое количество CD4+ Т-лимфоцитов и самое большое количество CD8+ Т-лимфоцитов среди исследованных групп животных, кроме интактных, т.е. в том числе по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, а также самое малое превышение количества Т-хелперов над таковым CD8+ Т-лимфоцитов, в контролях, среди групп, подвергнутых заражению микобактериями. При этом в данной группе наблюдалось больше Т-хелперов, синтезирующих IFN γ , чем CD8+ Т-лимфоцитов, и в контролях, и при стимуляции гибридным белком. Причем в контролях такое превышение количества CD8+ Т-лимфоцитов таким - Т-хелперов оказалось самым высоким среди всех групп. Данная вакцина использовалась в растворе совместно с адьювантом гидроксидом алюминия, возможно, данная добавка также сыграла роль в получении такого результата.

Все исследованные вакцинные кандидаты, а именно «гибридный белок внутримышечно» и «гибридный белок + ДНК внутримышечно», первый – в большей степени, чем второй, в опыте 3 продемонстрировали эффективность – стимулирующее действие - по всем исследованным показателям фагоцитоза макрофагов, причем большую, чем БЦЖ, введенной по стандартной методике, - и на формирование цитотоксического ответа, что оценено по субпопуляционной структуре Т-лимфоцитов после выведения животных из опыта, а также при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл, и большую, чем БЦЖ, введенной двукратно

внутримышечно, по показателю «фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов». Выявленная обратная сопряженность полученных в опыте 3 значений показателей (1) «фагоцитарное число», «показатель завершенности фагоцитоза» и (2) «число жизнеспособных бактерий в легких» у животных в эксперименте подтверждает наличие или отсутствие эффективности соответствующих вариантов вакцин.

При исследовании субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов в опытах 3 и 5, как с дополнительной стимуляцией гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл или SEB, так и без нее, также выявлено, что все исследованные варианты вакцин вызывают в большей степени опосредованный Т-хелперами иммунный ответ, т.е. потенциально антительный, чем цитотоксический, однако, по сравнению с БЦЖ, вакцинные кандидаты «гибридный белок внутримышечно» и «гибридный белок + ДНК внутримышечно» (не исследован в опыте 5) индуцируют формирование цитотоксического иммунного ответа в большей степени, причем в опыте 3 показано, что таковой на основе гибридного белка, вводимый в/м, - больше, чем в группе контроль заражения. Показано, что 10-кратное количество гибридного белка, 400 мкг/мл, угнетающе действует на Т-лимфоциты обоих типов во всех группах – их количество уменьшается, при этом количество синтезирующих гамма-интерферон CD8⁺ Т-лимфоцитов значительно превышает таковое Т-хелперов во всех группах, ранее встречавшихся с микобактериальными белками, - гибридным белком, либо микобактериями – вакцинным штаммом, либо штаммом для заражения. Что интересно, экспонирование гибридного белка Т-лимфоцитам мышей таких групп, ранее встречавшихся с микобактериальными белками, приводило к смещению ответа в сторону цитотоксического, что позволяет рассматривать исследуемый белок и в качестве кандидата для бустирования, например, БЦЖ, и в качестве потенциального терапевтического агента.

При этом в опытах 3 и 5 обнаружено, что в группе интактные животные больше CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, чем Т-хелперов, в отсутствии стимуляции, а также при стимуляции гибридным белком и SEB, в опыте 3 такой результат наблюдали и при иммунизации вакцинным кандидатом «гибридный белок + ДНК внутримышечно», а также в группе «контроль заражения». Аналогичный результат в положительном и отрицательном контроле наблюдали в опыте 3 в группе, иммунизированной гибридным белком внутримышечно. При стимуляции гибридным белком в опытах 3 и 5 в данной группе количество Т-хелперов, синтезирующих данный цитокин, превышало количество CD8⁺ Т-лимфоцитов. В группе БЦЖ, вводимой 1-кратно, в опыте 3 обнаружено больше CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма, чем Т-хелперов, в отсутствии стимуляции, а при стимуляции гибридным белком и SEB наблюдается обратная ситуация. Обратная ситуация наблюдалась в опыте 5 в данной группе в отсутствии стимуляции и при стимуляции гибридным белком. В обоих опытах

при стимуляции SEB количество Т-хелперов, синтезирующих интерферон гамма, превышало таковое CD8⁺ Т-лимфоцитов. В группе БЦЖ, вводимой 2-кратно внутримышечно, в опыте 3, больше Т-хелперов, синтезирующих интерферон, чем CD8⁺ Т-лимфоцитов, и в контролях, и при стимуляции гибридным белком.

Учитывая, что интерферон гамма синтезируется Т-хелперами первого типа, активирующими как В-клеточный ответ, так и цитотоксический, и цитотоксическими Т-лимфоцитами, и полученные результаты, также включающие таковые экспозиции гибридного белка группам животных, встречавшихся с микобактериями или белками-его компонентами, можно предположить, что гибридный белок вызывает формирование и клеточного, и гуморального ответа, что делает его крайне привлекательным кандидатом для создания на его основе противотуберкулезной вакцины, применяемой как самостоятельно, так и в стратегии «prime-boost». Целесообразно исследовать и режимы иммунизации.

Поскольку анализ субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов проводился с использованием красителей, позволяющих детектировать клетки по CD8⁺ и CD3⁺ маркерам, вполне вероятно, что в анализируемый пул клеток могли попасть и НКТ-клетки. Данный факт стоит также учитывать при интерпретации результатов.

При исследовании гуморального иммунного ответа в опыте 5 было обнаружено, что группы животных, встречавшихся с микобактериями, при вакцинации и/или заражении, либо ее компонентами, - в составе гибридного белка, - демонстрировали титр антител, связывающихся с белком TB10.4 микобактерий, различный, - что подтверждает доступность данного белка для узнавания иммунной системой, в разной степени, в зависимости от типа встречи с агентом на основе микобактерий, а также его узнаваемость иммунной системой в составе гибридного белка и способность индуцировать формирование специфичного ответа, антительного. При иммунизации гибридным белком выявлен высокий титр антител к нему, что подтверждает его антигенность. В опыте 6 также продемонстрирована способность антител к гибриднему белку специфично связываться с белком Ag85b, также содержащимся в нем в качестве домена. Такие данные подтверждают полноценное функционирование доменов гибридного белка.

В опыте 6 продемонстрирована и способность использованного вектора – pсDNA3.1(+) обеспечивать экспрессию целевого гена, содержащегося в ней, в течение недели, с пиком уровня синтеза целевого белка на пятый день после введения плазмидной ДНК. В данном опыте продемонстрирована и доступность синтезируемого с разработанной плазмидной ДНК белка микобактерий для узнавания иммунной системой и формирования адекватного ответа.

Таким образом, на лабораторных животных показана иммуногенность и антигенность гибридного рекомбинантного белка, в частности доменов в его составе, представленных белками TB10.4 и Ag85B, а также белков, закодированных в векторах, вводимых для экспрессии

микобактериальных белков в клетках целевого организма, то есть способность формирования специфичного иммунного ответа на их введение, а также протективность разработанных вакцинных кандидатов.

В проведенных исследованиях, описанных выше, заражение осуществлялось в хвостовую вену, то есть была использована модель генерализованного туберкулеза, и созданные вакцинные кандидаты продемонстрировали эффективность, регистрируемую по ряду выше указанных показателей, причем при заражении как чувствительным, так и устойчивым к ПТП штаммом микобактерий туберкулеза, в том числе большую, в сравнении с БЦЖ, вводимой по стандартной методике. Это говорит об их перспективности в связи с широким распространением штаммов микобактерий, устойчивых к ПТП. Целесообразно провести исследования также в модели с интраназальным заражением микобактериями. Учитывая природу используемых молекул и полученные результаты, можно ожидать формирование иммунологической памяти, что позволит решить проблему профилактики туберкулеза с их использованием. Также следует более детально рассмотреть вариант использования в качестве адъюванта белка CRM197, сообщившего большую эффективность исследованному вакцинному кандидату на основе гибридного белка, вводимому внутримышечно. Целесообразно исследовать и терапевтический потенциал разработанных вакцинных кандидатов, а также их использование совместно с БЦЖ в стратегии иммунизации «prime-boost». При необходимости для терапии перевес в сторону В-клеточного иммунитета, возможно, получится уменьшить при использовании в дальнейших исследованиях адъювантов, стимулирующих Th1-ответ. Также следует исследовать клетки памяти, поскольку не всегда сила ответа на первичную встречу с антигеном имеет прямую корреляцию с длительностью формируемой иммунологической памяти, а также учитывая возможную разницу в формировании пулов Т- и В-клеток памяти.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны гибридный белок FliCAg85bTb10.4 и плазмидные ДНК pсDNA3.1(+)*ag85a* и pсDNA3.1(+)*ag85b*, индуцирующие иммунный ответ против *M.tuberculosis*, дающий 100% протективность, в том числе и против штамма с МЛУ.

2. Показано, что индуцируемый гибридным белком и/или плазмидными ДНК иммунный ответ более выражен, чем иммунный ответ, индуцируемый БЦЖ в модели генерализованного туберкулеза по показателям «индекс поражения легких», «коэффициент массы селезенки», «индекс защиты легких, по сравнению с невакцинированными животными», по показателям фагоцитоза макрофагов, формированию CD8+ Т-клеточного ответа.

3. Созданы штаммы на основе клеток *E.coli*, DH10B/R, - для стабильного поддержания и амплификации разработанных плазмидных ДНК, BL21(DE3), - для индуцируемого синтеза гибридного белка, локализующегося в тельцах включения.

4. Разработан режим индукции синтеза гибридного белка клетками созданного штамма-продуцента - 0,1 mM ИПТГ при 37°C в течение 3 ч в шейкере роторного типа при 250 об./мин., обеспечивающий выход 27% от общего клеточного белка.

5. Разработан протокол получения высокоочищенного препарата гибридного белка на основе сочетания иммобилизованной металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации, либо плазмидных ДНК на основе сочетания культивирования штамма-продуцента при 37°C в течение 16 ч в шейкере роторного типа при 250 об./мин. и анионообменной хроматографии.

6. Гибридный белок при 2-кратной иммунизации индуцирует титр антител 1:128000, и такие антитела аффинны к белку, синтезируемому с плазмидной ДНК pсDNA3.1(+)*Ag85b*, данный белок (+плазмидные ДНК) индуцирует больший на 5% (6%) CD4+ Т-клеточный ответ, а при 3-кратной встрече с гибридным белком - меньший на 10% CD4+ и больший на 18% CD8+, причем при введении ранее встречавшимся с микобактериальными белками животным иммунный ответ смещается в сторону цитотоксического, что позволяет рассматривать данный белок в качестве кандидата для создания на его основе противотуберкулезной вакцины, применяемой как самостоятельно, так и в стратегии «prime-boost».

7. Продемонстрировано увеличение эффективности иммунного ответа, вызываемого гибридным белком при введении совместно с адьювантом CRM197, по показателям коэффициента массы легких, коэффициента массы селезенки и индекса защиты, по сравнению с вакцинацией БЦЖ, в модели генерализованного туберкулеза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ag85 – antigen 85

ARIC - Antibiotic Resistance and Infection Control

BCG – Bacillus Calmette-Guerin

BDT - BigDye® Terminator

BGH - bovine growth hormone

CD - cluster of differentiation

CFP – culture filtrate protein

CMV - cytomegalovirus

CtxA1 - Active (A1) subunit of cholera toxin

CRM - cross-reacting material

DDA - dimethyldioctadecylammonium

DGAT - diacylglycerol acyltransferase

DIM - phthiocerol dimycocerosate

DosR - dormancy survival regulon

DNA - deoxyribonucleic acid

DTx - diphtheria toxin

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

EMEA - Europe, the Middle East and Africa

ESAT - early secreted antigenic target

FasL - Fas ligand

Fbp - fibronectin-binding protein

FDA - Food and Drug Administration

FITC - Fluorescein isothiocyanate

GLP - Good Laboratory Practice

HB-EGF - heparin binding EGF-like growth factor

HRP - horseradish peroxidase

HSI - Hoefler Scientific Instruments

HSP - heat shock protein

ICH - International Conference on Harmonisation

IEL - intraepithelial lymphocyte

Ig – immunoglobulin

IFN- γ (IFN-gamma, ИФН- γ) – interferon gamma

IL - interleukine

ILC - innate lymphoid cell

IS – insertion element

kb – kilobase

LAMP-1 - Lysosomal-associated membrane protein 1

LB - Luria Bertani

lg – decimal logarithm

log – logarithm

LY – lymphocytes

MCB - master cell bank

MDP - muramyl dipeptide

MHC - major histocompatibility complex

MPL – monophosphoryl lipid A

NK – natural killer

NKG2D - natural-killer group 2, member D

NKT - natural killer T cell

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development

PBS - phosphate buffered saline

PC - phycocyanin

PE - phycoerythrin

pH - лат. *pondus Hydrogenii*

pI - isoelectric point

PPD - Purified Protein Derivative

rBCG – recombinant Bacillus Calmette-Guerin

Rpf - resuscitation promoting factor

RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium

SDS - Sodium dodecyl sulfate

SEB - staphylococcal enterotoxin b

seq. - sequencing

SV40 - Simian virus 40

TAE - tris-acetate-EDTA

TAG - triacyl-glycerol

Taq - *Thermus aquaticus*

TB – tuberculosis

TcR – T-cell receptor

TDM - trehalose 6,6'-di-mycolate

Th – T-helper

TLR - Toll-like receptor

T_m – melting temperature

TNF - tumor necrosis factor

TPA - tissue-type plasminogen activator

TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand

WCB - working cell bank

WHO – World Health Organization

а.о. – аминокислотные остатки

АТФ – аденозин трифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

БЦЖ - сокращение от Бацилла Кальметта — Герена, фр. *Bacillus Calmette—Guérin*, BCG

В – Вольт

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

в/м - внутримышечно

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа

ГМО – генно-модифицированный организм

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксинуклеозид трифосфат

ед. - единицы

ИЛ-2 – интерлейкин-2

ИМАХ - иммобилизованная металлоаффинная хроматография

и/н - интраназально

ИПЛ - индекс поражения легких

ИПТГ - Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

ИТФ - изотахофорез

ИФА – иммуноферментный анализ

кВ - киловольт

кДа – килодальтон

кзк ДНК - ковалентно замкнутая кольцевая ДНК

КОЕ – колониеобразующие единицы

ЛУ – лекарственная устойчивость

МБТ - микобактерии туберкулеза

мг – миллиграмм

мин. – минута

мкг - микрограмм

мкл – микролитр

мл - миллилитр

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

мМ – миллимоль

мм - миллиметр

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

мсек - миллисекунда

МТК – микобактерии туберкулезного комплекса

нм - нанометр

НТУ - нитрилтриуксусная кислота

н.э. – наша эра

об. – оборот

ОЕ - оптическая единица

ОП - оптическая плотность

п/к - подкожно

п.о. – пара оснований

ПААГ – полиакриламидный гель

ПАСК - пара-аминосалициловая кислота

ПЗФ – показатель завершенности фагоцитоза

пмоль - пикомоль

ПТП – противотуберкулезный препарат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

сек. – секунда

см - сантиметр

СПИД - синдром приобретенного иммунного дефицита

СССР - Союз Советских Социалистических Республик

ТАЕ - tris-acetate EDTA

ТМБ - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

тыс. - тысяча

усл. - условный

УФ – ультрафиолет

ФА - фагоцитарная активность

ФЗ – Федеральный закон

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FRCPath V.K.M.M., MBBS A.K.A., PhD J.C.A.M. Robbins Basic Pathology: with STUDENT CONSULT Online Access, 9e. 9 edition. Philadelphia, PA: Saunders, 2012. 928 p.
2. ВОЗ | Туберкулез [Electronic resource] // WHO. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/ru/> (accessed: 24.09.2016).
3. WHO | Global tuberculosis report 2016 [Electronic resource] // WHO. URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed: 03.01.2017).
4. 07_Evans_GVIRF_TB_Vaccine_Progress.pdf.
5. van Eden W. et al. The mycobacterial 65 kD heat-shock protein and autoimmune arthritis // *Rheumatol. Int.* 1989. Vol. 9, № 3–5. P. 187–191.
6. Kim E.Y. et al. Modulation of Adjuvant Arthritis by Cellular and Humoral Immunity to Hsp65 // *Front. Immunol.* 2016. Vol. 7. P. 203.
7. Aagaard C., Dietrich J., Andersen P. Expanding the T Cell Repertoire to Include Subdominant Epitopes by Vaccination with Antigens Delivered as Protein Fragments or Peptide Cocktails: pat. WO2008000261 (A2) USA. 2008. № DK20060000861 20060628.
8. Jes D., Andersen P., Aagaard C. Improved Tuberculosis Vaccines: pat. WO2005061534 (A2) USA. 2005. № DK20030001942 20031223.
9. Andersen P., Skjot R.L.V., Skjoet R.L.V. M. tuberculosis antigens: pat. US2003147897 (A1) USA. 2003. № US20010804980 20010313; DK19970001277 19971110; DK19970000376 19970402; DK19930000798 19930702; WO1994DK00273 19940701; US19990289388 19990412; US19950465640 19950605; US19930123182 19930920; US19970044624P 19970418; US19980070488P 19980105; US20010791171 20010220; US19980246191 19981230; US19980050739 19980330.
10. Aagaard C. et al. Tuberculosis Vaccines Comprising Antigens Expressed During the Latent Infection Phase: pat. US2011206713 (A1) USA. 2011. № US201113101980 20110505; DK20050000924 20050623; DK20050001393 20051005; US20080993199 20080725; WO2006DK00356 20060620.
11. Aagaard C., Vingsbo-Lundberg C., Andersen P. Tuberculosis Vaccines Comprising Antigens Expressed During the Latent Infection Phase: pat. US2009186048 (A1) USA. 2009. № DK20050000924 20050623; DK20050001393 20051005; WO2006DK00356 20060620.
12. Aagaard C. et al. Tuberculosis Vaccines Comprising Antigens Expressed During the Latent Infection Phase: pat. US2012114687 (A1) USA. 2012. № US201113335133 20111222; DK20050000924 20050623; DK20050001393 20051005; US201113101980 20110505; US20080993199 20080725; WO2006DK00356 20060620.

13. Aagaard C. et al. Tuberculosis Vaccines Comprising Antigens Expressed During the Latent Infection Phase: pat. US2013095132 (A1) USA. 2013. № US201213623733 20120920; DK20050000924 20050623; DK20050001393 20051005; US201113335133 20111222; US201113101980 20110505; US20080993199 20080725; WO2006DK00356 20060620.
14. Heath A., De L. Tb Vaccine: pat. WO2010034974 (A2) USA. 2010. № GB20080017480 20080924; GB20090010001 20090611.
15. Tupin E. et al. Mycobacterial Antigen Vaccine: pat. WO2014009438 (A2) USA. 2014. № EP20120305825 20120710; EP20120306539 20121207; EP20130305737 20130603.
16. Салон «Архимед» | Салон изобретений [Electronic resource] // Салон «Архимед». URL: <http://www.archimedes.ru/> (accessed: 09.11.2017).
17. Jones L.S. et al. Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 14. P. 13406–13414.
18. РАДОЧИНА Т.Н., КИМ К.В. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ СИСТЕМЫ ПРОФИЛАКТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА: ПЕНИТЕНЦИАРНЫЙ АСПЕКТ // ЧЕЛОВЕК: ПРЕСТУПЛЕНИЕ И НАКАЗАНИЕ. 2012. № 3. P. 113–117.
19. Мишин В.Ю., Григорьев Ю.Г., Митронин А.В. Фтизиопульмонология: Учебник. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 504 p.
20. ДОРОЖКОВА И.Р. ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУБЕРКУЛЕЗА: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ИЗУЧЕНИЯ. 2012. Vol. 89, № 3. P. 003-014.
21. gtbr15_main_text.pdf.
22. WHO | Tuberculosis mortality nearly halved since 1990 [Electronic resource] // WHO. URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/tuberculosis-mortality/en/> (accessed: 23.09.2016).
23. Raviglione M.C. The new Stop TB Strategy and the Global Plan to Stop TB, 2006–2015 // Bull. World Health Organ. 2007. Vol. 85, № 5. P. 327.
24. epid_situaciya_2014.pdf.
25. Global_TB_Facts.pdf.
26. Tsukamura M., Mizuno S., Toyama H. Taxonomic studies on the Mycobacterium tuberculosis series // Microbiol. Immunol. 1985. Vol. 29, № 4. P. 285–299.
27. van Soolingen D. et al. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. Vol. 47, № 4. P. 1236–1245.
28. Wayne L.G., Hayes L.G. An in vitro model for sequential study of shutdown of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence // Infect. Immun. 1996. Vol. 64, № 6. P. 2062–2069.

29. Аксенова В.А., Перельмана А.А.С. Баринов В.С. и др. / Под ред М.И. Фтизиатрия: нац. рук. ГЭОТАР-Медиа, 2010. 513 p.
30. Kelkar D.S. et al. Proteogenomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* by high resolution mass spectrometry // *Mol. Cell. Proteomics MCP*. 2011. Vol. 10, № 12. P. M111.011627.
31. Cole S.T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature*. 1998. Vol. 393, № 6685. P. 537–544.
32. Fleischmann R.D. et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains // *J. Bacteriol.* 2002. Vol. 184, № 19. P. 5479–5490.
33. Miyoshi-Akiyama T. et al. Complete Annotated Genome Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman // *J. Bacteriol.* 2012. Vol. 194, № 10. P. 2770.
34. North R.J., Izzo A.A. *Mycobacterial virulence*. Virulent strains of *Mycobacteria tuberculosis* have faster in vivo doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence and absence of specific immunity // *J. Exp. Med.* 1993. Vol. 177, № 6. P. 1723–1733.
35. Cole S.T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature*. 1998. Vol. 393, № 6685. P. 537–544.
36. Mahairas G.G. et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis* // *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178, № 5. P. 1274–1282.
37. Fan X., Abd Alla A.A.E., Xie J. Distribution and function of prophage phiRv1 and phiRv2 among *Mycobacterium tuberculosis* complex // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016. Vol. 34, № 2. P. 233–238.
38. Behr M.A. et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray // *Science*. 1999. Vol. 284, № 5419. P. 1520–1523.
39. Fortin A. et al. Host Genetics of *Mycobacterial* Diseases in Mice and Men: Forward Genetic Studies of BCG-osis and Tuberculosis // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2007. Vol. 8, № 1. P. 163–192.
40. Hsu T. et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Vol. 100, № 21. P. 12420–12425.
41. Mahairas G.G. et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis* // *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178, № 5. P. 1274–1282.
42. Gordon S.V. et al. Genomics of *Mycobacterium bovis* // *Tuberc. Edinb. Scotl.* 2001. Vol. 81, № 1–2. P. 157–163.
43. Behr M.A., Small P.M. A historical and molecular phylogeny of BCG strains // *Vaccine*. 1999. Vol. 17, № 7–8. P. 915–922.

44. Hsu T. et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Vol. 100, № 21. P. 12420–12425.
45. Renshaw P.S. et al. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 24. P. 21598–21603.
46. Bermudez L.E. et al. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells // *Infect. Immun.* 2002. Vol. 70, № 1. P. 140–146.
47. Pan Y. et al. Whole-Genome Sequences of Four *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine Strains ▽ // *J. Bacteriol.* 2011. Vol. 193, № 12. P. 3152–3153.
48. Ludannyy R. et al. Whole-Genome Sequence of *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia) // *Genome Announc.* 2015. Vol. 3, № 6.
49. Wade M.M., Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2004. Vol. 9. P. 975–994.
50. Somoskovi A., Parsons L.M., Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* // *Respir. Res.* 2001. Vol. 2, № 3. P. 164–168.
51. Jarlier V., Nikaido H. *Mycobacterial* cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. Vol. 123, № 1–2. P. 11–18.
52. Kwon H.H., Tomioka H., Saito H. Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms // *Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 1995. Vol. 76, № 2. P. 141–148.
53. Segura C. et al. Contribution of beta-lactamases to beta-lactam susceptibilities of susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. Vol. 42, № 6. P. 1524–1526.
54. Cole S.T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature.* 1998. Vol. 393, № 6685. P. 537–544.
55. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 2009. Vol. 13, № 11. P. 1320–1330.
56. Crawford J.T., Cave M.D., Bates J.H. Characterization of plasmids from strains of *Mycobacterium avium-intracellulare* // *Rev. Infect. Dis.* 1981. Vol. 3, № 5. P. 949–952.

57. Martin C. et al. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria // *Nature*. 1990. Vol. 345, № 6277. P. 739–743.
58. Vareldzis B.P. et al. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations // *Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 1994. Vol. 75, № 1. P. 1–7.
59. Mascart F., Loch C. Integrating knowledge of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis for the design of better vaccines // *Expert Rev. Vaccines*. 2015. Vol. 14, № 12. P. 1573–1585.
60. Hernández-Pando R. et al. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection // *Lancet Lond. Engl.* 2000. Vol. 356, № 9248. P. 2133–2138.
61. Neyrolles O. et al. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? // *PLoS One*. 2006. Vol. 1. P. e43.
62. Mehta P.K. et al. Comparison of in vitro models for the study of *Mycobacterium tuberculosis* invasion and intracellular replication // *Infect. Immun.* 1996. Vol. 64, № 7. P. 2673–2679.
63. Lin Y., Zhang M., Barnes P.F. Chemokine Production by a Human Alveolar Epithelial Cell Line in Response to *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immun.* 1998. Vol. 66, № 3. P. 1121–1126.
64. Ryndak M.B. et al. Transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* replicating in type II alveolar epithelial cells // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 4. P. e0123745.
65. Delogu G. et al. The *hbhA* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is specifically upregulated in the lungs but not in the spleens of aerogenically infected mice // *Infect. Immun.* 2006. Vol. 74, № 5. P. 3006–3011.
66. Pethe K. et al. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination // *Nature*. 2001. Vol. 412, № 6843. P. 190–194.
67. Bermudez L.E. et al. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells // *Infect. Immun.* 2002. Vol. 70, № 1. P. 140–146.
68. Dobos K.M. et al. Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation // *Infect. Immun.* 2000. Vol. 68, № 11. P. 6300–6310.
69. Kang P.B. et al. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis // *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 202, № 7. P. 987–999.
70. van der Wel N. et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells // *Cell*. 2007. Vol. 129, № 7. P. 1287–1298.

71. Schlesinger L.S. et al. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3 // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 1990. Vol. 144, № 7. P. 2771–2780.
72. Weikert L.F. et al. Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000. Vol. 279, № 2. P. L216-223.
73. Дунаева Ю.Г. ЗДОРОВЬЕ КАК МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕСУРС: ИСТОРИЯ БОРЬБЫ С МИРОВЫМИ ЭПИДЕМИЯМИ. Москва: Общество с ограниченной ответственностью “АР-Консалт” (Люберцы), 2015. P. 96–109.
74. Гиппократ. Сочинения. / trans. Руднева В.И. Москва: Сварог, 1994. Vol. 1. 736 p.
75. Дженнер и прививки. Странная глава истории медицины :: Чарльз Крейтон — Прививки — Прививки: факты и мнения [Electronic resource]. URL: <http://www.1796kotok.com/vaccines/opinions/creighton/creighton14.htm> (accessed: 20.10.2016).
76. Younger D.S., Younger A.P.J., Guttmacher S. Childhood Vaccination: Implications for Global and Domestic Public Health // *Neurol. Clin.* 2016. Vol. 34, № 4. P. 1035–1047.
77. Таточенко В.К., Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С. ВАКЦИНАЦИЯ: ОТ ИСТОКОВ ДО СОЗДАНИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЦЕНТРА // МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ. ОЦЕНКА И ВЫБОР. 2011. № 2. P. 108–111.
78. Мешкова Р.Я. Руководство по иммунопрофилактике для врачей. Санкт-Петербург: Бином, 2000. 152 p.
79. Manivannan S., Rao N.V., Ramanathan V.D. Role of complement activation and antibody in the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and human macrophages // *Indian J. Exp. Biol.* 2012. Vol. 50, № 8. P. 542–550.
80. Brandtzaeg P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity // *J. Oral Microbiol.* 2013. Vol. 5.
81. Kurbatava.pdf.
82. Allen C.D., Okada T., Cyster J.G. Germinal Center Organization and Cellular Dynamics // *Immunity.* 2007. Vol. 27, № 2. P. 190–202.
83. How Vaccines Work | History of Vaccines [Electronic resource]. URL: <http://www.historyofvaccines.org/content/how-vaccines-work> (accessed: 27.11.2016).
84. Kumar S.K., Singh P., Sinha S. Naturally produced opsonizing antibodies restrict the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages by augmenting phagosome maturation // *Open Biol.* 2015. Vol. 5, № 12. P. 150171.
85. Описание Вакцина туберкулезная для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М) (*Vaccinum tuberculosis (BCG-M) cryodesiccatum*) - Энциклопедия РЛС: инструкция по

- применению препарата Вакцина туберкулезная для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М) и состав, отзывы, противопоказания [Electronic resource]. URL: http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_8621.htm (accessed: 27.11.2016).
86. АКСЕНОВА В.А. et al. Противотуберкулезная вакцинация в современных условиях: значение и проблемы // ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА. 2008. № 2 (39). P. 40–47.
87. Hawkrigde A. et al. Efficacy of percutaneous versus intradermal BCG in the prevention of tuberculosis in South African infants: randomised trial // *BMJ*. 2008. Vol. 337. P. a2052.
88. Hickling J.K. et al. Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges // *Bull. World Health Organ*. 2011. Vol. 89, № 3. P. 221–226.
89. Banu A., Loganathan E. Inadvertent Intramuscular Administration of High Dose Bacillus Calmette Guerin Vaccine in a Pre-term Infant // *J. Fam. Med. Prim. Care*. 2013. Vol. 2, № 1. P. 95–97.
90. Gross S. et al. Adverse reactions to accidental forearm injection of Bacille Calmette-Guerin vaccine in schoolchildren: 12-month cohort follow-up // *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am*. 2004. Vol. 38, № 10. P. 1495–1497.
91. Yarmohammadi A. et al. Results of inadvertent administration of bacillus Calmette-Guerin for treatment of transitional cell carcinoma of bladder // *Urol. J*. 2007. Vol. 4, № 2. P. 121–122.
92. Стукова А.А. et al. ПРОФИЛАКТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ВАКЦИН // *Вестник Российской Академии Медицинских Наук*. 2012. Vol. 67, № 11. P. 45–52.
93. Haile M., Källenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines // *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2005. Vol. 18, № 3. P. 211–215.
94. Russell D.G., Barry C.E., Flynn J.L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us // *Science*. 2010. Vol. 328, № 5980. P. 852–856.
95. BCG_8May2008_RU.pdf.
96. Rodrigues L.C. et al. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial // *Lancet Lond. Engl*. 2005. Vol. 366, № 9493. P. 1290–1295.
97. Netea M.G. et al. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense // *Nat. Immunol*. 2015. Vol. 16, № 7. P. 675–679.
98. Kleinnijenhuis J. et al. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection // *Clin. Immunol. Orlando Fla*. 2014. Vol. 155, № 2. P. 213–219.
99. Arts R.J.W. et al. Long-term in vitro and in vivo effects of γ -irradiated BCG on innate and adaptive immunity // *J. Leukoc. Biol*. 2015. Vol. 98, № 6. P. 995–1001.

100. Orme I.M. Vaccine development for tuberculosis: current progress // *Drugs*. 2013. Vol. 73, № 10. P. 1015–1024.
101. McShane H. Tuberculosis vaccines: beyond bacille Calmette-Guerin // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2011. Vol. 366, № 1579. P. 2782–2789.
102. Andersen P., Kaufmann S.H.E. Novel vaccination strategies against tuberculosis // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014. Vol. 4, № 6.
103. Seder R.A., Hill A.V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity // *Nature*. 2000. Vol. 406, № 6797. P. 793–798.
104. Casadevall A. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle // *Infect. Immun.* 2003. Vol. 71, № 8. P. 4225–4228.
105. Casadevall A., Pirofski L.-A. A new synthesis for antibody-mediated immunity // *Nat. Immunol.* 2011. Vol. 13, № 1. P. 21–28.
106. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. Vol. 8, № 1. P. 34–47.
107. Amigorena S., Bonnerot C. Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules // *Semin. Immunol.* 1999. Vol. 11, № 6. P. 385–390.
108. Kozakiewicz L. et al. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. Vol. 783. P. 225–250.
109. Lund F.E., Randall T.D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. Vol. 10, № 4. P. 236–247.
110. Maglione P.J., Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* // *Eur. J. Immunol.* 2009. Vol. 39, № 3. P. 676–686.
111. Chan J. et al. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Semin. Immunol.* 2014. Vol. 26, № 6. P. 588–600.
112. Achkar J.M., Casadevall A. Antibody-mediated immunity against tuberculosis: implications for vaccine development // *Cell Host Microbe*. 2013. Vol. 13, № 3. P. 250–262.
113. Glatman-Freedman A. The role of antibody-mediated immunity in defense against *Mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy // *Tuberc. Edinb. Scotl.* 2006. Vol. 86, № 3–4. P. 191–197.
114. СУПОТНИЦКИЙ М.В. Феномен антигенного импринтинга в эпидемических, инфекционных и поствакцинальных процессах // **БИОПРЕПАРАТЫ ПРОФИЛАКТИКА ДИАГНОСТИКА ЛЕЧЕНИЕ**. 2014. № 3 (51). P. 27–39.
115. СУПОТНИЦКИЙ М.В. «Забытая» иммунология эпидемических, инфекционных и поствакцинальных процессов // **НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ**. 2014. № 11–12 (505–506). P. 16–20_m.

116. TBVaccines Pipeline.pdf.
117. СУПОТНИЦКИЙ М.В. Генетические ограничения эффективности и безопасности массовых вакцинаций населения // НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ. 2015. № 14 (552). P. 18–23_m.
118. Wallace M.J. et al. Antibody-dependent enhancement of Murray Valley encephalitis virus virulence in mice // *J. Gen. Virol.* 2003. Vol. 84, № Pt 7. P. 1723–1728.
119. Thomas H.I. et al. Differential maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1 // *Clin. Exp. Immunol.* 1996. Vol. 103, № 2. P. 185–191.
120. Han J.-F. et al. Antibody dependent enhancement infection of enterovirus 71 in vitro and in vivo // *Virol. J.* 2011. Vol. 8. P. 106.
121. СУПОТНИЦКИЙ М.В. Антитела в инфекционных и эпидемических процессах // НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ. 2013. № 8 (456). P. 10–13.
122. Adalja A.A., Henderson D.A. Original Antigenic Sin and Pandemic (H1N1) 2009 // *Emerg. Infect. Dis.* 2010. Vol. 16, № 6. P. 1028–1029.
123. 66000.pdf.
124. 2dc6d0011903e7b015f9b25389984535.pdf.
125. The Basics [Electronic resource] // National Institutes of Health (NIH). 2015. URL: <https://www.nih.gov/health-information/nih-clinical-research-trials-you/basics> (accessed: 04.01.2017).
126. Hess J. et al. Mycobacterium bovis bacille Calmette–Guérin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. Vol. 95, № 9. P. 5299–5304.
127. Didierlaurent A.M. et al. Enhancement of adaptive immunity by the human vaccine adjuvant AS01 depends on activated dendritic cells // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2014. Vol. 193, № 4. P. 1920–1930.
128. Ford von Reyn et al. Polyantigenic DAR-901: An inactivated whole cell vaccine for prevention of tuberculosis // *Tuberculosis Vaccines Third Global Forum.* 2014.
129. Vilaplana C. et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI // *Vaccine.* 2010. Vol. 28, № 4. P. 1106–1116.
130. Duthie M.S. et al. Protection against *Mycobacterium leprae* infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis // *Infect. Immun.* 2014. Vol. 82, № 9. P. 3979–3985.
131. Arbues A. et al. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials // *Vaccine.* 2013. Vol. 31, № 42. P. 4867–4873.

132. Satti I. et al. Safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine MVA85A delivered by aerosol in BCG-vaccinated healthy adults: a phase 1, double-blind, randomised controlled trial // *Lancet Infect. Dis.* 2014. Vol. 14, № 10. P. 939–946.
133. Sun R., Hone D., Sadoff J. Electroporation of Mycobacterium and Overexpression of Antigens in Mycobacteria: pat. WO2008150969 (A1) USA. 2008. № US20070755768 20070531.
134. Sadoff J., Alyahya A. Therapeutic Vaccination Against Active Tuberculosis: pat. US2013171193 (A1) USA. 2013. № US201113822593 20110919; EP20100177667 20100920; US20100403751P 20100920; WO2011EP66183 20110919.
135. Havenga M. et al. Multivalent Vaccines Comprising Recombinant Viral Vectors: pat. WO2006053871 (A2) USA. 2006. № US20040628253P 20041116; EP20040106074 20041125; US20050651113P 20050208.
136. You Q. et al. Novel tuberculosis vaccine and combined vaccine thereof: pat. CN102816779 (A) USA. 2012. № CN20111153739 20110609.
137. Xiong S. et al. Polyepitope tuberculosis gene vaccine and its prepn process: pat. CN101088559 (A) USA. 2007. № CN2006127572 20060612.
138. Xu W. et al. Tuberculosis gene vaccine assembled by chitosan delivery system and preparation method and use thereof: pat. CN101455846 (A) USA. 2009. № CN20071172046 20071211.
139. Li Z. et al. Mycobacterium Tuberculosis Ag85ab Chimeric Gene Vaccine, Its Preparation Method and Application: pat. WO2011150745 (A1) USA. 2011. № CN20101191243 20100603.
140. Zhu B. et al. Method for Preparing Fusion Protein of Mycobacterium Tuberculosis Antigens and Uses Thereof: pat. WO2012088739 (A1) USA. 2012. № CN20101613320 20101229.
141. Aagaard C., Vingsbo-Lundberg C., Andersen P. Improved Tuberculosis Vaccines: pat. WO2006136162 (A2) USA. 2006. № DK20050000924 20050623; DK20050001393 20051005.
142. Andersen P., Skjot R.L.V. Tuberculosis vaccine and diagnostics based on the Mycobacterium tuberculosis sat-6 gene family: pat. US7867502 (B1) USA. 2011. № DK19990001020 19990713; US19990144011P 19990715; US20000615947 20000713; US20030723908 20031126.
143. Coupet C.A., Inchaupse G., Marchand J.-B. Mycobacterium Resuscitation Promoting Factor for Use as Adjuvant: pat. WO2014009433 (A1) USA. 2014. № EP20120305826 20120710.
144. Klein M. et al. Methods and Means for Diagnostics, Prevention and Treatment of Mycobacterium Infections and Tuberculosis Disease: pat. WO2006104389 (A1) USA. 2006. № EP20050075748 20050331.
145. Pearson C.M., Wood F.D. Studies of Arthritis and Other Lesions Induced in Rats by the Injection of Mycobacterial Adjuvant // *Am. J. Pathol.* 1963. Vol. 42, № 1. P. 73–95.

146. Tchilian E. et al. Immunization with different formulations of Mycobacterium tuberculosis antigen 85A induces immune responses with different specificity and protective efficacy // *Vaccine*. 2013. Vol. 31, № 41. P. 4624–4631.
147. СЕРГИЕНКО Е.Н., GERMANENKO И.Г., ЛИСИЦКАЯ Т.И. Особенности течения аденовирусной инфекции у иммунокомпромированных детей // *МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ*. 2009. № 1 (27). P. 137–139.
148. Redfield R.R. et al. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease // *N. Engl. J. Med.* 1987. Vol. 316, № 11. P. 673–676.
149. Mascola L. et al. Surveillance of listeriosis in Los Angeles County, 1985-1986. A first year's report // *Arch. Intern. Med.* 1989. Vol. 149, № 7. P. 1569–1572.
150. Encinales L. et al. Humoral immunity in tuberculin skin test anergy and its role in high-risk persons exposed to active tuberculosis // *Mol. Immunol.* 2010. Vol. 47, № 5. P. 1066.
151. Lin H. et al. Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA // *Circulation*. 1990. Vol. 82, № 6. P. 2217–2221.
152. Kitsis R.N. et al. Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991. Vol. 88, № 10. P. 4138–4142.
153. Hansen E. et al. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 290, № 1–2. P. 73–76.
154. Jiao S. et al. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo // *Hum. Gene Ther.* 1992. Vol. 3, № 1. P. 21–33.
155. Wolff J.A. et al. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle // *Hum. Mol. Genet.* 1992. Vol. 1, № 6. P. 363–369.
156. Gray D., Matzinger P. T cell memory is short-lived in the absence of antigen // *J. Exp. Med.* 1991. Vol. 174, № 5. P. 969–974.
157. Oehen S. et al. Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen // *J. Exp. Med.* 1992. Vol. 176, № 5. P. 1273–1281.
158. Liu M. et al. A Polynucleotide Tuberculosis Vaccine a Polynucleotide Tuberculosis Vaccine: pat. WO9615241 (A2) USA. 1996. № US19940338992 19941114.
159. Hartikka J. et al. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle // *Hum. Gene Ther.* 1996. Vol. 7, № 10. P. 1205–1217.
160. Multivalent Vaccines Comprising Recombinant Viral Vectors: pat. EA012037 (B1) USA. 2007. № US20040628253P 20041116 ; EP20040106074 20041125 ; US20050651113P 20050208 ; WO2005EP55984 20051115.

161. Song L. et al. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs // *PloS One*. 2008. Vol. 3, № 5. P. e2257.
162. Wang B.-Z. et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses // *J. Virol*. 2008. Vol. 82, № 23. P. 11813–11823.
163. Pal P.G., Horwitz M.A. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis // *Infect. Immun*. 1992. Vol. 60, № 11. P. 4781–4792.
164. Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins // *Infect. Immun*. 1994. Vol. 62, № 6. P. 2536–2544.
165. Collins F.M. The immune response to mycobacterial infection: development of new vaccines // *Vet. Microbiol*. 1994. Vol. 40, № 1–2. P. 95–110.
166. Wiker H.G., Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiol. Rev*. 1992. Vol. 56, № 4. P. 648–661.
167. Liu M. et al. A Polynucleotide Tuberculosis Vaccine a Polynucleotide Tuberculosis Vaccine: pat. WO9615241 (A2) USA. 1996. № US19940338992 19941114.
168. McGhee J.R. et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development // *Vaccine*. 1992. Vol. 10, № 2. P. 75–88.
169. Soloff A.C., Barratt-Boyes S.M. Enemy at the gates: dendritic cells and immunity to mucosal pathogens // *Cell Res*. 2010. Vol. 20, № 8. P. 872–885.
170. Belisle J.T. et al. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis // *Science*. 1997. Vol. 276, № 5317. P. 1420–1422.
171. Pabreja S. et al. Mucosal vaccination against tuberculosis using Ag85A-loaded immunostimulating complexes // *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol*. 2014. P. 1–8.
172. Dover L.G. et al. Regulation of cell wall synthesis and growth // *Curr. Mol. Med*. 2007. Vol. 7, № 3. P. 247–276.
173. Tang X., Deng W., Xie J. Novel insights into *Mycobacterium* antigen Ag85 biology and implications in countermeasures for *M. tuberculosis* // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. 2012. Vol. 22, № 3. P. 179–187.
174. Huygen K. The Immunodominant T-Cell Epitopes of the Mycolyl-Transferases of the Antigen 85 Complex of *M. tuberculosis* // *Front. Immunol*. 2014. Vol. 5. P. 321.
175. Liu J. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus // *Emerg. Infect. Dis*. 2005. Vol. 11, № 8. P. 1331–1331.

176. Schmidt-Schultz T.H., Schultz M. AG 85, a major secretion protein of *Mycobacterium tuberculosis*, can be identified in ancient bone // *Tuberc. Edinb. Scotl.* 2015. Vol. 95 Suppl 1. P. S87-92.
177. Brosch R. et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 13. P. 5596–5601.
178. Kassa D. et al. Analysis of Immune Responses against a Wide Range of *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis // *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. Vol. 19, № 12. P. 1907–1915.
179. Skjõt R.L. et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens // *Infect. Immun.* 2000. Vol. 68, № 1. P. 214–220.
180. Kassa D. et al. Analysis of immune responses against a wide range of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with active pulmonary tuberculosis // *Clin. Vaccine Immunol. CVI.* 2012. Vol. 19, № 12. P. 1907–1915.
181. Liu S. et al. Recombinant TB10.4 of *Mycobacterium bovis* induces cytokine production in RAW264.7 macrophages through activation of the MAPK and NF- κ B pathways via TLR2 // *Mol. Immunol.* 2014. Vol. 62, № 1. P. 227–234.
182. Meckert P.C. et al. *Trypanosoma cruzi*: aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules in skeletal and heart muscle cells of chronically infected mice // *Exp. Parasitol.* 1991. Vol. 72, № 1. P. 8–14.
183. Hohlfeld R., Engel A.G. The immunobiology of muscle // *Immunol. Today.* 1994. Vol. 15, № 6. P. 269–274.
184. Mantegazza R., Bernasconi P. Cellular aspects of myositis // *Curr. Opin. Rheumatol.* 1994. Vol. 6, № 6. P. 568–574.
185. Parker S.E. et al. Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits // *Hum. Gene Ther.* 1999. Vol. 10, № 5. P. 741–758.
186. Manthorpe M. et al. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice // *Hum. Gene Ther.* 1993. Vol. 4, № 4. P. 419–431.
187. Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6 // *EMBO J.* 1997. Vol. 16, № 9. P. 2482–2492.
188. Frelin L. et al. Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene // *Gene Ther.* 2004. Vol. 11, № 6. P. 522–533.

189. Montgomery D.L. et al. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors // *DNA Cell Biol.* 1993. Vol. 12, № 9. P. 777–783.
190. Norman J.A. et al. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications // *Vaccine.* 1997. Vol. 15, № 8. P. 801–803.
191. Saade F., Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines // *Expert Rev. Vaccines.* 2012. Vol. 11, № 2. P. 189–209.
192. Sheets R.L. et al. Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts // *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 2006. Vol. 91, № 2. P. 610–619.
193. Sheets R.L. et al. Toxicological safety evaluation of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar despite differing plasmid backbones or gene-inserts // *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 2006. Vol. 91, № 2. P. 620–630.
194. McDermott P.F. et al. High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation // *Infect. Immun.* 2000. Vol. 68, № 10. P. 5525–5529.
195. Means T.K. et al. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2003. Vol. 170, № 10. P. 5165–5175.
196. Baker S. et al. A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella Typhi* // *PLoS Pathog.* 2007. Vol. 3, № 5. P. e59.
197. АБАТУРОВ А.Е., ВОЛОСОВЕЦ А.П., ЮЛИШ Е.И. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 4. Внутриклеточные сигнальные пути Tlr // *ЗДОРОВЬЕ РЕБЕНКА.* 2012. № 8 (43). P. 163–167.
198. Leka O. et al. Diphtheria toxin conformational switching at acidic pH // *FEBS J.* 2014. Vol. 281, № 9. P. 2115–2122.
199. Pappenheimer A.M. et al. Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells // *J. Infect. Dis.* 1982. Vol. 145, № 1. P. 94–102.
200. Bryant K.A. et al. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine // *Pediatrics.* 2010. Vol. 125, № 5. P. 866–875.
201. Jefferies J.M.C. et al. 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) // *Hum. Vaccin.* 2011. Vol. 7, № 10. P. 1012–1018.

202. Gill C.J. et al. Persistence of immune responses after a single dose of Novartis meningococcal serogroup A, C, W-135 and Y CRM-197 conjugate vaccine (Menveo®) or Menactra® among healthy adolescents // *Hum. Vaccin.* 2010. Vol. 6, № 11. P. 881–887.
203. Hwang K.W. Haemophilus influenza type b (Hib) vaccine and its carrier proteins // *Arch. Pharm. Res.* 2010. Vol. 33, № 6. P. 793–795.
204. Blanchard-Rohner G. et al. The B-cell response to a primary and booster course of MenACWY-CRM₁₉₇ vaccine administered at 2, 4 and 12 months of age // *Vaccine.* 2013. Vol. 31, № 20. P. 2441–2448.
205. Shinefield H.R. Overview of the development and current use of CRM(197) conjugate vaccines for pediatric use // *Vaccine.* 2010. Vol. 28, № 27. P. 4335–4339.
206. Safari D. et al. Antibody- and cell-mediated immune responses to a synthetic oligosaccharide conjugate vaccine after booster immunization // *Vaccine.* 2011. Vol. 29, № 38. P. 6498–6504.
207. Zhang H.-L. et al. A novel combined conjugate vaccine: enhanced immunogenicity of bFGF with CRM197 as a carrier protein // *Mol. Med. Rep.* 2011. Vol. 4, № 5. P. 857–863.
208. Huang H.-Y., Luther S.A. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs // *Semin. Immunol.* 2012. Vol. 24, № 3. P. 175–189.
209. Roifman C.M. et al. A partial deficiency of interleukin-7R alpha is sufficient to abrogate T-cell development and cause severe combined immunodeficiency // *Blood.* 2000. Vol. 96, № 8. P. 2803–2807.
210. Симбирцев А.С. Достижения и перспективы использования рекомбинантных цитокинов в клинической практике // *МЕДИЦИНСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ.* 2013. Vol. 13, № 1. P. 7–21.
211. Rao M. et al. The Tuberculosis Vaccine Candidate Bacillus Calmette-Guérin ΔureC::hly Coexpressing Human Interleukin-7 or -18 Enhances Antigen-Specific T Cell Responses in Mice // *PLoS ONE* / ed. Cardona P.-J. 2013. Vol. 8, № 11. P. e78966.
212. Glaziou P. et al. Global epidemiology of tuberculosis // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014. Vol. 5, № 2. P. a017798.
213. Kool M. et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2008. Vol. 181, № 6. P. 3755–3759.
214. Li H., Nookala S., Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2007. Vol. 178, № 8. P. 5271–5276.
215. Lindblad E.B. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect // *Vaccine.* 2004. Vol. 22, № 27–28. P. 3658–3668.

216. al-Shakhshir R.H. et al. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants // *Vaccine*. 1995. Vol. 13, № 1. P. 41–44.
217. Hem S.L., White J.L. Structure and properties of aluminum-containing adjuvants // *Pharm. Biotechnol.* 1995. Vol. 6. P. 249–276.
218. Iyer S., HogenEsch H., Hem S.L. Effect of the degree of phosphate substitution in aluminum hydroxide adjuvant on the adsorption of phosphorylated proteins // *Pharm. Dev. Technol.* 2003. Vol. 8, № 1. P. 81–86.
219. Morefield G.L. et al. Distribution of adsorbed antigen in mono-valent and combination vaccines // *Vaccine*. 2004. Vol. 22, № 15–16. P. 1973–1984.
220. Art J.-F., Vander Straeten A., Dupont-Gillain C.C. NaCl strongly modifies the physicochemical properties of aluminum hydroxide vaccine adjuvants // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 517, № 1–2. P. 226–233.
221. Yau K.P. et al. Aluminum hydroxide adjuvant produced under constant reactant concentration // *J. Pharm. Sci.* 2006. Vol. 95, № 8. P. 1822–1833.
222. Crépeaux G. et al. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity // *Toxicology*. 2017. Vol. 375. P. 48–57.
223. Amini Y., Moradi B., Fasihi-Ramandi M. Aluminum hydroxide nanoparticles show strong activity to stimulate Th-1 immune response against tuberculosis // *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 2016. P. 1–5.
224. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения [Electronic resource]. URL: <http://www.roszdravnadzor.ru/drugs/controllslp> (accessed: 07.01.2017).
225. Quality Guidelines : ICH [Electronic resource]. URL: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> (accessed: 07.01.2017).
226. Safety Guidelines : ICH [Electronic resource]. URL: <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html> (accessed: 07.01.2017).
227. M6_Final_concept_paper_Shedding.pdf.
228. Andersson S. et al. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, № 14. P. 8222–8229.
229. Boshart M. et al. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus // *Cell*. 1985. Vol. 41, № 2. P. 521–530.

230. Nelson J.A., Reynolds-Kohler C., Smith B.A. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. // *Mol. Cell. Biol.* 1987. Vol. 7, № 11. P. 4125–4129.
231. Goodwin E.C., Rottman F.M. The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, № 23. P. 16330–16334.
232. Lopez P.J. et al. The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo // *Mol. Microbiol.* 1999. Vol. 33, № 1. P. 188–199.
233. Kido M. et al. RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in Escherichia coli // *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178, № 13. P. 3917–3925.
234. Правила лабораторной практики [Electronic resource] // Российская газета. URL: <https://rg.ru/2010/10/22/laboratornaya-praktika-dok.html> (accessed: 08.03.2017).
235. Saiki R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science*. 1988. Vol. 239, № 4839. P. 487–491.
236. Morrison S.L. Transformation of E. coli by electroporation // *Curr. Protoc. Immunol.* 2001. Vol. Appendix 3. P. Appendix 3N.
237. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // *Protein Expr. Purif.* 2005. Vol. 41, № 1. P. 207–234.
238. Q5D_Guideline.pdf.
239. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977. Vol. 74, № 12. P. 5463–5467.
240. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование [1984, DJVU] [Electronic resource]. URL: <http://mol-biol.ru/books/metody-geneticheskoy-inzhenerii-molekulyarnoe-klonirovanie-maniatis-t-frich-e-sembruk-dzh-1984> (accessed: 08.03.2017).
241. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
242. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
243. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
244. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs // *Nucleic Acids Res.* 1987. Vol. 15, № 20. P. 8125–8148.

245. Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control // *J. Cell Biol.* 1991. Vol. 115, № 4. P. 887–903.
246. Kozak M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. Vol. 87, № 21. P. 8301–8305.
247. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. Медицина. Москва, 1975. 297 p.
248. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Ленинград: Медицина, Ленинградское отделение. 1978. 296 p.
249. Chan Kwo Chion C.K., Askew S.E., Leak D.J. Cloning, Expression, and Site-Directed Mutagenesis of the Propene Monooxygenase Genes from *Mycobacterium* sp. Strain M156 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 71, № 4. P. 1909–1914.
250. Aida Gholoobi et al. Molecular Cloning, Expression and Purification of Protein TB10.4 Secreted by *Mycobacterium Tuberculosis* // *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2010. Vol. 13, № 4. P. 189–193.
251. Shi S. et al. Rational design of multiple TB antigens TB10.4 and TB10.4-Ag85B as subunit vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis* // *Pharm. Res.* 2010. Vol. 27, № 2. P. 224–234.
252. Fan X., Gao Q., Fu R. Differential immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines expressing proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model // *Microbiol. Res.* 2009. Vol. 164, № 4. P. 374–382.
253. Kutzler M.A., Weiner D.B. DNA vaccines: ready for prime time? // *Nat. Rev. Genet.* 2008. Vol. 9, № 10. P. 776–788.
254. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [Electronic resource]. URL: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (accessed: 12.02.2017).
255. Klinman D.M. et al. FDA Guidance on Prophylactic DNA Vaccines: Analysis and Recommendations // *Vaccine.* 2010. Vol. 28, № 16. P. 2801–2805.
256. О Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012. № 1. P. 4–6.
257. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ. 2012.
258. АСТАШКИН Е.И. et al. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. // Профиль - 2С. 2010.
259. Biologics Research Projects - New Ways to Predict How Well Vaccines Protect Against Tuberculosis, Tularemia and Other Bacteria That Live Inside Cells [Electronic resource]: WebContent. URL:

- <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/ScienceResearch/BiologicsResearchAreas/ucm127281.htm> (accessed: 12.02.2017).
260. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 2009. Vol. 13, № 11. P. 1320–1330.
261. Давыдова В.М. Течение экспериментального туберкулеза у животных, предварительно иммунизированных живой бруцеллезной вакциной // *Вопр. иммунитета, профилактик. и антибакт. терапии.* 1963. № 1. P. 292–312.
262. Б.В. Нижегородова, Зафранская М.М. $\gamma\delta$ T-ЛИМФОЦИТЫ: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ // *Медицинская Иммунология.* 2009. Vol. 11, № 2–3. P. 115–130.
263. Beissert S., Schwarz A., Schwarz T. Regulatory T cells // *J. Invest. Dermatol.* 2006. Vol. 126, № 1. P. 15–24.
264. Born W.K., Reardon C.L., O'Brien R.L. The function of gammadelta T cells in innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* 2006. Vol. 18, № 1. P. 31–38.
265. Pennock N.D., Kedl J.D., Kedl R.M. T Cell Vaccinology: Beyond the Reflection of Infectious Responses // *Trends Immunol.* 2016. Vol. 37, № 3. P. 170–180.
266. Orme I.M., Andersen P., Boom W.H. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Infect. Dis.* 1993. Vol. 167, № 6. P. 1481–1497.
267. Boles J.W. et al. Correlation of body temperature with protection against staphylococcal enterotoxin B exposure and use in determining vaccine dose-schedule // *Vaccine.* 2003. Vol. 21, № 21–22. P. 2791–2796.
268. Macallan D.C., Borghans J.A.M., Asquith B. Human T Cell Memory: A Dynamic View // *Vaccines.* 2017. Vol. 5, № 1. P. 5.
269. Coffman R.L., Sher A., Seder R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work // *Immunity.* 2010. Vol. 33, № 4. P. 492–503.
270. Budhu S. et al. CD8+ T cell concentration determines their efficiency in killing cognate antigen-expressing syngeneic mammalian cells in vitro and in mouse tissues // *J. Exp. Med.* 2010. Vol. 207, № 1. P. 223–235.
271. Vasilakos J.P. et al. Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN // *Cell. Immunol.* 2000. Vol. 204, № 1. P. 64–74.
272. Духовлинов И.В. Создание ДНК-иммуногена, экспрессирующего белок GAG ВИЧ-1. Санкт-Петербург, 2006. 244 p.

273. Maglione P.J. et al. Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection // *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2008. Vol. 180, № 5. P. 3329–3338.
274. Liu M. et al. A Polynucleotide Tuberculosis Vaccine: pat. WO9615241 (A2) USA. 1996. № US19940338992 19941114.
275. Via L.E. et al. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation // *J. Cell Sci.* 1998. Vol. 111 (Pt 7). P. 897–905.
276. Bayry J. et al. Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes // *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2005. Vol. 175, № 1. P. 15–20.
277. Joller N. et al. Antibodies protect against intracellular bacteria by Fc receptor-mediated lysosomal targeting // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107, № 47. P. 20441–20446.
278. de Vallière S. et al. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies // *Infect. Immun.* 2005. Vol. 73, № 10. P. 6711–6720.
279. Schlesinger L.S. et al. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3 // *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 1990. Vol. 144, № 7. P. 2771–2780.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Перечень рисунков

1. Рисунок 1 - Карта мира, демонстрирующая заболеваемость туберкулезом с МЛУ по самым последним данным стран [21], процент новых случаев заболевания туберкулезом с МЛУ продемонстрирован диапазоном цифр и/или чисел, соответствующих цветным прямоугольникам. – стр. 18.
2. Рисунок 2 - Карта мира, демонстрирующая развитие туберкулеза с МЛУ в ранее выявленных случаях туберкулеза в 2014 году [21], количество случаев туберкулеза с МЛУ на 100 тыс. человек продемонстрировано диапазоном чисел, соответствующих цветным прямоугольникам. – стр. 19.
3. Рисунок 3 - *M.tuberculosis* под микроскопом (University of Wisconsin-Madison). – стр. 20.
4. Рисунок 4 - Строение клеточной стенки *M.tuberculosis* [29]. – стр. 26.
5. Рисунок 5 - Структура белка Ag85a. - стр. 54.
6. Рисунок 6 - Структура белка Ag85b. - стр. 55.
7. Рисунок 7 - Структура белка Tb10.4. - стр. 56.
8. Рисунок 8 - Модель пространственной структуры белка Tb10.4 *M.tuberculosis* (<http://swissmodel.expasy.org/>). - стр. 56.
9. Рисунок 9 - Схема кзк ДНК pET-28a(+). - стр. 66.
10. Рисунок 10 - Схема кзк ДНК pcDNA3.1(+). - стр. 67.
11. Рисунок 11 - Схема гибридного белка FliCAg85bTb10.4. - стр. 97.
12. Рисунок 12 - Электрофореграмма ПЦР-продукта, кодирующего гибридный белок FliCAg85bTb10.4, полученного амплификацией синтезированного гена, для разделения фрагментов ДНК использовался 0,8% агарозный гель. - стр. 98.
13. Рисунок 13 - Электрофореграмма ПЦР-продукта, кодирующего гибридный белок FliCAg85bTb10.4, полученного в результате быстрого скрининга выросших на селективной среде клонов *E.coli*, 0,8% агарозный гель, 1,2,4 – клоны 1-3, 3 – отрицательный контроль. - стр. 99.
14. Рисунок 14 - Электрофореграмма плазмидной ДНК pET-28a(+)/FliCAg85bTb10.4: 1 – расщепленная рестриктазой *XhoI*, 2 – расщепленная рестриктазами *NdeI* и *XhoI*, 3 – отрицательный контроль (без обработки рестриктазами), 0,8% агарозный гель. - стр. 100.
15. Рисунок 15 - Электрофореграмма фрагмента ДНК, полученного в результате проведения ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмидной ДНК, выделенной из

выросшего на селективной среде клона E.coli BL21(DE3), 0,8% агарозный гель, 1 – опыт, 2 – отрицательный контроль. - стр. 101.

16. Рисунок 16 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток E.coli штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4 после индукции 1 мМ ИПТГ, 1-до индукции, 2-10 – 1-9 ч после индукции, соответственно. - стр. 102.

17. Рисунок 17 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток E.coli штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4 после индукции 0,5 мМ ИПТГ при 37°C, 1-до индукции, 2-10 – 1-9 ч после индукции, соответственно. - стр. 103.

18. Рисунок 18 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток E.coli штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4 после индукции 0,1 мМ ИПТГ, 1-до индукции, 2-10 – 1-9 ч после индукции, соответственно. - стр. 103.

19. Рисунок 19 - Электрофореграмма фракций белков, полученного из лизатов клеток E.coli штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4 после индукции 0,5 мМ ИПТГ при 16°C в течение 16 ч, 1-до индукции, 2 – после индукции, символ «стрелка» указывает на целевой белок. - стр. 104.

20. Рисунок 20 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток E.coli штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4. после индукции 0,2% лактозой, 1-до индукции, 2 – после индукции. - стр. 105.

21. Рисунок 21 - График изменения относительной интенсивности бандов, соответствующих гибриднему белку, в ПААГ в зависимости от длительности индукции ИПТГ. - стр. 106.

22. Рисунок 22 - Хроматограмма спектра белков через 3 ч после индукции экспрессии гибридного гена 0,1 мМ ИПТГ при 37°C, построенная с использованием программы ImageJ, стрелкой указан пик, соответствующий белку FliCAg85bTb10.4. - стр. 107.

23. Рисунок 23 - Электрофореграмма спектра белков, полученного после центрифугирования лизатов клеток E.coli штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4: 1 - до индукции, 2 – после индукции 0,2% лактозой; после индукции 0,2% лактозой: 3 - супернатант лизата по п. 2.8.2., 4 - осадок лизата по п. 2.8.2.; 5 - после индукции 1 мМ ИПТГ; после индукции 1 мМ ИПТГ: 6 - супернатант лизата по п. 2.8.2., 7 - осадок лизата по п. 2.8.2.. - стр. 108.

24. Рисунок 24 - Электрофореграмма (1) и хроматограммы (2) спектра белков, полученного после центрифугирования лизатов клеток E.coli штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4 после индукции 0,1 мМ ИПТГ при 16°C в течение 16 ч, на 1 слева направо – дорожка 2 - супернатант лизата по п. 2.8.2., дорожка 3 – осадок лизата по п. 2.8.2., на 2 – сверху – фракции белков в супернатанте лизата по п. 2.8.2., снизу - фракции белков в осадке лизата по п. 2.8.2.. - стр. 108.

25. Рисунок 25 - Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pET-28a(+)FliCAg85bTb10.4. до (1) и после индукции 0,1 мМ ИПТГ в течение 3 ч (2), а также очищенного по п. 2.8.3 (3) и дополнительно по п. 2.8.4 (4) белка. - стр. 110.
26. Рисунок 26 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов, кодирующих белки Ag85a (3) и Ag85b (2) *Mycobacterium tuberculosis*, полученных амплификацией синтезированных генов по п.2.5.1, 0,8% агарозный гель, 1 – отрицательный контроль ПЦР. - стр. 111.
27. Рисунок 27 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов, кодирующих белки Ag85a (4) и Ag85b (3) *Mycobacterium tuberculosis*, полученных в результате скрининга выросших на селективной среде клонов *E.coli* с использованием ПЦР по п. 2.6.3. и п. 2.5.1., 0,8% агарозный гель, 1,2 – отрицательный контроль ПЦР для Ag85b и Ag85a, соответственно. - стр. 113.
28. Рисунок 28 - Электрофореграмма плазмидных ДНК pсDNA3.1(+Ag85a (1-3) и pсDNA3.1(+Ag85b (4-6): 3, 6 – расщепленные рестриктазой *NheI*, 2, 4 – расщепленные рестриктазами *NheI* и *HindIII*, 1, 5 – отрицательный контроль (без обработки рестриктазами), 0,8% агарозный гель. - стр. 113.
29. Рисунок 29 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанные по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №1. - стр. 117.
30. Рисунок 30 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы поражения легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №1. - стр. 117.
31. Рисунок 31 - Диаграмма, иллюстрирующая десятичные логарифмы числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №1. - стр. 118.
32. Рисунок 32 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с невакцинированными животными в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №1. - стр. 118.
33. Рисунок 33 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №1. - стр. 119.
34. Рисунок 34 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10. 1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6, опыт №2. - стр. 122.

35. Рисунок 35 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы поражения легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №2. - стр. 122.

36. Рисунок 36 Диаграмма, иллюстрирующая десятичные логарифмы числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №2. - стр. 123.

37. Рисунок 37 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с невакцинированными животными в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №2. - стр. 123.

38. Рисунок 38 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №2. - стр. 124.

39. Рисунок 39 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10. 1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6, опыт №3. - стр. 127.

40. Рисунок 40 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы поражения легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №3. - стр. 127.

41. Рисунок 41 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы селезенки мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10. 1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6, опыт №3. - стр. 127.

42. Рисунок 42 - Диаграмма, иллюстрирующая десятичные логарифмы числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №3. - стр. 128.

43. Рисунок 43 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с невакцинированными животными в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №3. - стр. 128.

44. Рисунок 44 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №3. - стр. 129.

45. Рисунок 45 - Диаграмма, иллюстрирующая фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (%), исследованную по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3. - стр. 131.

46. Рисунок 46 - Диаграмма, иллюстрирующая фагоцитарное число, исследованное по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3. – стр. 132.

47. Рисунок 47 - Диаграмма, иллюстрирующая индекс завершенности фагоцитоза (усл. ед.), исследованный по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3. – стр. 132.
48. Рисунок 48 - Диаграмма, иллюстрирующая показатель завершенности фагоцитоза, исследованный по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3. – стр. 132.
49. Рисунок 49 - Диаграмма, иллюстрирующая фагоцитарную активность и показатель завершенности фагоцитоза, исследованные по п. 2.10.7, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, опыт №3. - стр. 135.
50. Рисунок 50 - Диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп, вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов; - отрицательный контроль, ГБ – стимуляция гибридным белком FliCAg85bTb10.4 в концентрации 40 мкг/мл, + положительный контроль, 1 – Интактные, 2 - Контроль заражения, 3 – БЦЖ 1-кратно, 4 - БЦЖ 2-кратно в/м, 5 – гибридный белок в/м, 6 - гибридный белок + ДНК в/м. - стр. 136.
51. Рисунок 51 - Диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп, вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма; - отрицательный контроль, ГБ – стимуляция гибридным белком FliCAg85bTb10.4 в концентрации 40 мкг/мл, + положительный контроль, 1 – Интактные, 2 - Контроль заражения, 3 – БЦЖ 1-кратно, 4 - БЦЖ 2-кратно в/м, 5 – гибридный белок в/м, 6 - гибридный белок + ДНК в/м. - стр. 138.
52. Рисунок 52 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10. 1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6, опыт №4. - стр. 141.
53. Рисунок 53 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы поражения легких мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, рассчитанный по методике, описанной в п. 2.10.6., опыт №4. - стр. 142.
54. Рисунок 54 - Диаграмма, иллюстрирующая коэффициенты массы селезенки мышей (усл. ед.) в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №4. - стр. 142.
55. Рисунок 55 - Диаграмма, иллюстрирующая десятичные логарифмы числа жизнеспособных бактерий в легких мышей в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №2. - стр. 143.
56. Рисунок 56 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с невакцинированными животными в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №4. - стр. 143.

57. Рисунок 57 - Диаграмма, иллюстрирующая индексы защиты по сравнению с БЦЖ, введенной по стандартной методике, в исследуемых по п. 2.10.1.1. группах животных, по п. 2.10.6., опыт №4. - стр. 144.

58. Рисунок 58 - Диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп, вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов; - отрицательный контроль, ГБ – стимуляция гибридным белком в концентрации, + положительный контроль. - стр. 147.

59. Рисунок 59 - Диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп, вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов, синтезирующих интерферон гамма; - отрицательный контроль, ГБ – стимуляция гибридным белком, + положительный контроль. - стр. 149.

60. Рисунок 60 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «контроль заражения» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – гибридный белок FliCAg85bTb10.4. - стр. 153.

61. Рисунок 61 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «БЦЖ 1-кратно» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – гибридный белок FliCAg85bTb10.4. - стр. 154.

62. Рисунок 62 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «гибридный белок в/м» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – гибридный белок FliCAg85bTb10.4. - стр. 155.

63. Рисунок 63 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «контроль заражения» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – белок Tb10.4. - стр. 156.

64. Рисунок 64 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «БЦЖ 1-кратно» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – белок Tb10.4. - стр. 157.

65. Рисунок 65 - Диаграмма титра антител сывороток животных группы «гибридный белок в/м» и группы «интактные животные», опыт №5, горизонтальная ось – значение оптической плотности при длине волны 450 нм, анализируемый белок – белок Tb10.4. - стр. 158.

66. Рисунок 66 - Проявленная пленка после проведения анализа по п. 2.8.8., 1 – проба через 2 дня после введения плазмидной ДНК pсDNA3.1(+)*Ag85b*, 2 - проба через 5 дней после ее введения, 3 - проба через 7 дней после ее введения, 4 – отрицательный контроль. - стр. 159.

Перечень таблиц

1. Таблица 1 - Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации последовательностей генов *FlicAg85bTb10*, *ag85a*, *ag85b*. - стр. 71.
2. Таблица 2 - Олигонуклеотидные праймеры для секвенирования фрагмента клонированной ДНК в вектора рЕТ-28a(+) и рсDNA3.1(+). - стр. 77.
3. Таблица 3 - Исходные данные по постановке опытов 1-5 на лабораторных животных. - стр. 89-90.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Аминокислотная последовательность белка FlcAg85bTb10.4

Met	Ala	Gln	Val	Ile	Asn	Thr	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Gln	Asn
1				5					10					15	
Asn	Leu	Asn	Lys	Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Gly	Thr	Ala	Ile	Glu	Arg	Leu
			20					25					30		
Ser	Ser	Gly	Leu	Arg	Ile	Asn	Ser	Ala	Lys	Asp	Asp	Ala	Ala	Gly	Gln
		35					40					45			
Ala	Ile	Ala	Asn	Arg	Phe	Thr	Ala	Asn	Ile	Lys	Gly	Leu	Thr	Gln	Ala
	50					55					60				
Ser	Arg	Asn	Ala	Asn	Asp	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	Gln	Thr	Thr	Glu	Gly
65					70					75				80	
Ala	Leu	Asn	Glu	Ile	Asn	Asn	Asn	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Ala
				85					90					95	
Val	Gln	Ser	Ala	Asn	Ser	Thr	Asn	Ser	Gln	Ser	Asp	Leu	Asp	Ser	Ile
			100					105					110		
Gln	Ala	Glu	Ile	Thr	Gln	Arg	Leu	Asn	Glu	Ile	Asp	Arg	Val	Ser	Gly
		115					120					125			
Gln	Thr	Gln	Phe	Asn	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Asn	Thr	Leu
		130				135						140			
Thr	Ile	Gln	Val	Gly	Ala	Asn	Asp	Gly	Glu	Thr	Ile	Asp	Ile	Asp	Leu
145					150						155				160
Lys	Gln	Ile	Asn	Ser	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
				165					170					175	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Glu	Asn	Pro	Leu	Gln
			180					185					190		
Lys	Ile	Asp	Ala	Ala	Leu	Ala	Gln	Val	Asp	Thr	Leu	Arg	Ser	Asp	Leu
		195					200					205			
Gly	Ala	Val	Gln	Asn	Arg	Phe	Asn	Ser	Ala	Ile	Thr	Asn	Leu	Gly	Asn
	210					215					220				
Thr	Val	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Ile	Glu	Asp	Ser	Asp
225					230						235				240
Tyr	Ala	Thr	Glu	Val	Ser	Asn	Met	Ser	Arg	Ala	Gln	Ile	Leu	Gln	Gln
				245					250					255	
Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Ala	Asn	Gln	Val	Pro	Gln	Asn	Val
			260					265					270		
Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Met	Ala	Gly	Ser
		275					280					285			
Ser	Ala	Met	Ile	Leu	Ala	Ala	Tyr	His	Pro	Gln	Gln	Phe	Ile	Tyr	Ala
	290					295					300				
Gly	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Gln	Gly	Met	Gly	Pro	Ser
305					310					315				320	
Leu	Ile	Gly	Leu	Ala	Met	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ala	Ala	Asp
				325					330					335	
Met	Trp	Gly	Pro	Ser	Ser	Asp	Pro	Ala	Trp	Glu	Arg	Asn	Asp	Pro	Thr
			340					345					350		
Gln	Gln	Ile	Pro	Lys	Leu	Val	Ala	Asn	Asn	Thr	Arg	Leu	Trp	Val	Tyr
		355					360					365			
Cys	Gly	Asn	Gly	Thr	Pro	Asn	Glu	Leu	Gly	Gly	Ala	Asn	Ile	Pro	Ala
	370					375					380				
Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Phe	Val	Arg	Ser	Ser	Asn	Leu	Lys	Phe	Gln	Asp
385					390					395				400	
Ala	Tyr	Asn	Ala	Ala	Gly	Gly	His	Asn	Ala	Val	Phe	Asn	Phe	Pro	Pro

2. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок FliCAg85bTb10.4

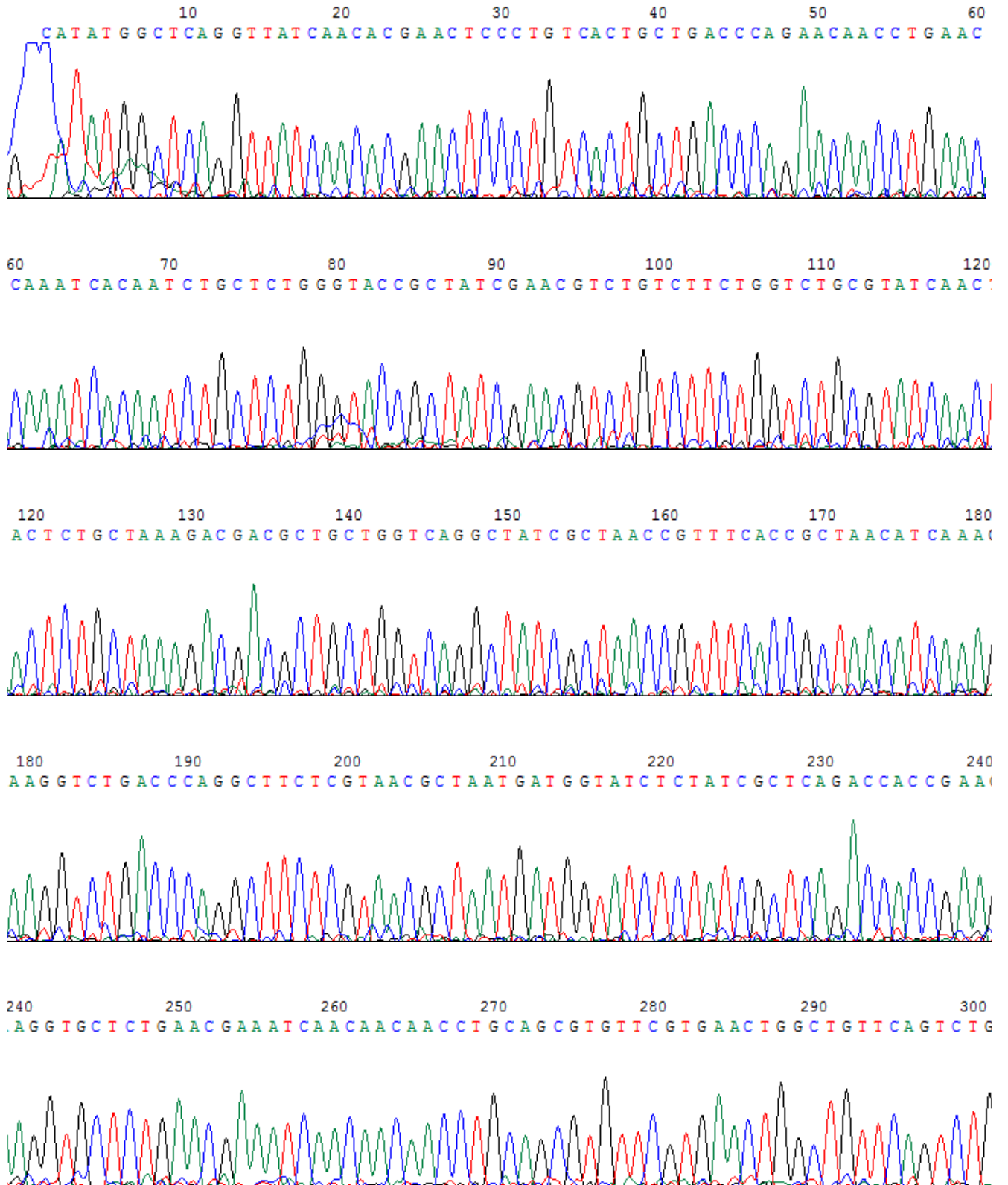
```

catatggctc aggttatcaa cacgaactcc ctgtcactgc tgaccagaa caacctgaac 60
aatcacaat ctgctctggg taccgctatc gaacgtctgt cttctggtct gcgtatcaac 120
tctgctaaag acgacgctgc tggtcaggct atcgctaacc gtttcaccgc taacatcaaa 180
ggctctgacc aggcttctcg taacgctaata gatggatatct ctatcgctca gaccaccgaa 240
ggtgctctga acgaaatcaa caacaacctg cagcgtgttc gtgaactggc tgttcagtct 300
gctaactcta ccaactctca gtctgacctg gactctatcc aggctgaaat caccacagcgt 360
ctgaacgaaa tcgaccgtgt ttctggctcag acccagttca acgggtgtaa agttctggcg 420
caagacaaca ccctgaccat ccaagttggc gctaacgacg gtgaaacat cgacatcgac 480
ctgaaacaga tcaactctca gaccctgggt ctgggcggcg ggtctggtgg cggttcaggt 540
ggtggttctg ctgctaccac caccgaaaac ccgctgcaga aaatcgacgc tgctctggca 600
caagttgaca ccctgcgttc tgacctgggt gctgttcaga accgtttcaa ctctgctatc 660
accaacctgg gtaacaccgt taacaacctg acctctgctc gttctcgat cgaagactct 720
gactacgcta ccgaagtttc taacatgtct cgtgctcaga tcctgcagca ggctgggtacc 780
tctgttctgg ctcaggctaa ccaggttccg cagaacgttc tgtctctgct gcgaggaggc 840
ggagggctct cttcaatggc tggttcttct gctatgatcc tggctgctta ccaccgcag 900
cagttcatct acgctgggtc tctgtctgct ctgctggacc cgtctcaggg tatgggcca 960
tctctgatcg gtctggctat gggtgacgct ggtggttaca aagctgctga catgtggggt 1020
ccgtcttctg acccggttg ggaacgtaac gaccgcacc agcagatccc gaaactgggt 1080
gctaacaaca cccgtctgtg ggtttactgc ggtaatggta cgccgaacga actgggtgggt 1140
gctaacatcc cggctgaatt cctggaaaac ttcgttcgtt cttctaact gaaattccag 1200
gacgcttaca acgctgcagg cggtcacaac gctgttttca acttcccgcc gaacgggtacc 1260
cactcttggg aatactgggg tgctcagctg aacgctatga aagggtgacct gcaatcttca 1320
ctgggagctg gtggaggagg tggttcttct tctatgtctc agatcatgta caactaccg 1380
gctatgctgg gtcacgctgg tgacatggct ggttacgctg gtaccctgca gtctctgggt 1440
gctgaaatcg ctgttgaaca ggctgctctg cagtctgcat ggcaagggtga caccgggtatc 1500
acctaccagg cttggcaggc tcagtggaac caggctatgg aagacctggg tcgtgcttac 1560
cacgctatgt cttctacca cgaagctaac accatggcta tgatggctcg tgacaccgct 1620
gaagctgcta aatggggtgg ttaactcgag 1650

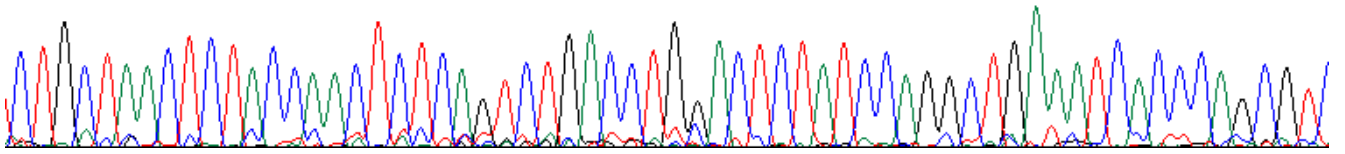
```


3. Хроматограмма ДНК, кодирующей белок FliC_{Ag85bTb10.4}

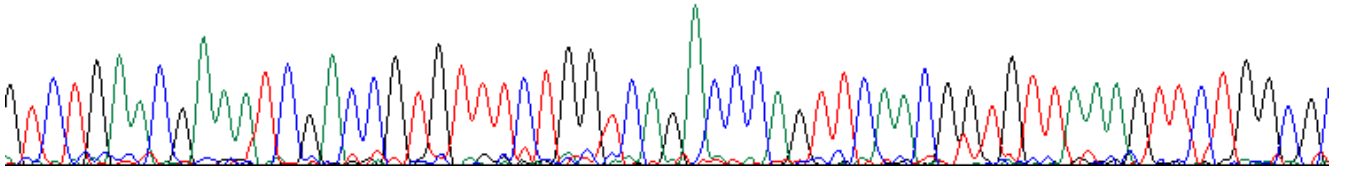
3.1. прочитано с использованием прямого праймера (фрагмент)



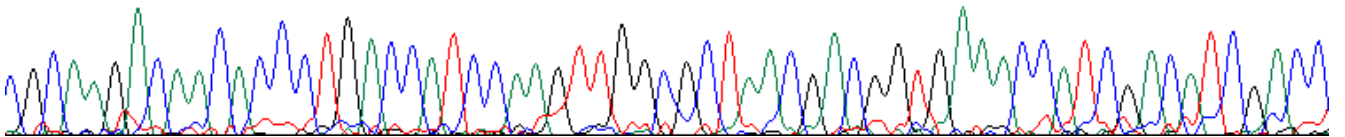
300 310 320 330 340 350 360
 CTGCTAACTCTACCAACTCTCAGTCTGACCTGGACTCTATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGT



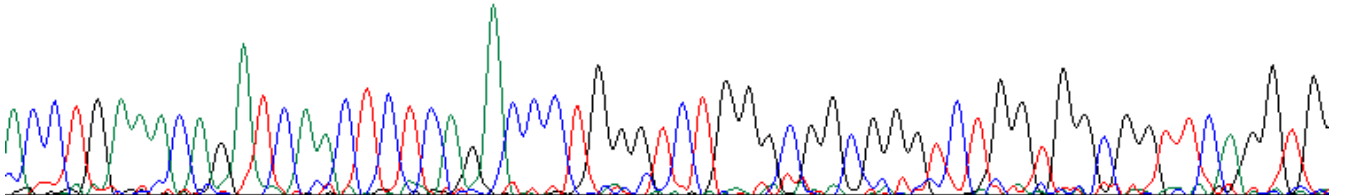
360 370 380 390 400 410 420
 GTCTGAACGAAATCGACCGTGTTCCTGGTCAGACCCAGTCAACGGTGTAAAGTTCTGGCGT



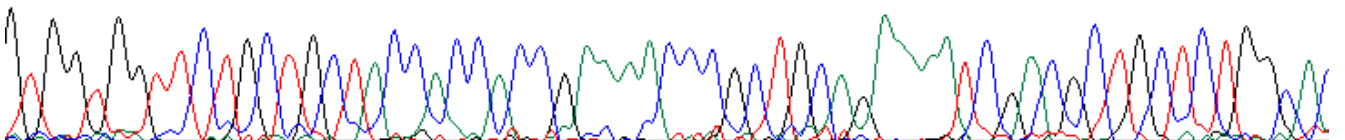
420 430 440 450 460 470 480
 CGCAAGACAACACCCTGACCATCCAAGTTGGCGCTAACGACGGTGA AACCATCGACATCGACC



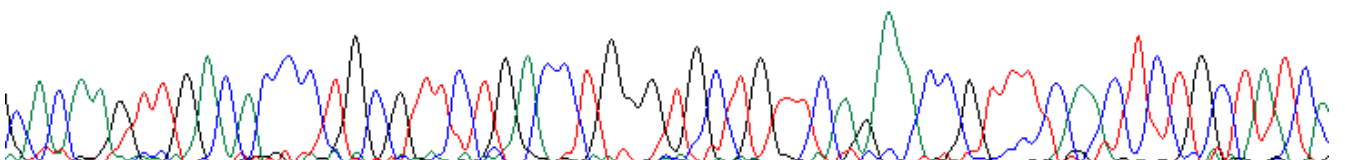
480 490 500 510 520 530 540
 ACCCTGAAACAGATCAACTCTCAGACCCCTGGGTCTGGGCGGCGGGTCTGGTGGCGGTTCAGGTG



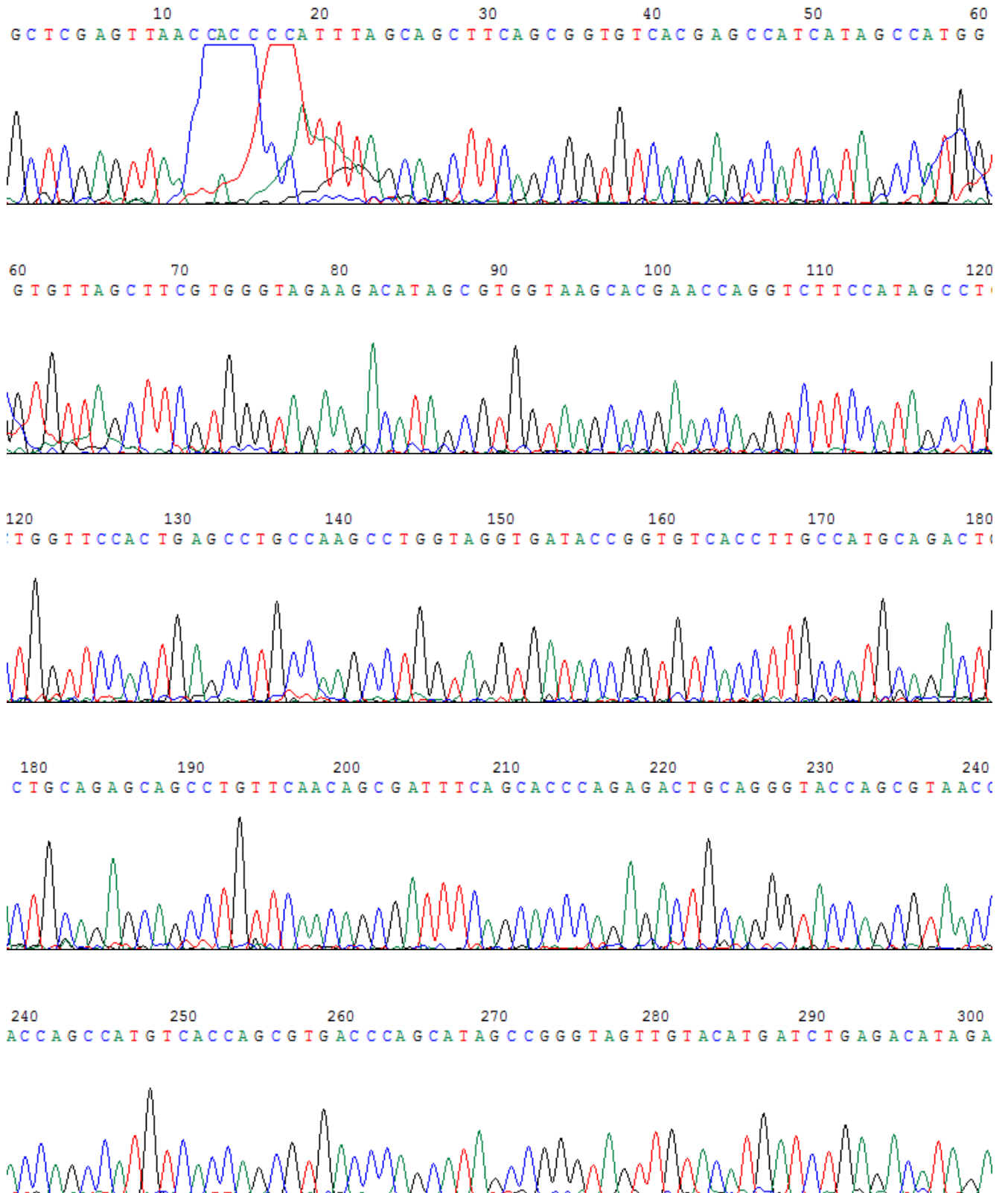
540 550 560 570 580 590 600
 GTGGTGGTCTCTGCTGCTACCACCACCCGAAAACCCGCTGCAGAAAATCGACGCTGCTCTGGCAC



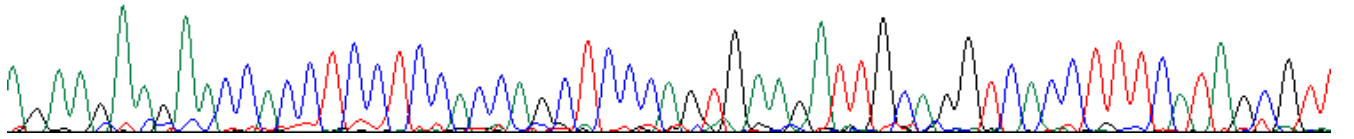
600 610 620 630 640 650 660
 CACAAGTTGACACCCTGCGTTCGACCTGGGTGCTGTTTCAGAACCGTTTCAACTCTGCTATCA



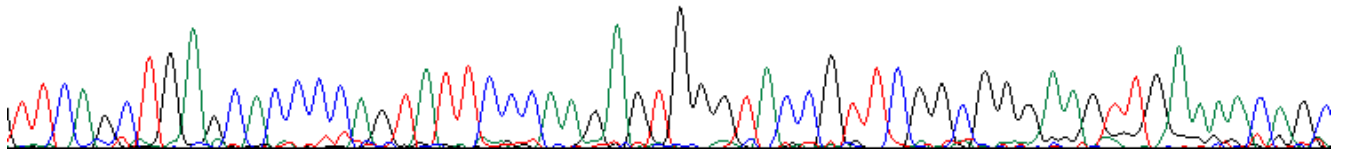
3.2. прочитано с использованием обратного праймера (фрагмент)



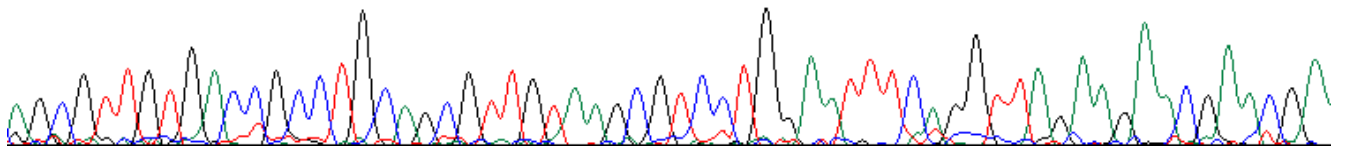
300 310 320 330 340 350 360
 A G A A G A A G A A C C A C C T C C T C C A C C A G C T C C C A G T G A A G A T T G C A G G T C A C C T T T C A T A G C G T T



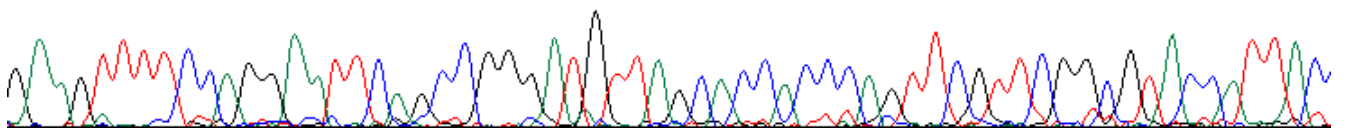
360 370 380 390 400 410 420
 T T C A G C T G A G C A C C C C A G T A T T C C C A A G A G T G G G T A C C G T T C G G C G G G A A G T T G A A A A C A G C



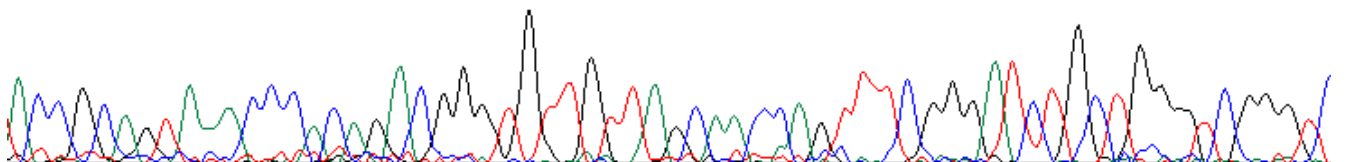
420 430 440 450 460 470 480
 A G C G T T G T G A C C G C C T G C A G C G T T G T A A G C G T C T G G A A T T T C A G G T T A G A A G A A C G A A C G A



480 490 500 510 520 530 540
 G A A G T T T T C C A G G A A T T C A G C C G G G A T G T T A G C A C C A C C C A G T T C G T T C G G C G T A C C A T T A C



540 550 560 570 580 590 600
 A C C G C A G T A A A C C C A C A G A C G G G T G T T G T T A G C A A C C A G T T T C G G G A T C T G C T G G G T C G G G T C



4. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, выявленных в результате секвенирования, относительно рассчитанной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок FliCAg85bTb10.4 (референсной)

```

          10      20      30      40      50
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  ATGAGAGGTTACACTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAG
seq. using Reverse primer  -----

          60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  GAGATATACCATGGGCAGCAGTATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCT
seq. using Reverse primer  -----

          110     120     130     140     150
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  -----CATATGGCTCAGGTTATCAACACGAACCTCCCTGT
seq. using Reverse primer  GGTCGCGCGGGCACC.....

          160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  CACTGCTGACCCAGAACAACCTGAACAAATCACAATCTGCTCTGGGTACC
seq. using Reverse primer  .....

          210     220     230     240     250
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  GCTATCGAACGTCCTGCTCTTCTGGTCTGCGTATCAACTCTGCTAAAGACGA
seq. using Reverse primer  .....

          260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  CGCTGCTGGTCAGGCTATCGCTAACCGTTTCACCGCTAACATCAAAGGTC
seq. using Reverse primer  .....

          310     320     330     340     350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  TGACCCAGGCTTCTCGTAACGCTAATGATGGTATCTCTATCGCTCAGACC
seq. using Reverse primer  .....

          360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  ACCGAAGGTGCTCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTTCGTGA
seq. using Reverse primer  .....

          410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer  ACTGGCTGTTTCAGTCTGCTAACTCTACCAACTCTCAGTCTGACCTGGACT
seq. using Reverse primer  -----

```

```

          460      470      480      490      500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  CTATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGTCTGAACGAAATCGACCCGTGTTTCT
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          510      520      530      540      550
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  GGTCAGACCCAGTTCAACGGTGTAAAGTTCTGGCGCAAGACAACACCCCT
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          560      570      580      590      600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  GACCATCCAAGTTGGCGCTAACGACGGTGAAACCATCGACATCGACCTGA
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          610      620      630      640      650
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  AACAGATCAACTCTCAGACCCCTGGGTCTGGGCGGCGGGTCTGGTGGCGGT
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          660      670      680      690      700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  TCAGGTGGTGGTTCTGCTGCTACCACCACCCGAAAACCCGCTGCAGAAAAT
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          710      720      730      740      750
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  CGACGCTGCTCTGGCACAAAGTTGACACCCCTGCGTCTGACCTGGGTGCTG
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          760      770      780      790      800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  TTCAGAACCGTTTCAACTCTGCTATCACCAACCTGGGTAAACACCGTTAAC
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          810      820      830      840      850
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  AACCTGACCTCTGCTCGTTCTCGTATCGAAGACTCTGACTACGCTACCGA
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          860      870      880      890      900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  AGTTTCTAACATGTCTCGTGCTCAGATCCGTCAGCAGGCTGGTACCTCTG
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----

          910      920      930      940      950
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10  TTCTGGCTCAGGCTAACCAAGGTTCCGCAGAACGTTCTGTCTCTGCTGCGA
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
-----
C.TC.GT..CT.G

```

```

          960      970      980      990      1000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 GGAGGCGGAGGGTCCTCTTCAATGGCTGGTTCTTCTGCTATGATCCTGGC
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer .CGAAGA..C..AGGGTCCTTTCAAGGC.GGT.CG..GAGA.....

          1010     1020     1030     1040     1050
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 TGCTTACCACCCGCAGCAGTTCATCTACGCTGGTTCTCTGTCTGCTCTGC
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer

          1060     1070     1080     1090     1100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 TGGACCCGTCTCAGGGTATGGGCCCATCTCTGATCGGTCTGGCTATGGGT
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer .....C-----

          1110     1120     1130     1140     1150
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 GACGCTGGTGGTTACAAAGCTGCTGACATGTGGGGTCCGTCTTCTGACCC
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer

          1160     1170     1180     1190     1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 GGCTTGGGAACGTAACGACCCGACCCAGCAGATCCCCGAAACTGGTTGCTA
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer

          1210     1220     1230     1240     1250
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 ACAACACCCGTCTGTGGGTTTACTGCGGTAATGGTACGCCGAACGAACTG
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer

          1260     1270     1280     1290     1300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 GGTGGTGCTAACATCCCGGCTGAATTCCCTGGAAAACCTTCGTTCTCCTTC
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer

          1310     1320     1330     1340     1350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 TAACCTGAAATTCCAGGACGCTTACAACGCTGCAGGCGGTCAACAACGCTG
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer

          1360     1370     1380     1390     1400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 TTTTCAACTTCCCGCCGAACGGTACCCACTCTTGGGAATACTGGGGTGCT
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer

          1410     1420     1430     1440     1450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 CAGCTGAACGCTATGAAAGGTGACCTGCAATCTTCACTGGGAGCTGGTGG
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer

```

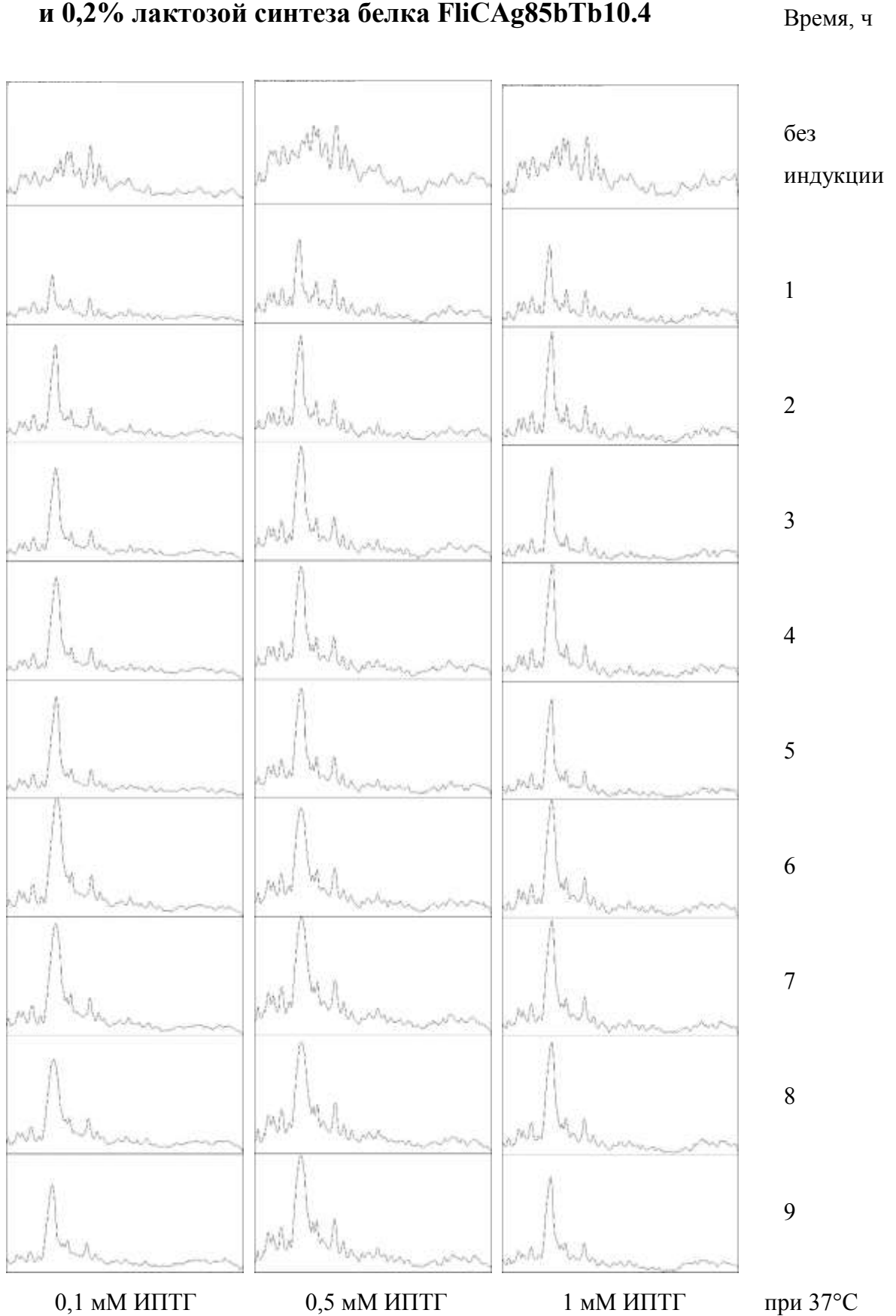
```

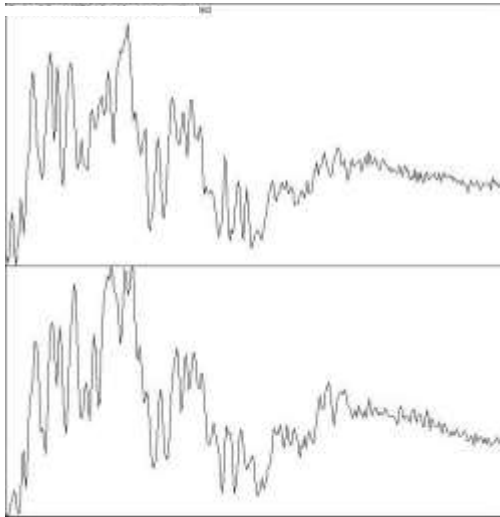
          1460      1470      1480      1490      1500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 AGGAGGTGGTTCCTTCTTCTATGTCTCAGATCATGTACAAC TACCCGGCTA
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1510      1520      1530      1540      1550
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 TGCTGGGTCAAGCTGGTGACATGGCTGGTTACGCTGGTACCC TGCAGTCT
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1560      1570      1580      1590      1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 CTGGGTGCTGAAATCGCTGTTGAACAGGCTGCTCTGCAGTCTGCATGGCA
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1610      1620      1630      1640      1650
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 AGGTGACACCCGGTATCACCTACCAGGCTTGGCAGGCTCAGTGG AACCCAGG
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1660      1670      1680      1690      1700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 CTATGGAAGACCTGGTTCGTGCTTACCACGCTATGTCTTCTACCCACGAA
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1710      1720      1730      1740      1750
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 GCTAACACCATGGCTATGATGGCTCGTGACACCGCTGAAGCTGCTAAATG
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1760      1770      1780      1790      1800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10 GGGTGGTTAACTCGAG
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1810      1820
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for FliCAg85bTb10
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
ACAAAGCCCGAAAGAAGCTAGTGGGCCCG

```

Точками отмечены нуклеотиды, совпадающие с референсной нуклеотидной последовательностью.

5. Хроматограммы спектра белков анализируемых проб при индукции ИПТГ и 0,2% лактозой синтеза белка FlcAg85bTb10.4

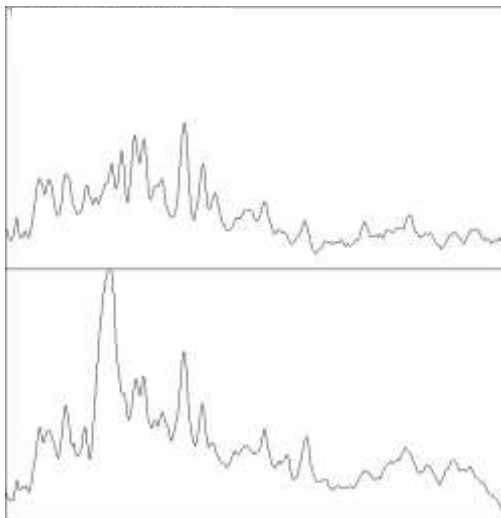




без индукции

индукция 16 ч

0,5 мМ ИПТГ при 16°С



без индукции

индукция 16 ч

0,2 % лактоза при 37°С

6. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Ag85a

M.tuberculosis

gctagcgcca ccatggacgc tatgaaacgc ggccctgtgct gcgtgctgct gctgtgcgga 60
 gctgtgttcg tgagccccag ccagctgggtg gaccgcgtgc gcggcgccgt gaccggcatg 120
 agccgcccgc tggtcgttgg cgctgtggga gccgccctgg tgagcggcct ggtgggcgcc 180
 gtgggcggca ccgccaccgc cggcgccttc agccgccccg gcctgcccgt ggagtacctg 240
 caggtgcccc gccccagcat gggccgcgac atcaagggtgc agttccaaag tggcggcgcc 300
 aacagccccg ccctgtacct gctggacggc ctgcgcgccc aggacgactt cagcggctgg 360
 gacatcaaca cccccgcctt cgagtgggtac gaccagagcg gcctgagcgt ggtgatgccc 420
 gtgggcggcc agagcagctt ctacagcgac tggtagcagc ccgcctgchg caaggccggc 480
 tgccagacct acaagtggga gaccttctg accagcgagc tgcccggctg gctgcaggcc 540
 aaccgccacg tgaagccac cggcagcgcc gtgggtgggc tgagcatggc cgccagcagc 600
 gccctgacct tggccatcta ccacccccag cagttcgtgt acgccggcgc catgagcggc 660
 ctgctggacc ccagccaggc aatgggacct accctgatcg gcctggccat gggcgacgcc 720
 ggcggctaca aggccagcga catgtggggc cccaaggagg accccgcctg gcagcgcaac 780
 gaccccctgc tgaacgtggg caagctgac gccacaaca cccgcgtgtg ggtgtactgc 840
 ggcaacggca agcccagcga cctgggcggc aacaacctgc ccgccaaagt cctggagggc 900
 ttcgtgcgca ccagcaacat caagttccag gacgcctaca acgccggcgg cggccacaac 960
 ggcgtgttcg acttccccga cagcggcacc cacagctggg agtactgggg cgcccagctg 1020
 aacgccatga agcccgacct gcagcgcgca ctcggcgcca ccccaaacac cggccccgcc 1080
 ccccaggcgc cctaaaagct t 1101

7. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Ag85b

M.tuberculosis

```

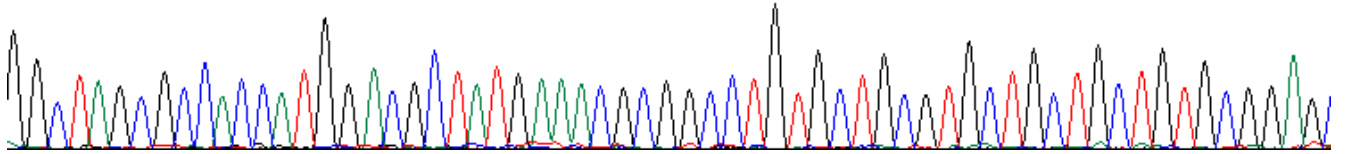
gctagcgcca ccatggacgc tatgaaacgc ggcctgtgct gcgtgctgct gctgtgcgga 60
gctgtgttcg tgagccccag caccgacgtg agccgcaaga tccgcgcctg gggccgcccg 120
ctgatgatcg gcaccgcccgc cgccgtgggtg ctgcccggcc tgggtgggcct ggccggcggc 180
gccgccaccg ccgggcgcctt cagccgcccc ggcctgcccg tggagtacct gcaggtgccc 240
agccccagca tgggcccgca catcaagggtg cagttccaaa gtggcggcaa caacagcccc 300
gccgtgtacc tgctggacgg cctgcgcgcc caggacgact acaacggctg ggacatcaac 360
acccccgcct tcgagtggta ctaccagagc ggcctgagca tcgtgatgcc cgtgggcggc 420
cagagcagct tctacagcga ctggtacagc cccgcctgcg gcaaggccgg ctgccagacc 480
tacaagtggg agaccttctt gaccagcgag ctgccccagt ggctgagcgc caaccgcgcc 540
gtgaagccca ccggcagcgc cgccatcggc ctgagcatgg ccggcagcag cgccatgatc 600
ctggccgcct accacccccca gcagttcatc tacgccggca gcctgagcgc cctgctggac 660
cccagccagg gcatgggacc tagcctgata ggcctggcca tgggcgacgc cggcggctac 720
aaggccgccg acatgtgggg ccccagcagc gacccgcct gggagcgcaa cgaccccacc 780
cagcagatcc ccaagctggt ggccaacaac acccgctgt ggggtgtactg cggtaacgga 840
acccccaacg agctgggcgg cgccaacatc cccgccgagt tcctggagaa cttcgtgcgc 900
agcagcaacc tgaagttcca ggacgcctac aacgccgccg gcggccacaa cgccgtgttc 960
aacttcccc ccaacggcac ccacagctgg gagtactggg gcgcccagct gaacgccatg 1020
aagggcgacc tgcagagcag cctgggcgcc ggctaaaagc tt 1062

```

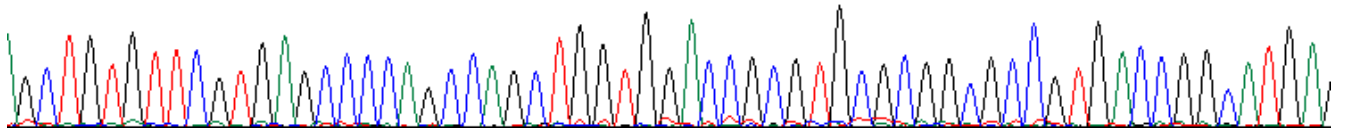
8. Хроматограмма ДНК, кодирующей белок Ag85a *M.tuberculosis*

8.1. прочитано с использованием прямого праймера (фрагмент)

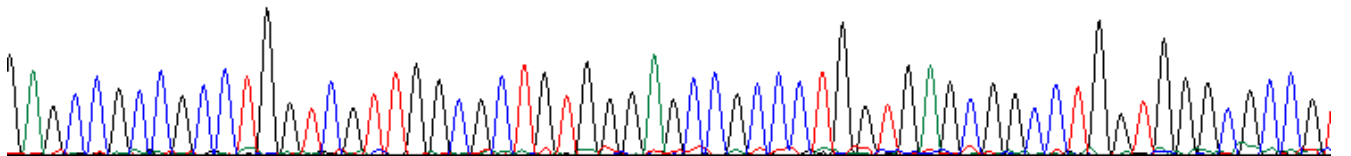
100 110 120 130 140 150 160
 G G C T A G C G C C A C C A T G G A C G C T A T G A A A C G C G G C C T G T G C T G C G T G C T G C T G C T G T G C G G A G T



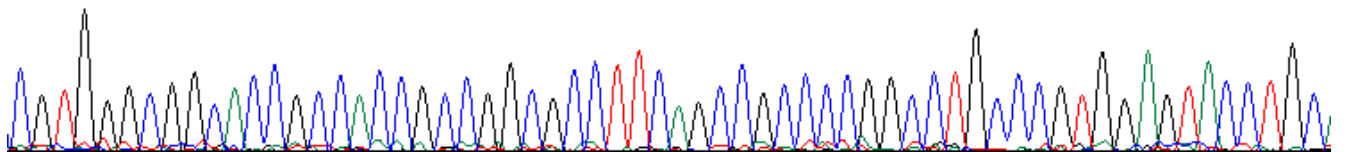
160 170 180 190 200 210 220
 A G C T G T G T T C G T G A G C C C C A G C C A G C T G G T G G A C C G C G T G C G C G G C G C C G T G A C C G G C A T G A C



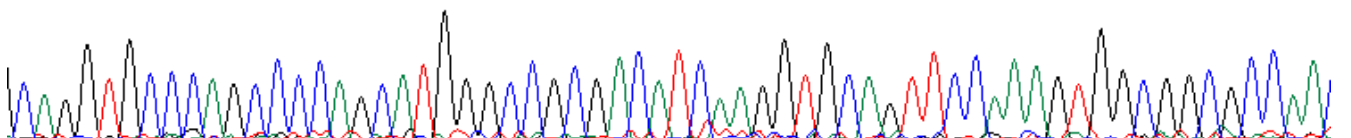
220 230 240 250 260 270 280
 A G C C G C C G C C T G G T C G T T G G C G C T G T G G A G C C G C C C T G G T G A G C G G C C T G G T G G G C G C C G T



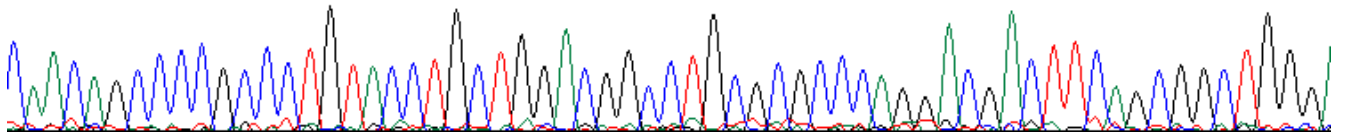
280 290 300 310 320 330 340
 C G T G G G C G G C A C C G C C A C C G C C G G C G C C T T C A G C C G C C C C G G C C T G C C C G T G G A G T A C C T G C T



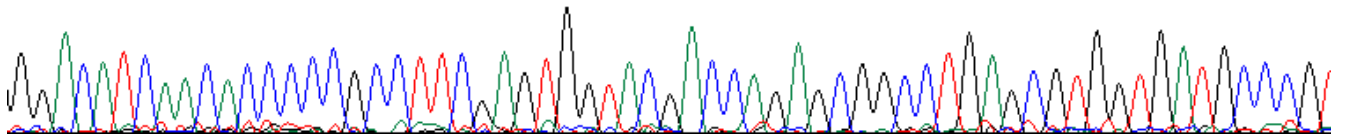
340 350 360 370 380 390 400
 C A G G T G C C C A G C C C A G C A T G G G C C G C G A C A T C A A G G T G C A G T T C C A A A G T G G C G G C G C C A A T



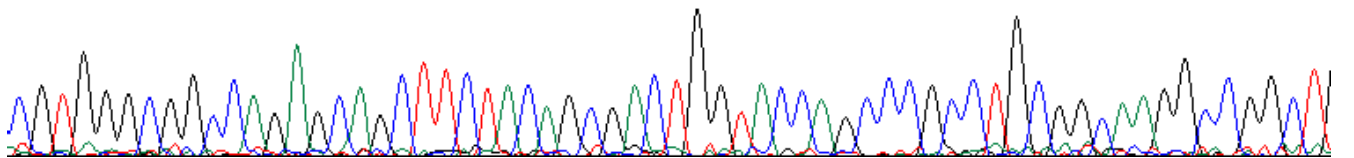
400 410 420 430 440 450 460
 CAACA GCCCG CCC TGTACCTT GCTGGACGG CCTTGGCGGCC CAGGACGACTTTCAGCGGCTGGG



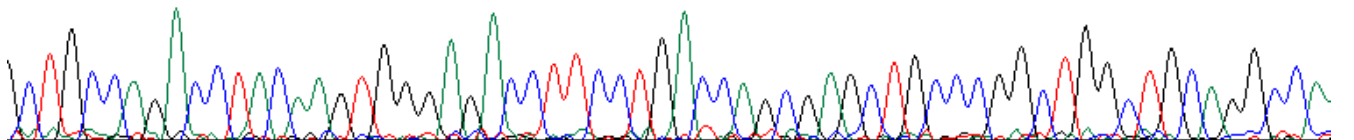
460 470 480 490 500 510 520
 GGACATCAACACCCCGCCTTCGAGTGGTACGACCAAGAGCGGCTTGAGCGTGGTGTATGCCCGT



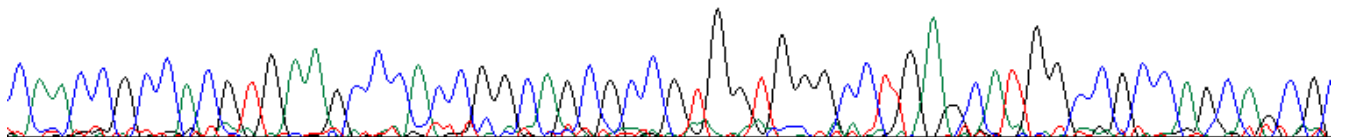
520 530 540 550 560 570 580
 CGTGGGCGGCCAGAGCAGCTTCTACAGCGACTTGGTACCAAGCCCGCCTTGCGGCCAAGGCCGGCT



580 590 600 610 620 630 640
 CTGCCAGACTTACAAGTGGGAGACCTTCTTGACCAAGCGAGCTGCCCGGCTTGGCTGCAGGCCA

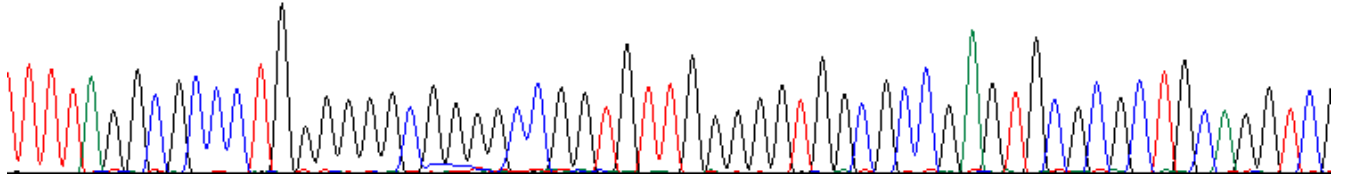


640 650 660 670 680 690 700
 CAACCGCCACGTGAAGCCACCGGCAGCGCCGTGGTGGCCCTGAGCATTGGCCGCCAGCAGCG

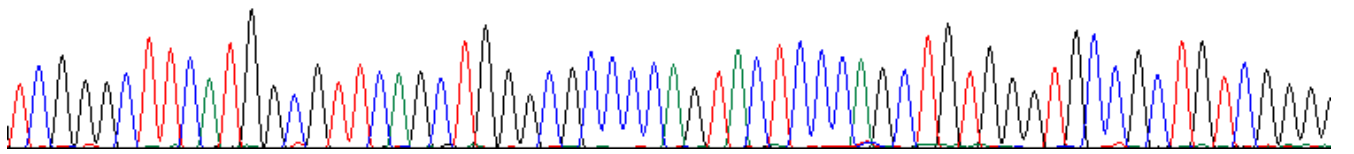


8.2. прочитано с использованием обратного праймера (фрагмент)

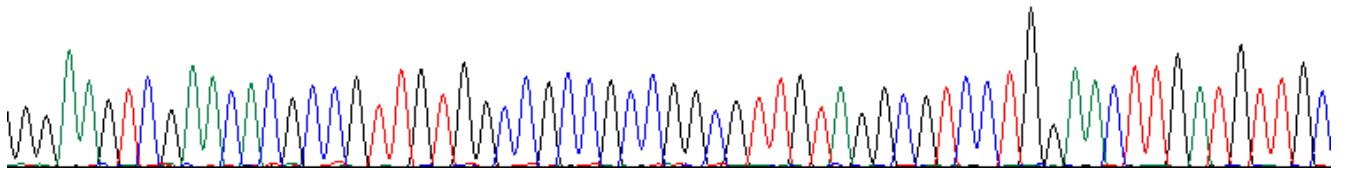
100 110 120 130 140 150 160
 :TTTAGGCGCCCTGGGGGGCGGGGCCGGTGTGTGGGGGTGGCGCCGAGTGC GCGCTGCAGGTC(



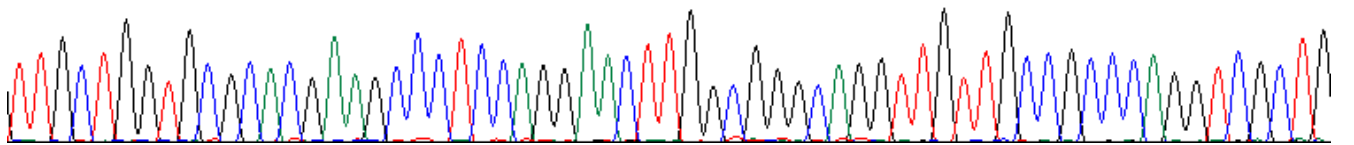
160 170 180 190 200 210 220
 TCGGGCTTCAATGGCGTTCAGCTGGGCGCCCGAGTACTCCAGCTGTGGGTGCCGCTGTCTGGGG(



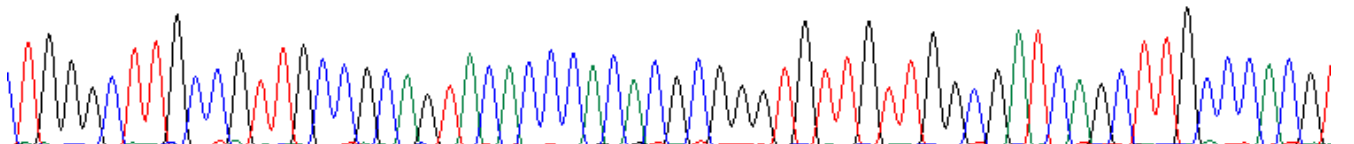
220 230 240 250 260 270 280
 ;GGAAGTCGAACACGCCGTGTGGCCGCCGCCGGCGTTGTAGGCCGTCCITGGAACITGATGTTGC



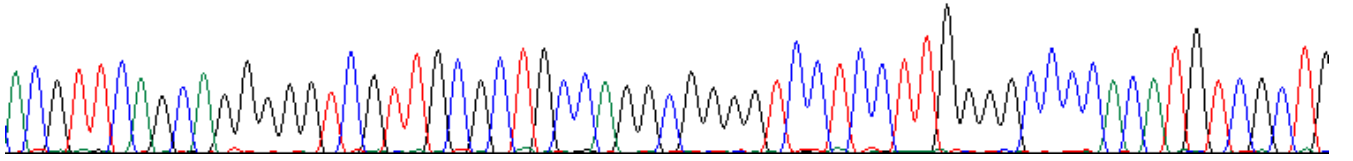
280 290 300 310 320 330 340
 TTGCTGGTGCGCACGAAGCCCTCCAGGAACITGGCGGGCAGGTTGTTGCCGCCCAAGGTCGCTG



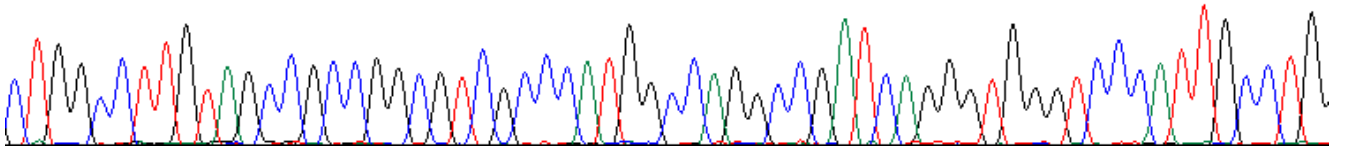
340 350 360 370 380 390 400
 :TGGGCTTGGCGTTCGCCAGTACACCCACACGCGGGTGTGTGGCGATCAGCTTGGCCACGG(



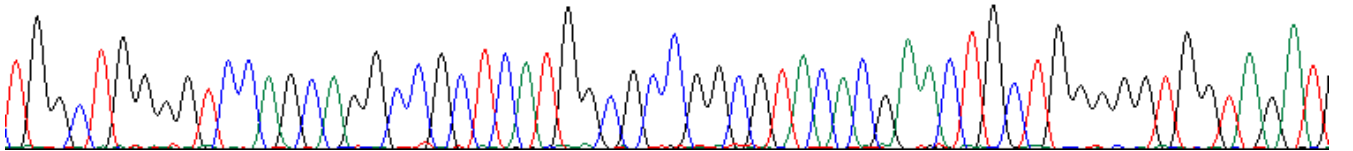
400 410 420 430 440 450 460
 A C G T T C A G C A G G G G G T C G T T G C G C T G C C A G G C G G G G T C C T C C T T G G G G C C C C A C A T G T C G C T G



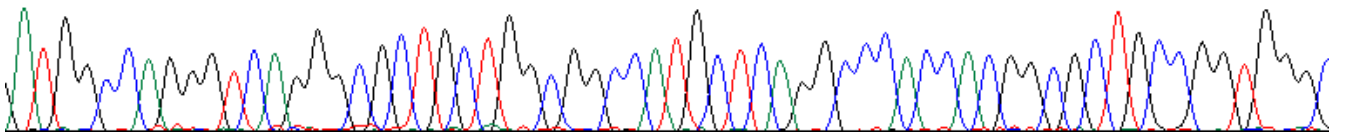
460 470 480 490 500 510 520
 C T G G C C T T G T A G C C G C C G G C G T C G C C C A T G G C C A G G C C G A T C A G G G T G G G T C C C A T T G C C T G



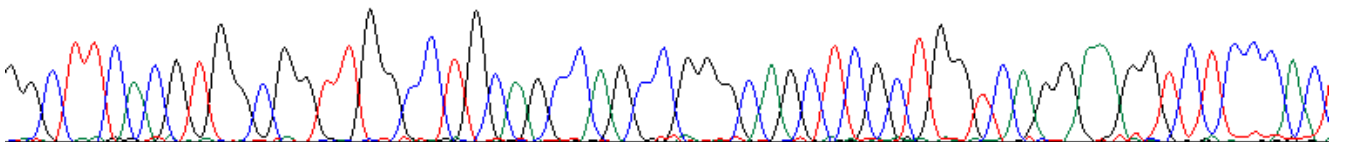
520 530 540 550 560 570 580
 T G G C T G G G G T C C A G C A G G C C G C T C A T G G C G C C G G C G T A C A C G A A C T G C T G G G G G T G G T A G A T



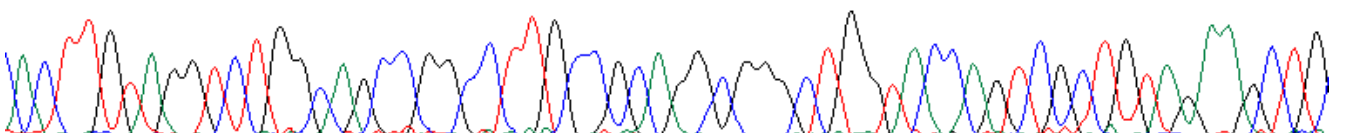
580 590 600 610 620 630 640
 ; A T G G C C A G G G T C A G G G C G C T G C T G G C G G C C A T G C T C A G G C C A C C A C G G C G G C T G C C G G T G G G C



640 650 660 670 680 690 700
 G G C T T C A C G T G G C G G T T G G C C T G C A G C C A G C C G G G C A G C T C G C T G G T C A G G A A G G T C T C C C A C

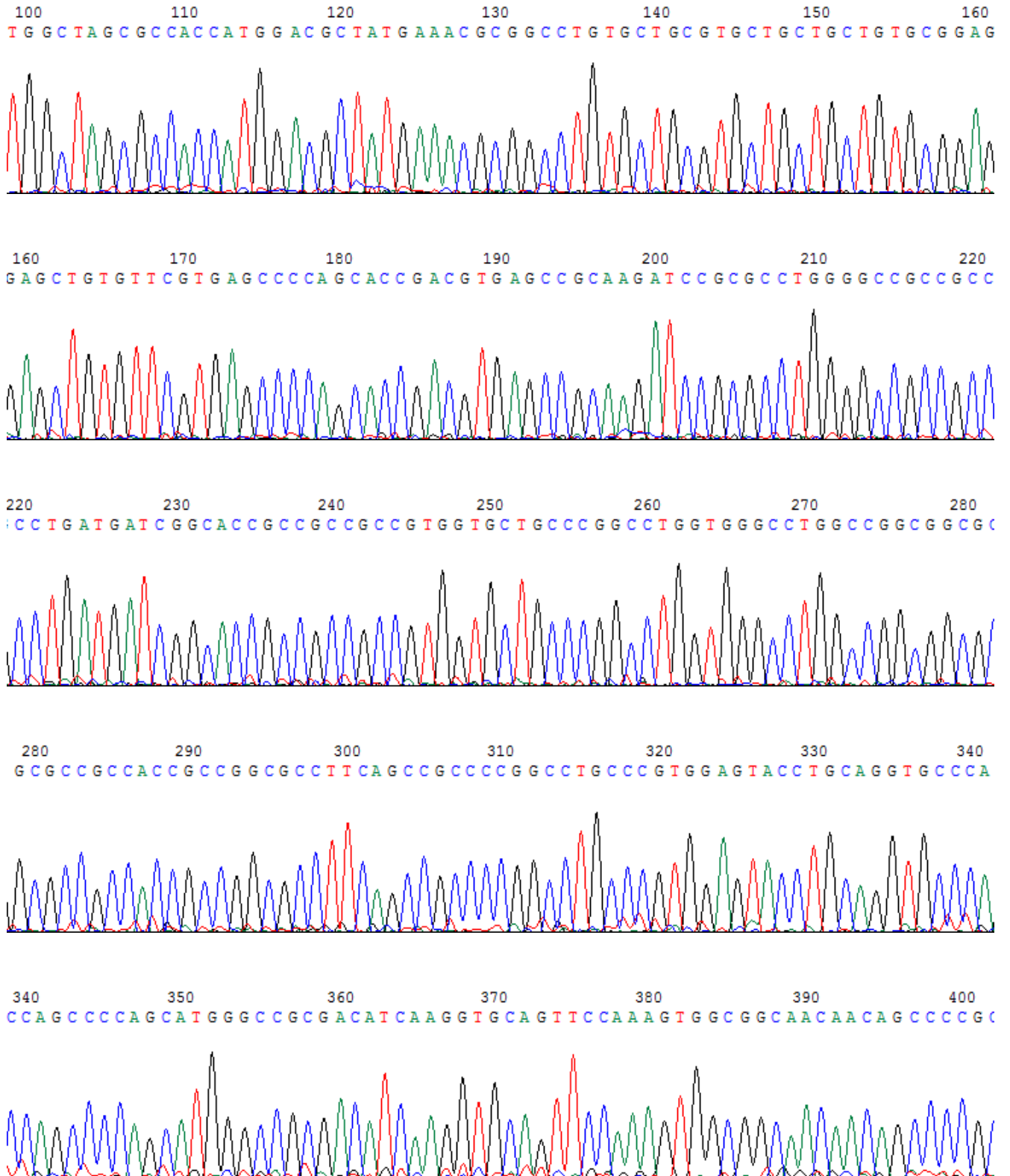


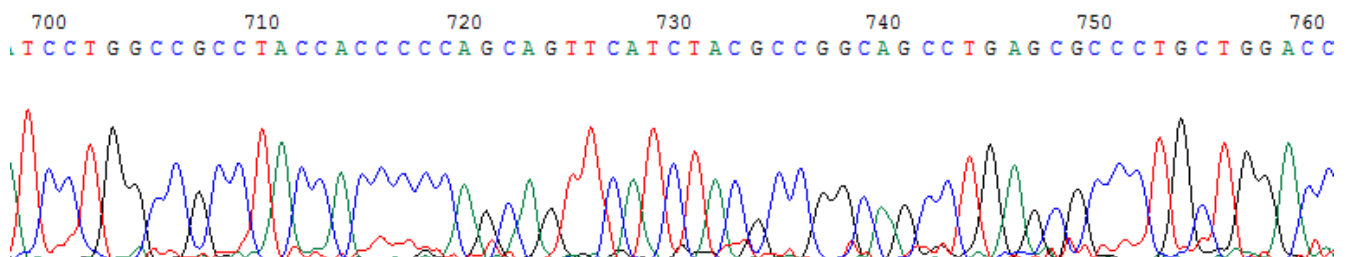
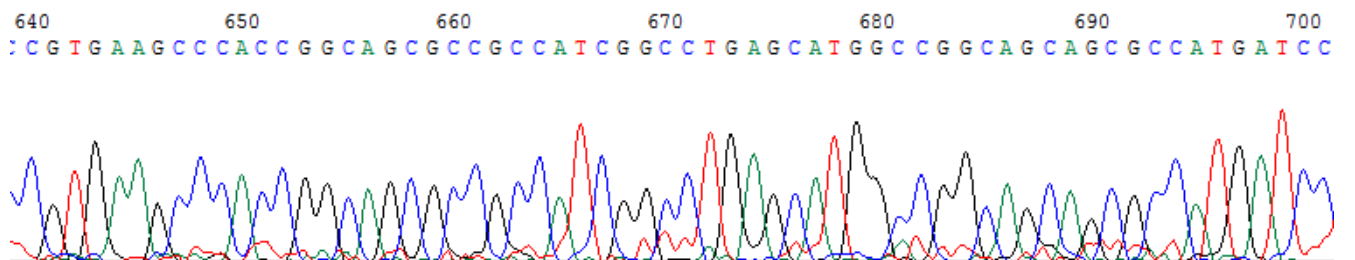
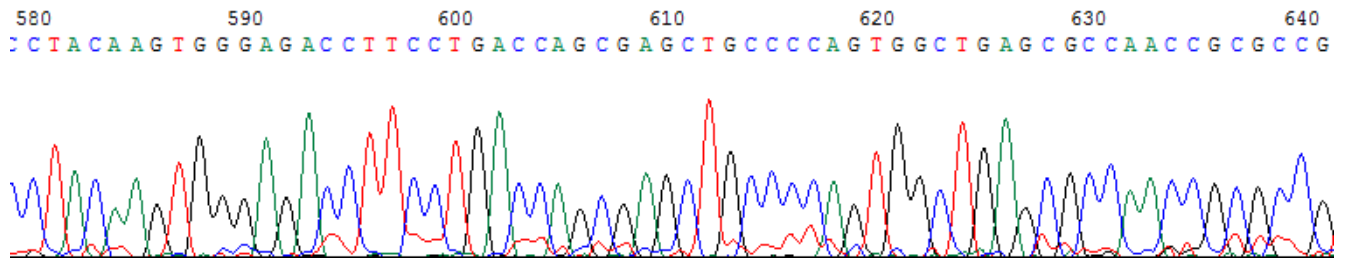
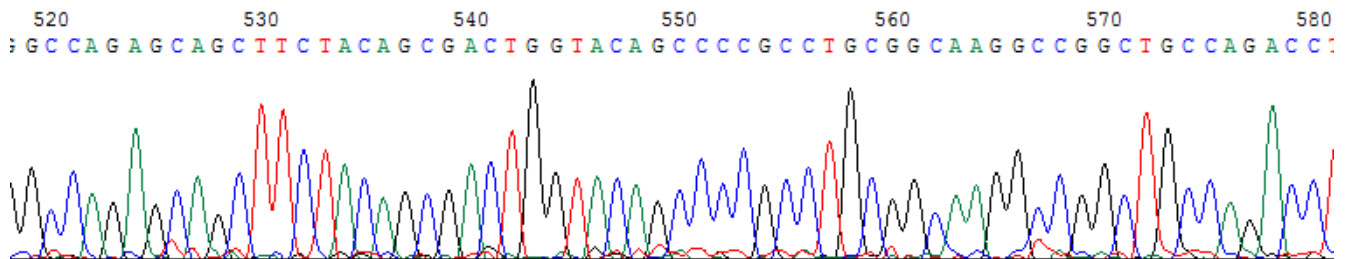
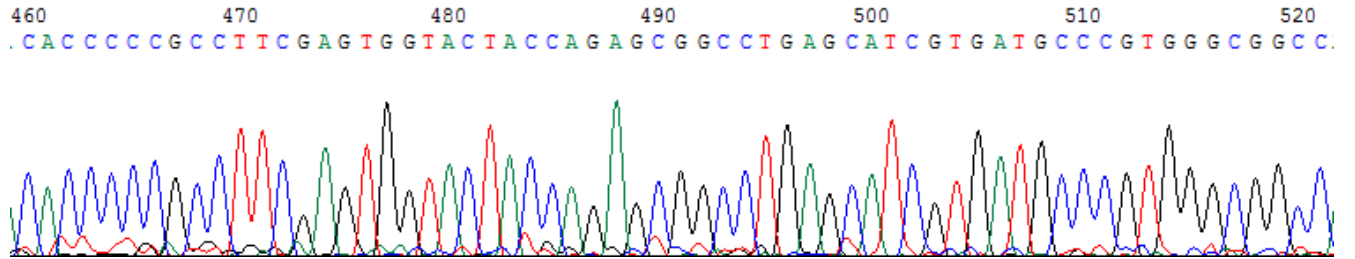
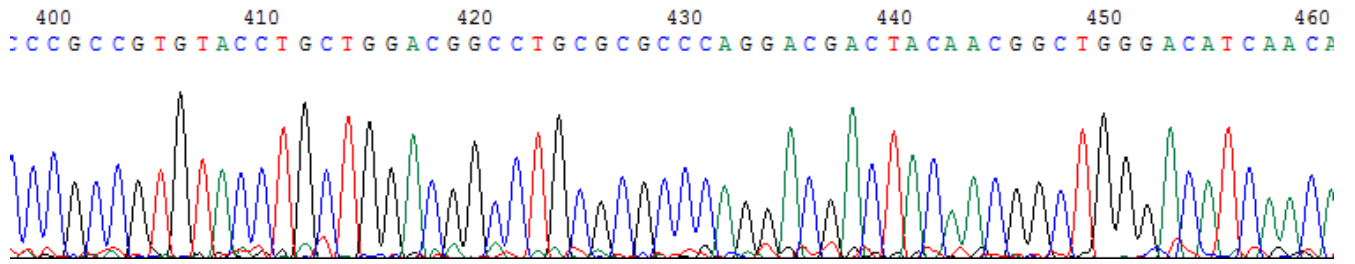
700 710 720 730 740 750 760
 : A C T T G T A G G T C T G G C A G C C G G C C T T G C C G C A G G C G G G C T G G T A C C A G T C G C T G T A G A A G C T G



9. Хроматограмма ДНК, кодирующей белок Ag85b *M.tuberculosis*

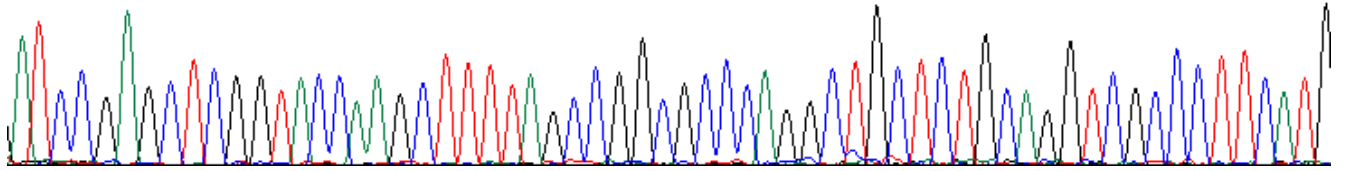
9.1. прочитано с использованием прямого праймера (фрагмент)



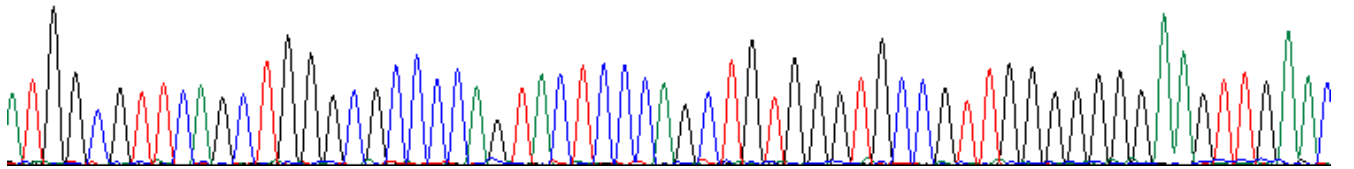


9.2. прочитано с использованием обратного праймера (фрагмент)

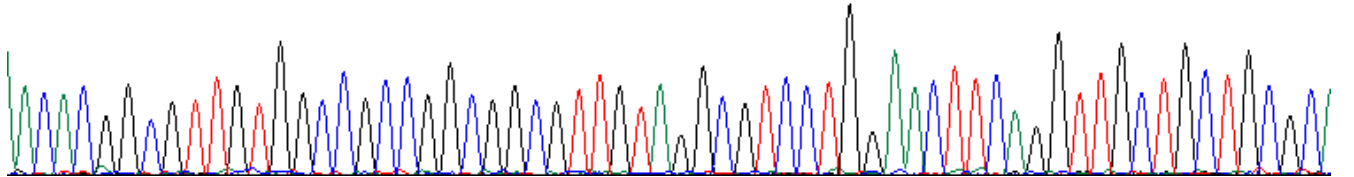
80 90 100 110 120 130 140
 ATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTTTAGCCGGCGCCAGGCTTGCTCTGCAGGTCGCCCTTCATG



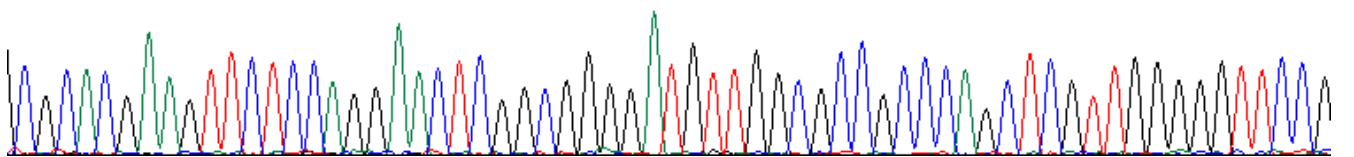
140 150 160 170 180 190 200
 ATGGCGTTCAGCTGGGCGCCCCAGTACTCCAGCTGTGGGTGCCGTTGGGGGGGAAGTTGAAC



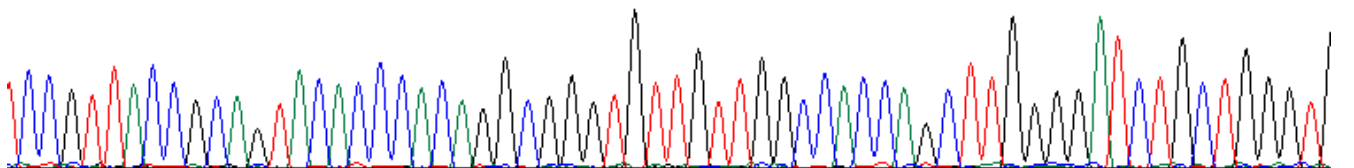
200 210 220 230 240 250 260
 ACACGGCGTTGTGGCCGCCGGCGGCGTTGTAGGCGTCTTGGAACCTTCAGGTTGCTGCTGCGCT



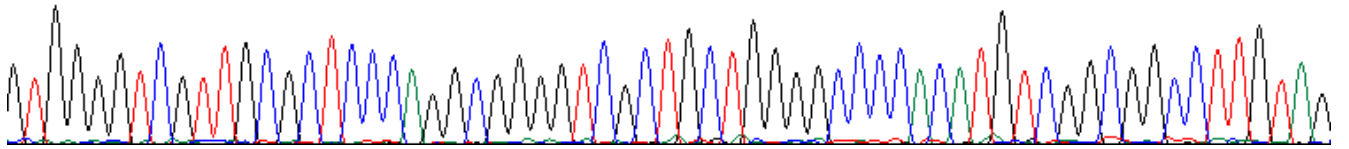
260 270 280 290 300 310 320
 CGCACGAAGTTCCTCAGGAACCTCGGCGGGGATGTTGGCGCCGCCAGCTTCGTTGGGGGTTCCG



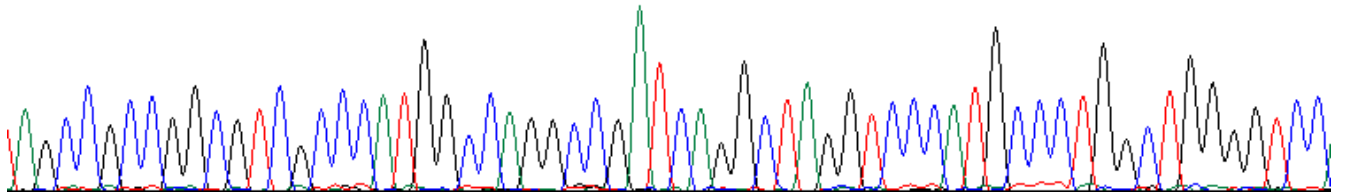
320 330 340 350 360 370 380
 CCGTTACCGCAGTACACCCACAGGCGGGTGTGTTGTTGGCCACCAAGCTTGGGGATCTGCTGGGTT



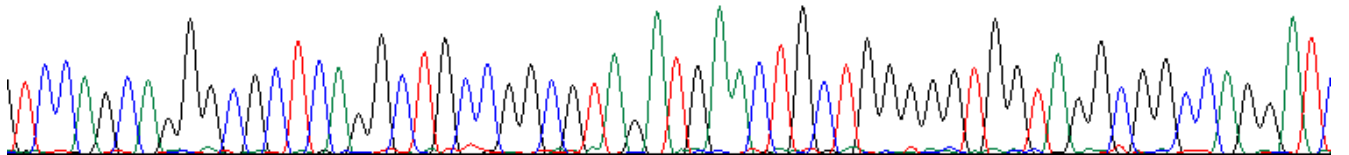
380 390 400 410 420 430 440
 GTGGGGTCTGTTGCGCTCCCAAGGCGGGTCTGCTGCTGGGGGCCCCACATGTCGGCGGCCCTTGTAG



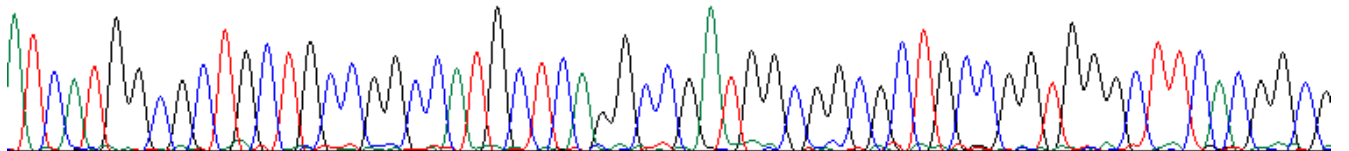
440 450 460 470 480 490 500
 TAGCCGCCGGCGTCCCAATGGCAGGCCGATCAGGCTAGGTCCCATGCCCTGGCTGGGGTCC



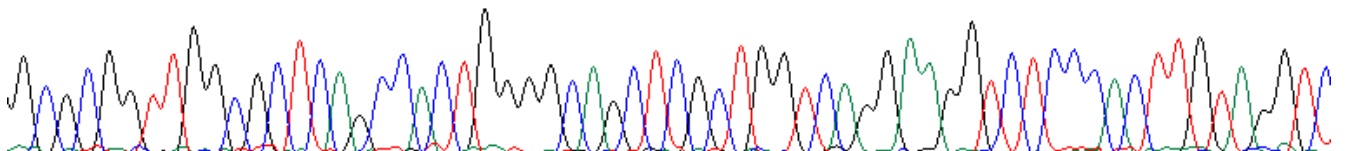
500 510 520 530 540 550 560
 TCCAGCAGGGCGCTCAGGCTGCCGGCGTAGATGAACCTGCTGGGGGTGGTAGGCCGACCAGGATC



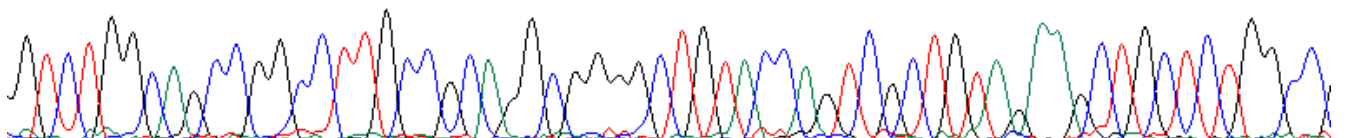
560 570 580 590 600 610 620
 ATCATGGCGCTGCTGCCGGCCATGCTCAGGCCGATGGCGGCGCTGCCGGTGGGCTTCACGGCG



620 630 640 650 660 670 680
 GCGCGGTTGGCGCTCAGCCACTGGGGCAGCTCGCTGGTTCAGGAAGGTCTCCCACTTGTAGGTC



680 690 700 710 720 730 740
 GTCTGGCAGCCGGCCTTGCAGCAGGCGGGCTGTACCAGTCGCTGTAGGAAGCTGCTCTGGCC



10. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, выявленных в результате секвенирования, относительно рассчитанной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Ag85a (референсной)

```

          10          20          30          40          50
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer CCGGGGGGGAGTATTAGCAGAGCTCTCTGGCTACTAGAGAACCCACTGCT
seq. using Reverse primer -----

          60          70          80          90          100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer TACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTG.
seq. using Reverse primer -----G

          110         120         130         140         150
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer CTAGCGCCACCATGGACGCTATGAAACGGGCCCTGTGCTGCGTGCTGCTG
seq. using Reverse primer -----T.CT.A..T.T.TGT.GT.....AT...

          160         170         180         190         200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer -CTGTGCGGAGCTGTGTTCTGTGAGCCCCAG-CCAGCTGGTGGACCCGCGTG
seq. using Reverse primer -----T..A.....TTCTGT...A.....CT...T.....T...

          210         220         230         240         250
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer CGCGGCGCC-GTGACCGCATGAGCCGCCCTGGTTCGTTGGCGCTGTGG
seq. using Reverse primer -----A.....C...A.C.....T.....--.....A.

          260         270         280         290         300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer GAGCCGCCCTGGTGTGAGCGGCCCTGGTGGGCGCC-GTGGGCGGCACCCCCAC
seq. using Reverse primer -----TGAGCT.....AGT.....A..A.A..A.....

          310         320         330         340         350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer CGCCGGCGCCTTCAGCCGCCCGGCCCTGCCCGTGGAGTACCTGCAGGTGC
seq. using Reverse primer -----A.....GTG.AT.....

          360         370         380         390         400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer CCAGCCCCAGCATGGGCCGACATCAAGGTGCAGTTCCAAAGTGGCGGC
seq. using Reverse primer -----

          410         420         430         440         450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DNA coding for Ag85a
seq. using Forward primer GCCAACAGCCCCGCCCTGTACCTGCTGGACGGCCTGCGCGCCAGGACGA
seq. using Reverse primer -----

```

```

          460          470          480          490          500
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a CTTTAGCGGGCTGGGACATCAACACCCCCGCCCTTCGAGTGGTACGACCAGA
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          510          520          530          540          550
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a GCGGCCGTGAGCGTGGTGGTGGCCGCGGCCAGAGCAGCTTCTACAGC
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          560          570          580          590          600
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a GACTGGTACCAGCCCCTGCGGCAAGGCCGGCTGCCAGACCTACAAGTG
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          610          620          630          640          650
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a GGAGACCTTCTGTACCAGCGAGCTGCCCGGCTGGCTGCAGGCCAACCGCC
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          660          670          680          690          700
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a ACGTGAAGCCCACCGGCAGCGCCGTGGTGGGCCGTGAGCATGGCCGCCAGC
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          710          720          730          740          750
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a AGCGCCCTGACCCGTGGCCATCTACCACCCCCAGCAGTTCGTGTACGCCGG
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          760          770          780          790          800
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a CGCCATGAGCGGCCGTGCTGGACCCCAGCCAGGCCAATGGGACCCACCCTGA
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          810          820          830          840          850
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a TCGGCCTGGCCATGGGCGACGCCGGCCGTACAAGGCCAGCGACATGTGG
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          860          870          880          890          900
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a GGCCCCAAGGAGGACCCCGCCGTGGCAGCGCAACGACCCCTGCTGAACGT
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

          910          920          930          940          950
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85a GGGCAAGCTGATCGCCAACAACACCCCGGTGTGGGTGTA CTGCGGCAACG
seq. using Forward primer .....
seq. using Reverse primer .....

```

```

          960      970      980      990      1000
DNA coding for Ag85a      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
seq. using Forward primer  GCAAGCCCAGCGACCTGGGCGGCAACAACCTGCCCGCCAAGTTCCCTGGAG
seq. using Reverse primer  ....T.....C.....-.....

          1010     1020     1030     1040     1050
DNA coding for Ag85a      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
seq. using Forward primer  GGCTTCGTGCGCACCAAGCAATCAAGTTCCAGGACGCCATCAACGCCGG
seq. using Reverse primer  .....-.....-.....

          1060     1070     1080     1090     1100
DNA coding for Ag85a      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
seq. using Forward primer  CGGCGGCCACAACGGCGTTCGACTTCCCCGACAGCGGCACCCACAGCT
seq. using Reverse primer  ..-.....-.....C.....-..TGCG.CAC..ACAGCTG

          1110     1120     1130     1140     1150
DNA coding for Ag85a      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
seq. using Forward primer  GGGAGTACTGGGGCGCCCAGCTGAACGCCATGAAGCCCGACCTGCAGCGC
seq. using Reverse primer  .TACTACTG...A.C.TGCTTGA.T.....GC..GA..T.....CG

          1160     1170     1180     1190     1200
DNA coding for Ag85a      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
seq. using Forward primer  GCACTCGGCGCCACCCCCAACACCGGCCCCGCCCGCCAGGGCGCCTAAAA
seq. using Reverse primer  TGC.ATA.G....T..CTG..ACCGG..CG....CAT.A..TCT..G

          1210     1220     1230     1240     1250
DNA coding for Ag85a      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
seq. using Forward primer  GCTT-----
seq. using Reverse primer  CT.GATGAGCTCTGATCCAGTCCGAGGTGGCGTGCAATCTTCGGCTATAT
.....GGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTCCTGCAG

          1260     1270     1280     1290
DNA coding for Ag85a      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
seq. using Forward primer  -----
seq. using Reverse primer  CTTTCGATGTCAATCGTTGCATGCATGAT
ATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGACCCGTAAACCCCT

```

Точками отмечены нуклеотиды, совпадающие с референсной нуклеотидной последовательностью.

11. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, выявленных в результате секвенирования, относительно рассчитанной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Ag85b (референсной)

```

          10      20      30      40      50
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  GCGGTTGGAGTTAATAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGC
seq. using Reverse primer  -----

          60      70      80      90     100
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  TTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTG
seq. using Reverse primer  -----

          110     120     130     140     150
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  GCTAGCGCCACCATGGACGCT-ATGAAACGCGGCCCTGTGCTGC-GTGCTG
seq. using Reverse primer  .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
    -----AC...T...A...A...A...

          160     170     180     190     200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  CTGCTGTGCGGA-GCTGTGTTCTGTGAGCCCCAGCACCCGCTGAGCCGCA
seq. using Reverse primer  .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
    .....A...C...G...-.....A...

          210     220     230     240     250
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  AGATCCGCGCCTGGGGCCGCCCTGATGATCGGCACCCGCCGCCGCTG
seq. using Reverse primer  .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....

          260     270     280     290     300
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  GTGCTGCCCGCCCTGGTGGGCCCTGGCCGGCGGCAGCCACCCGGCGC
seq. using Reverse primer  .....-A.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....

          310     320     330     340     350
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  CTTAGCCGCCCGCCCTGCCCTGGAGTACCTGCAGGTGCCAGCCCCA
seq. using Reverse primer  T.....

          360     370     380     390     400
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  GCATGGGCCGCGACATCAAGGTGCAGTTCCAAAGTGGCCGCAACAACAGC
seq. using Reverse primer  .....

          410     420     430     440     450
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  CCCGCCGTGTACCTGCTGGACGGCCTGCGCGCCAGGACGACTACAACGG
seq. using Reverse primer  .....A.....

```



```

          460      470      480      490      500
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  CTGGGACATCAACACCCCGCCTTCGAGTGGTACTACCAGAGCGGCCCTGA
seq. using Reverse primer  .....

          510      520      530      540      550
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  GCATCGTGATGCCCGTGGGCGGCCAGAGCAGCTTCTACAGCGACTGGTAC
seq. using Reverse primer  .....

          560      570      580      590      600
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  AGCCCCGCCGCGCAAGGCCGGCTGCCAGACCTACAAGTGGGAGACCTT
seq. using Reverse primer  .....

          610      620      630      640      650
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  CCTGACCAGCGAGCTGCCCCAGTGGCTGAGCGCCAACCGCGCCGTGAAGC
seq. using Reverse primer  .....

          660      670      680      690      700
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  CCACCGGCAGCGCCGCCATCGGCCGTGAGCATGGCCGGCAGCAGCGCCATG
seq. using Reverse primer  .....

          710      720      730      740      750
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  ATCCTGGCCGCTACCACCCCCAGCAGTTCATCTACGCCGGCAGCCTGAG
seq. using Reverse primer  .....

          760      770      780      790      800
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  CGCCCTGCTGGACCCAGCCAGGGCATGGGACCTAGCCTGATCGGCCCTGG
seq. using Reverse primer  .....

          810      820      830      840      850
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  CCATGGGCGACGCCGGCGGCTACAAGGCCCGCCGACATGTGGGGCCCCAGC
seq. using Reverse primer  .....

          860      870      880      890      900
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  AGCGACCCCGCCTGGGAGCGCAACGACCCACCCAGCAGATCCCCAAGCT
seq. using Reverse primer  .....

          910      920      930      940      950
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer  GGTGGCCAACAACACCCCGCCTGTGGGTGTA CTGCGGTAACGGAAACCCCA
seq. using Reverse primer  .....

```

```

          960          970          980          990          1000
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    ACGAGCTGGGCGGCGCCAACATCCCCGCCGAGTTCCTGGAGAACTTCGTG
    .....-.....-.....TGA.---.....
    .....

          1010          1020          1030          1040          1050
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CGCAGCAGCAACCTGAAGTTCAGGACGCCACCAACGCCGCCGGCGGCCA
    .....-.....-.....-.....A.-.
    .....

          1060          1070          1080          1090          1100
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CAACGCCGTGTTCAACTTCCCCCAACGGCACCCACAGCTGGGAGTACT
    ..-.....-.....-C.T.....-.....
    .....

          1110          1120          1130          1140          1150
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GGGGCGCCAGCTGAACGCCATGAAGGGCGACCTGCAGAGCAGCCTGGGC
    .....-.....T-.....T..C-.....TA...T
    .....

          1160          1170          1180          1190          1200
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GCCGGCTAAAAGCTT-----
    ....CT..T.C...G-TACCGAGCTCGGATCCACTACTCTATGTGTGTG
    .....GGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTG

          1210          1220          1230          1240          1250
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
    -----
    ATAATT
    G-AATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGACC

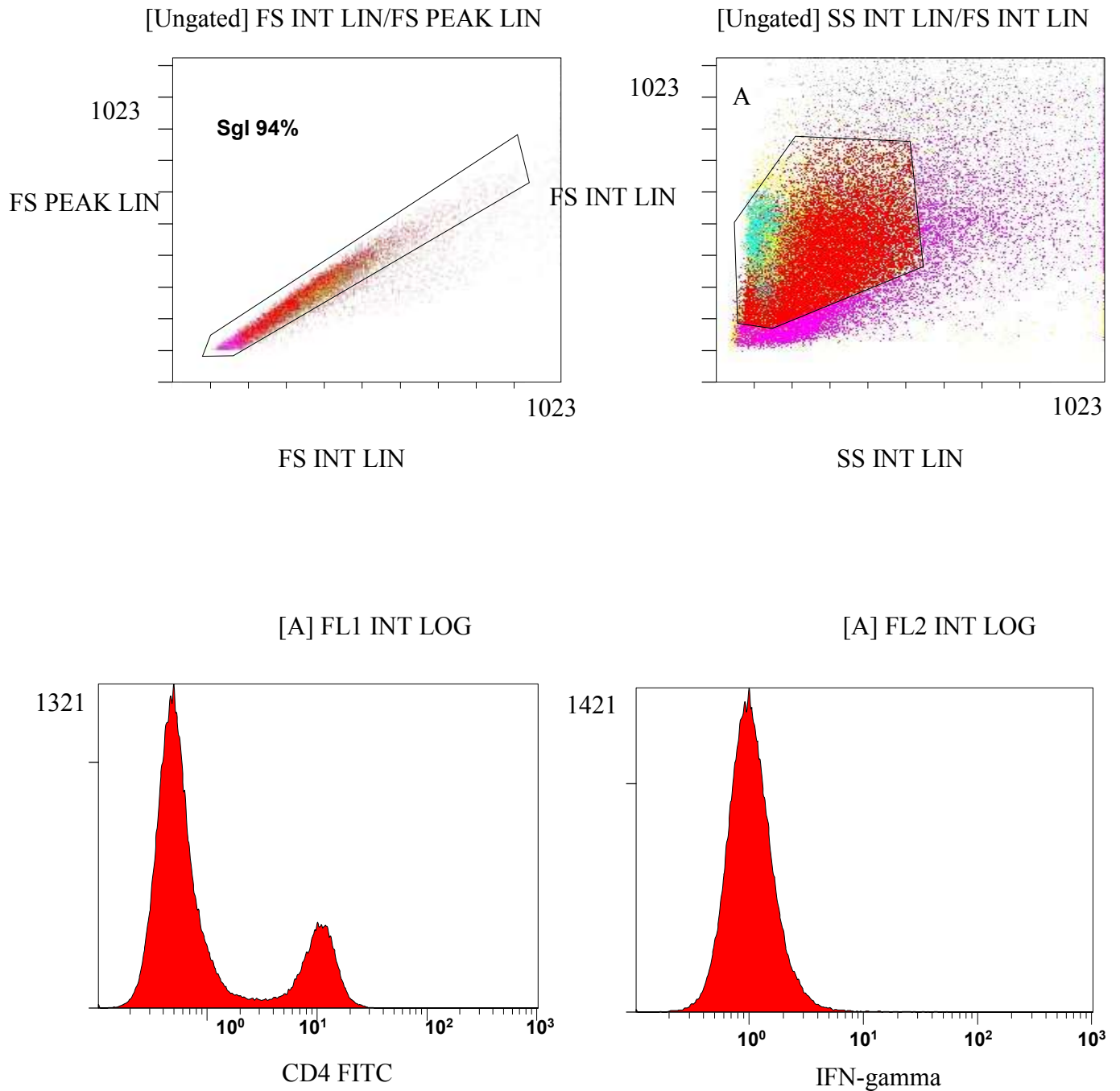
          1260
DNA coding for Ag85b
seq. using Forward primer
seq. using Reverse primer
    ....|....|.
    CGTAAGCCCAA

```

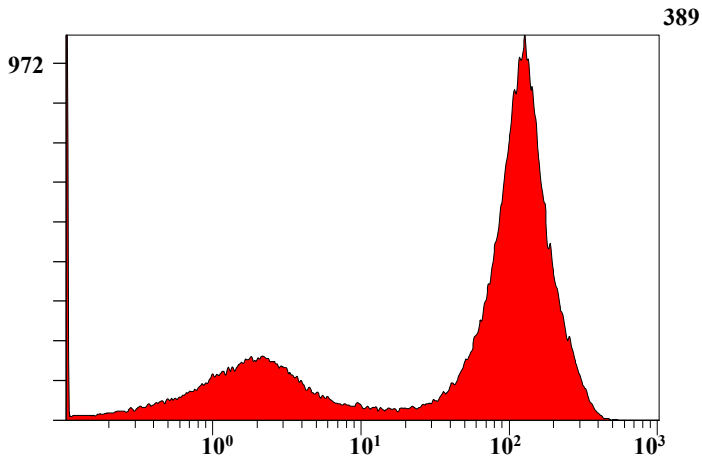
Точками отмечены нуклеотиды, совпадающие с референсной нуклеотидной последовательностью.

12. Графики распределения популяций Т-лимфоцитов, опыт 5

12.1. Подготовка к анализу групп

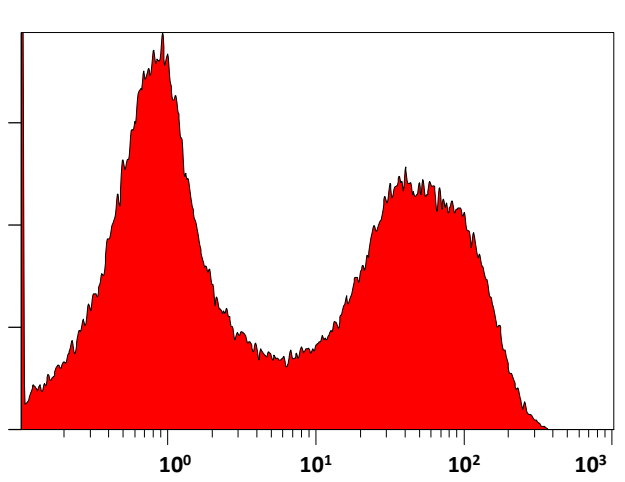


[A] FL6 INT LOG



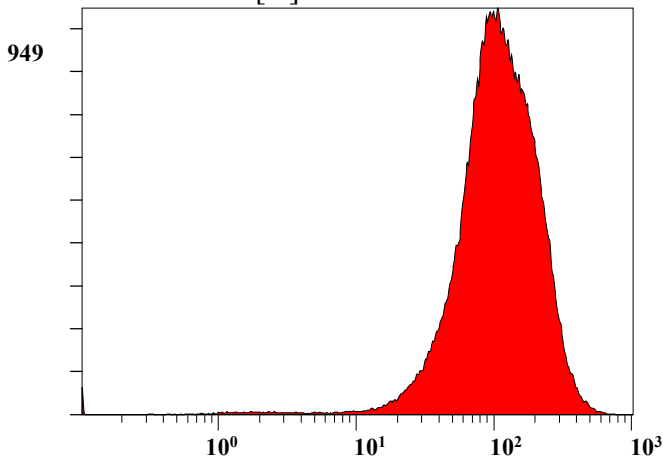
FL6 INT LOG

[A] FL4 INT LOG



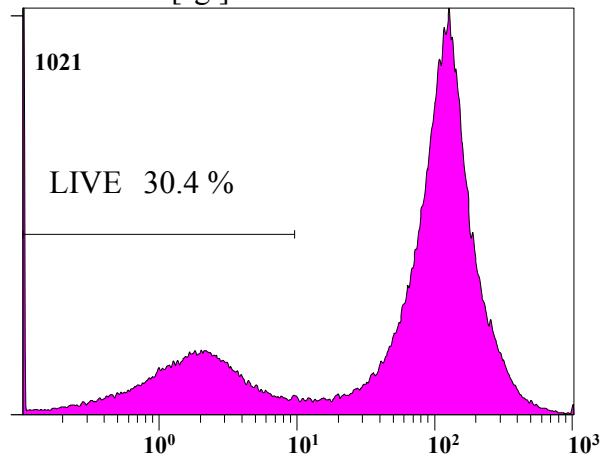
CD8 PC5.5

[A] FL8 INT LOG



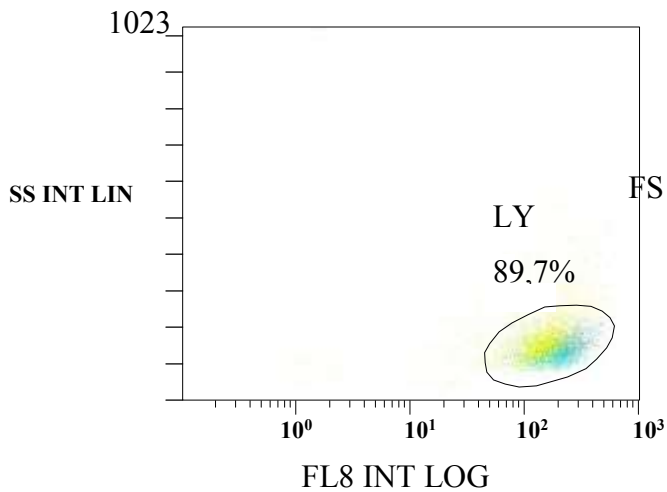
FL8 INT LOG

[sgl] FL6 INT LOG

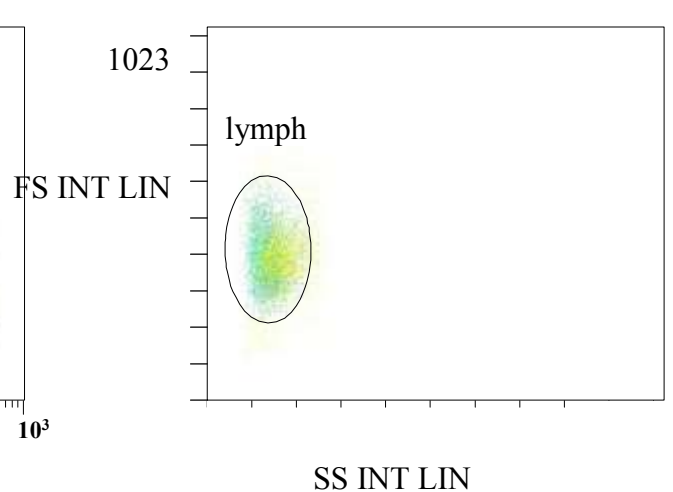


FL6 INT LOG

[sgl AND LIVE] FL8 INT LOG/SS INT LIN

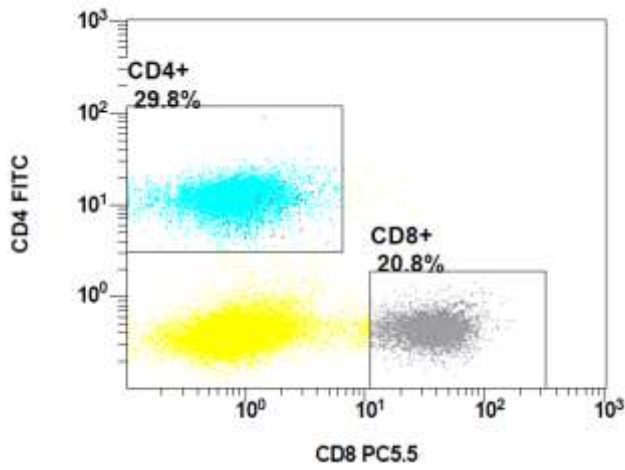


[sgl AND LIVE AND LY] SS INT LIN/FS INT LIN

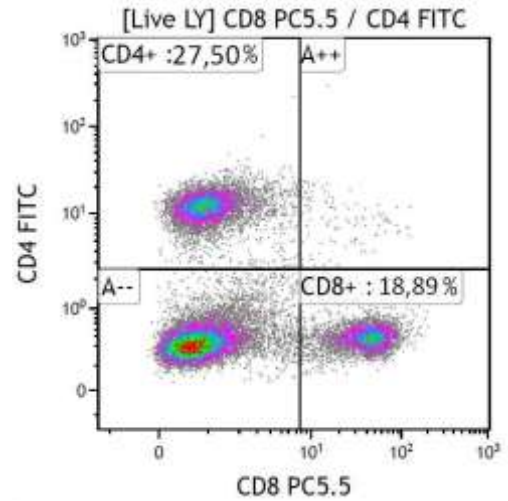


12.2. Графики распределения популяций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов

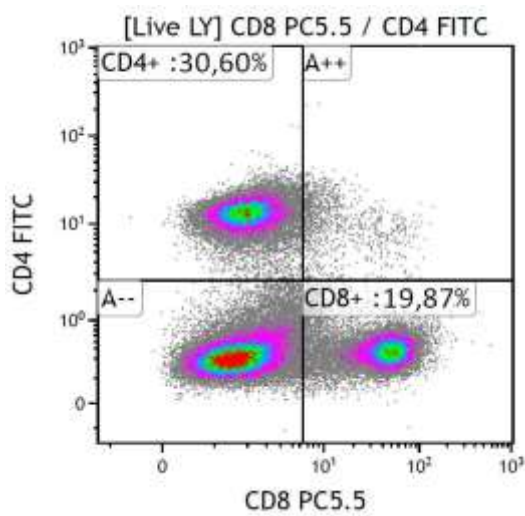
12.2.1. Группа интактных животных



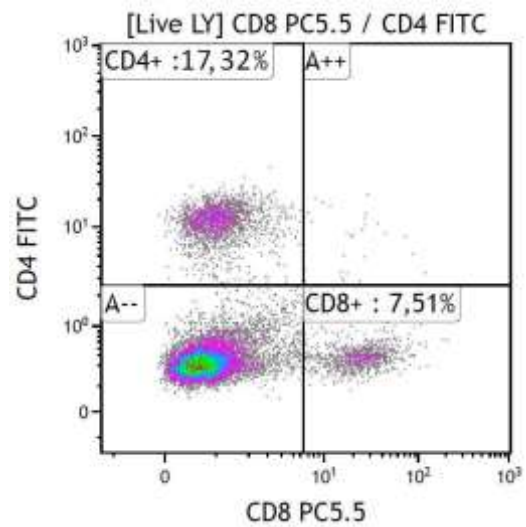
при отсутствии
стимуляции



при стимуляции гибридным белком
в концентрации 40 мкг/мл

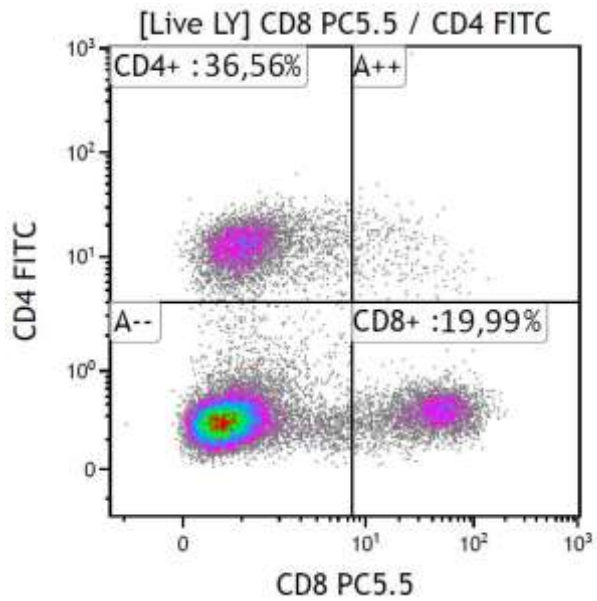


при стимуляции стафилококковым
энтеротоксином В

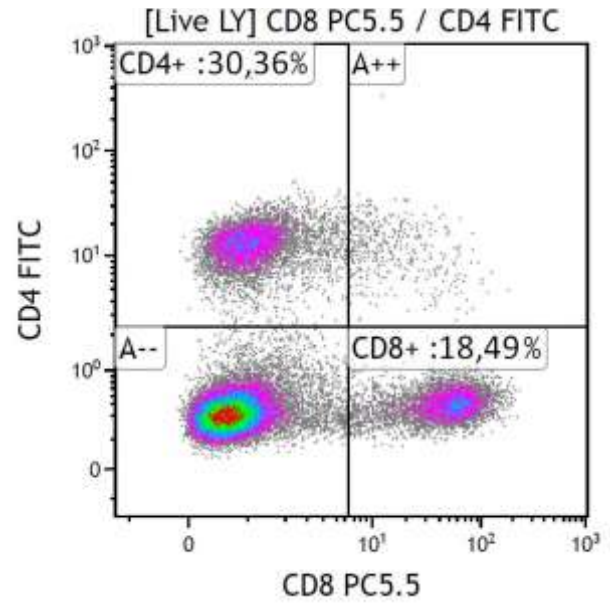


при стимуляции гибридным белком в
концентрации 400 мкг/мл

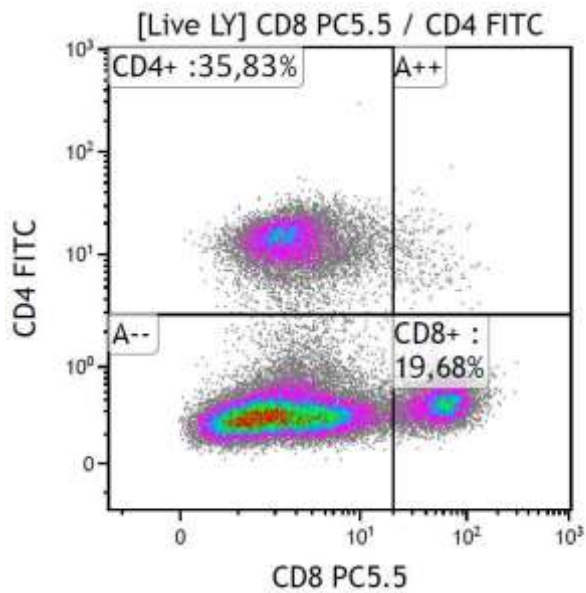
12.2.2. Группа контроля заражения



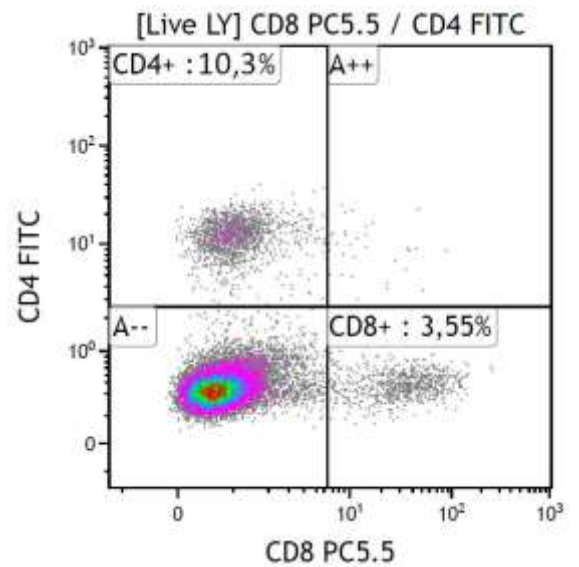
при отсутствии стимуляции



при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл

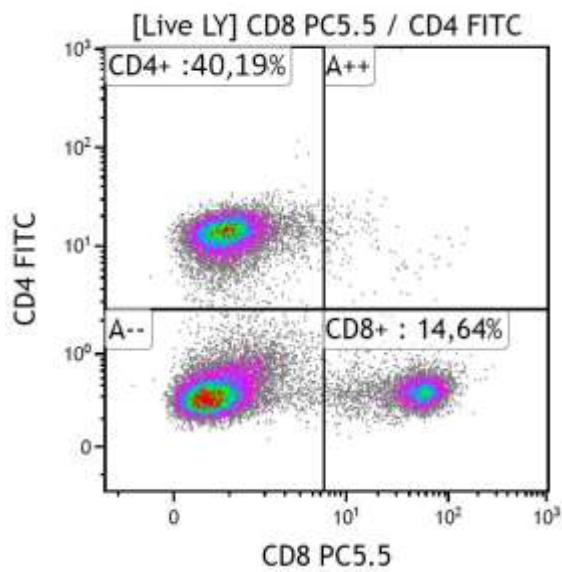


при стимуляции стафилококковым энтеротоксином В

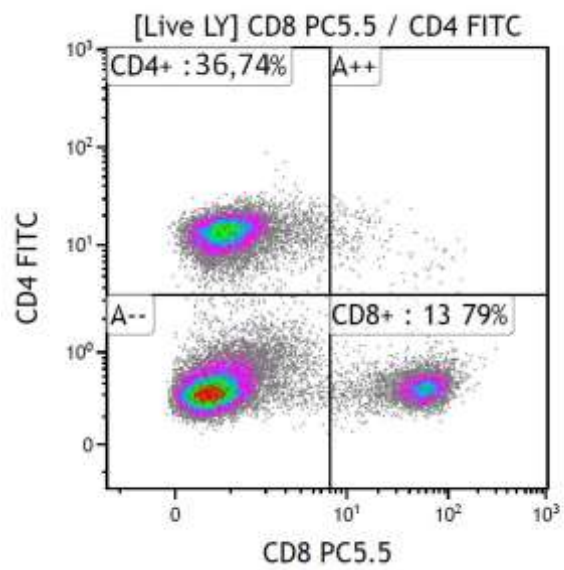


при стимуляции гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл

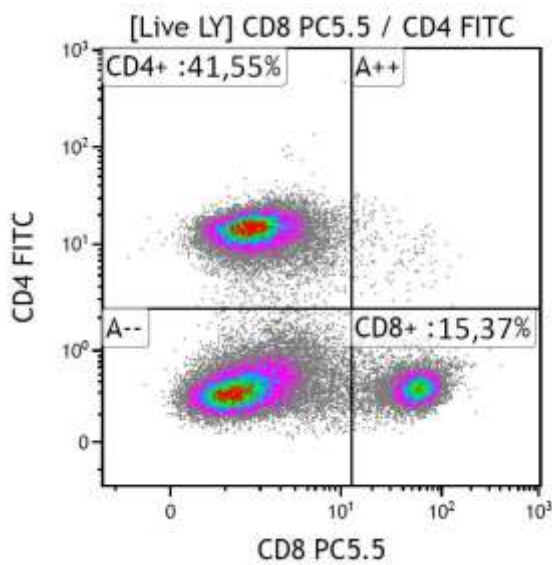
12.2.3. Группа БЦЖ, введенной по стандартной методике



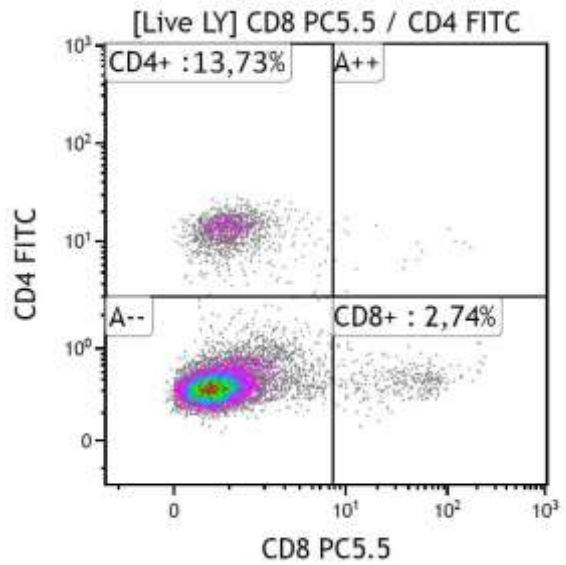
при отсутствии стимуляции



при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл

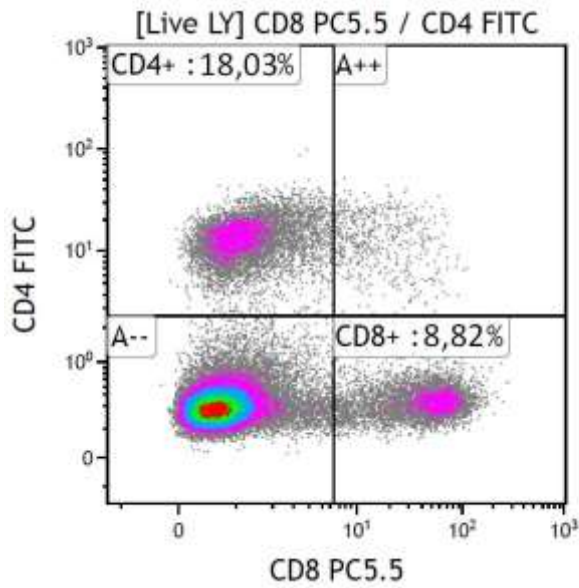


при стимуляции стафилококковым энтеротоксином В

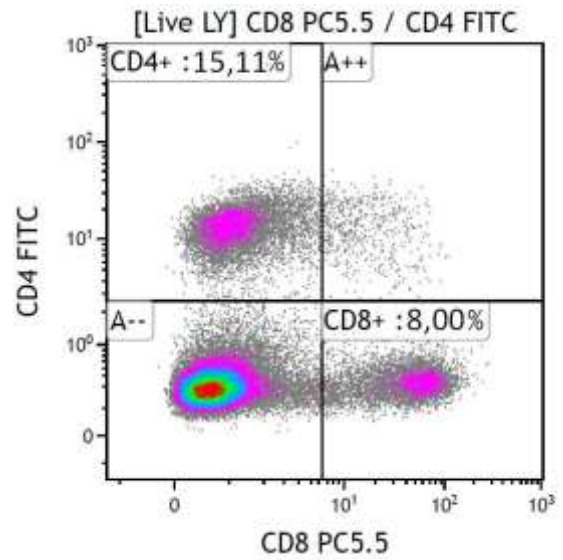


при стимуляции гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл

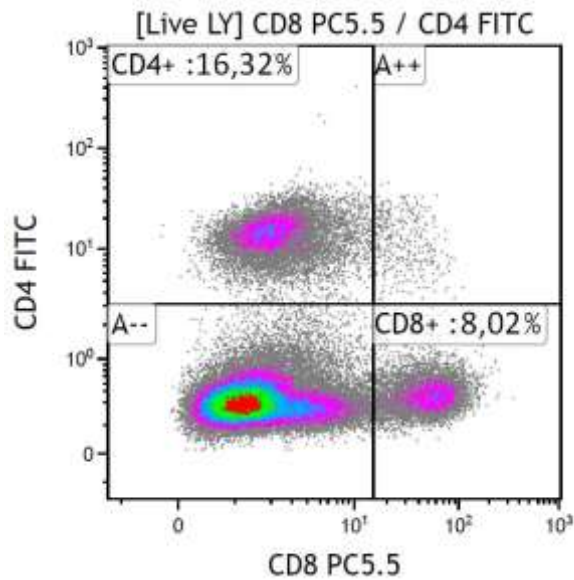
12.2.4. Группа «гибридный белок в/м»



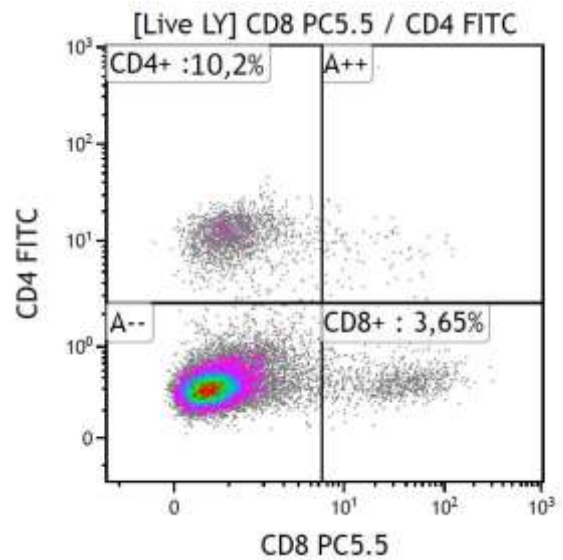
при отсутствии стимуляции



при стимуляции гибридным белком в концентрации 40 мкг/мл



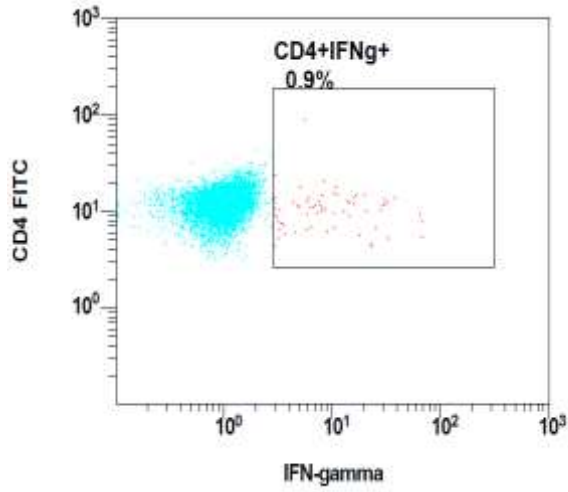
при стимуляции стафилококковым энтеротоксином В



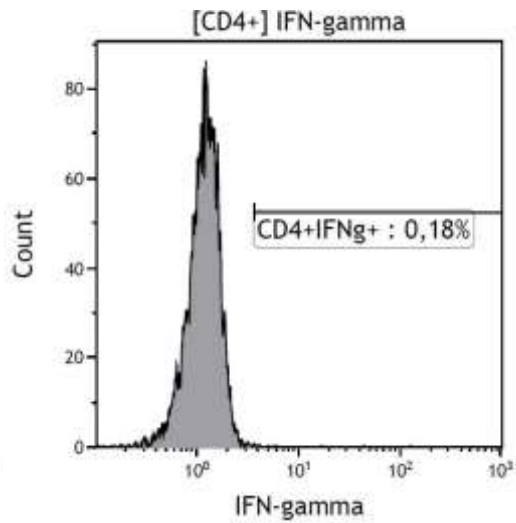
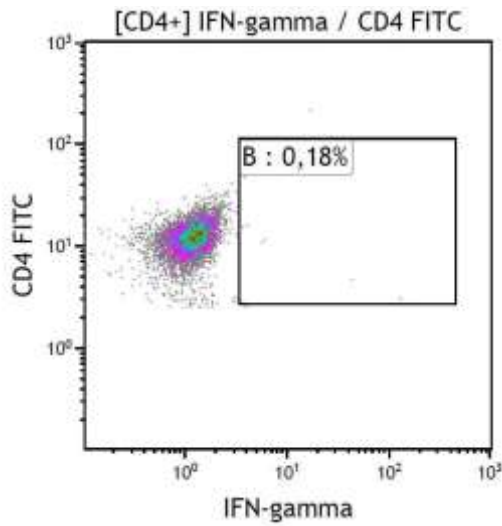
при стимуляции гибридным белком в концентрации 400 мкг/мл

12.3. Графики распределения популяций CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ

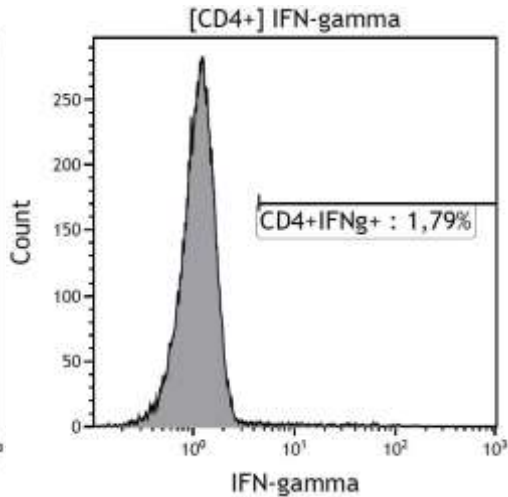
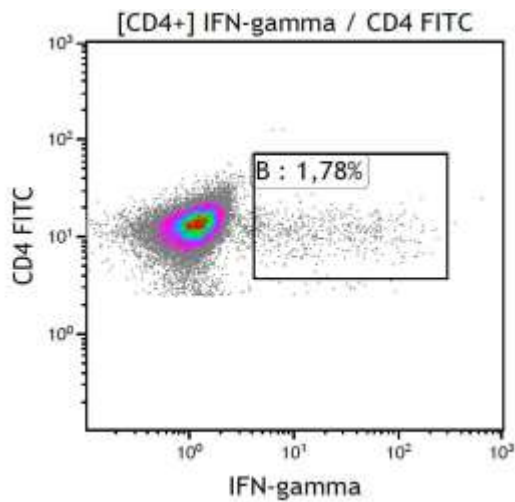
12.3.1. Группа интактных животных



при отсутствии стимуляции

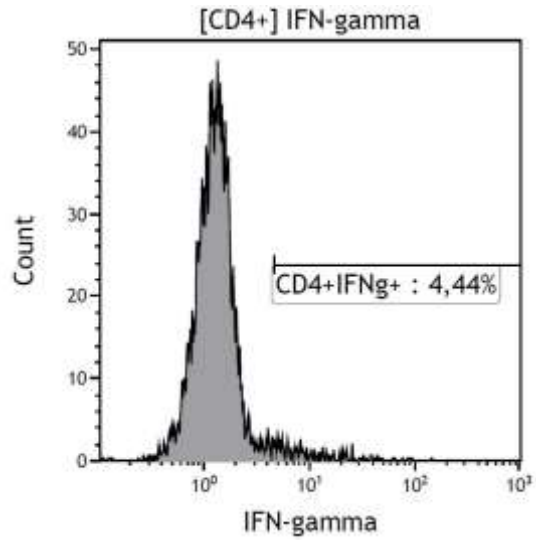
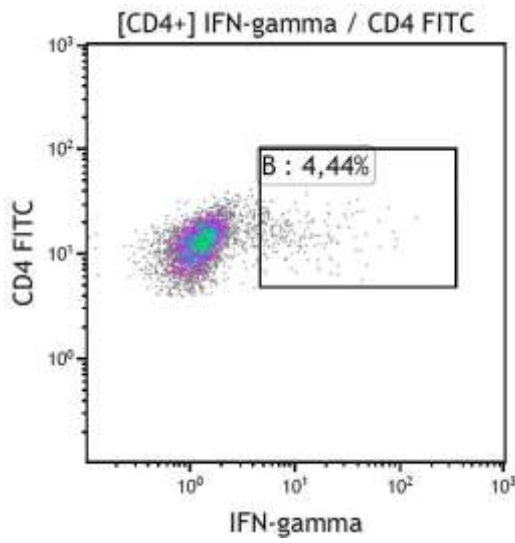


при
стимуляции
гибридным
белком в
концентрации
40 мкг/мл

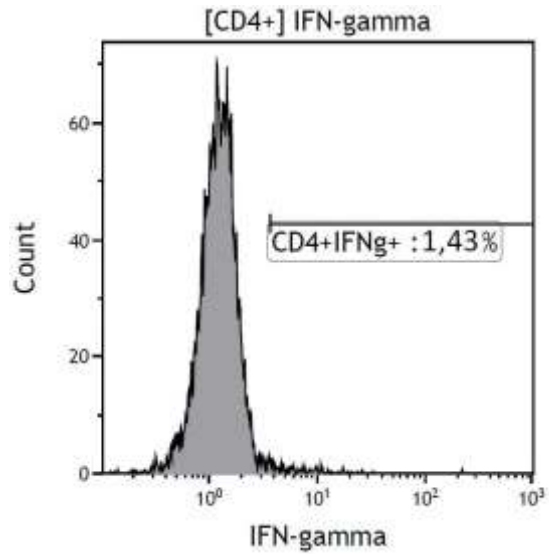
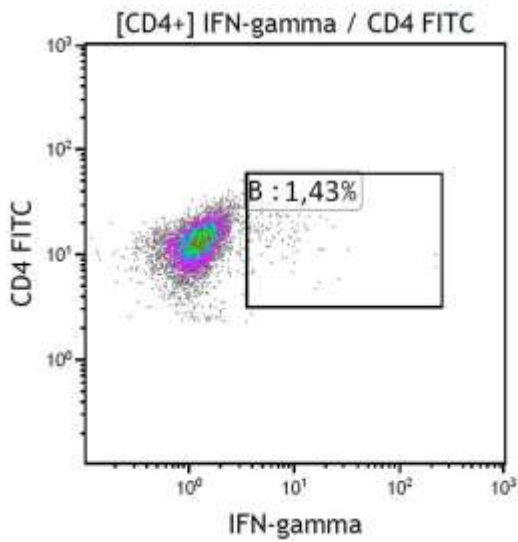


при
стимуляции
SEB

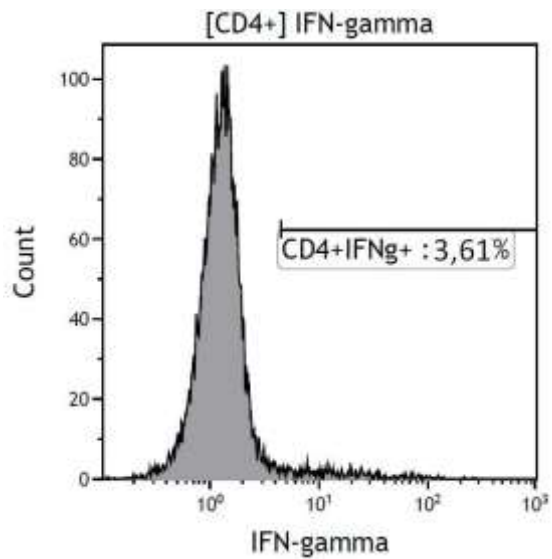
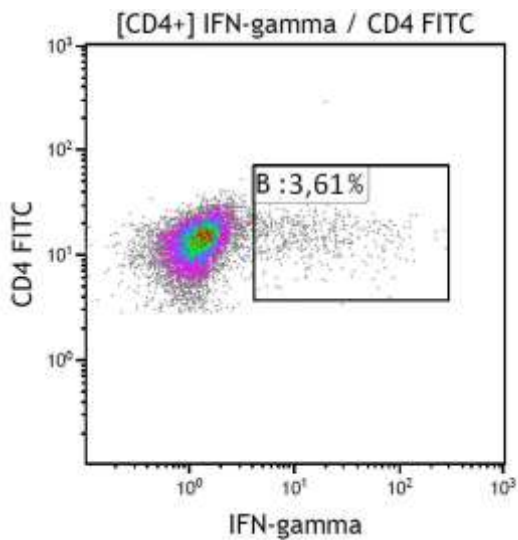
12.3.2. Группа контроля заражения



при
отсутствии
стимуляции

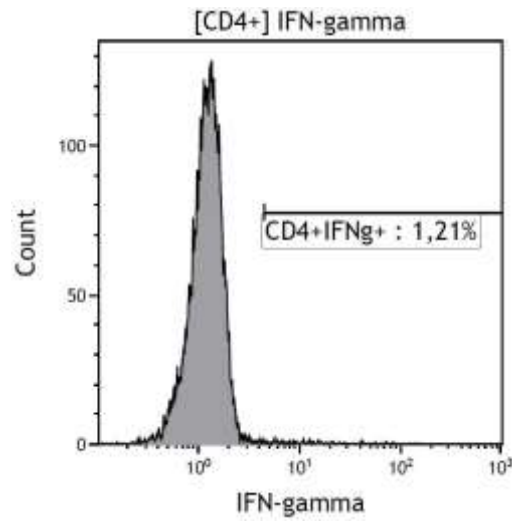
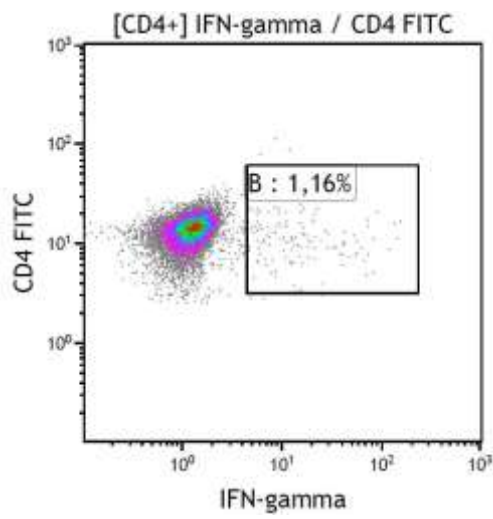


при
стимуляции
гибридным
белком в
концентрации
40 мкг/мл

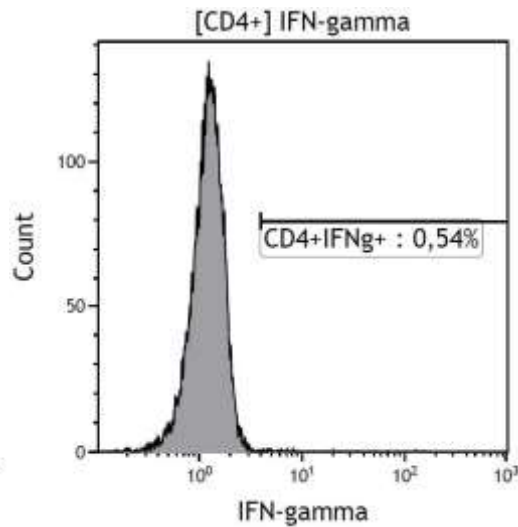
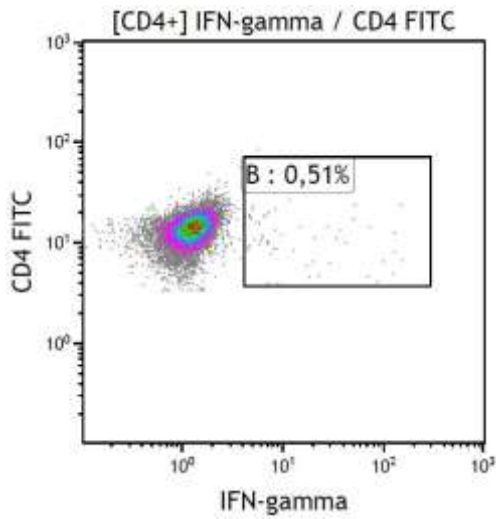


при
стимуляции
SEB

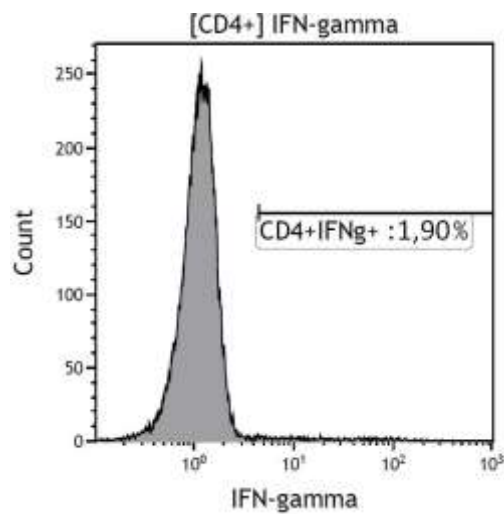
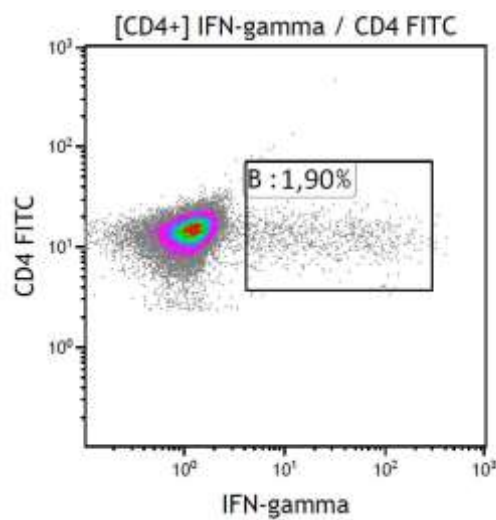
12.3.3. Группа БЦЖ, введенной по стандартной методике



при
отсутствии
стимуляции

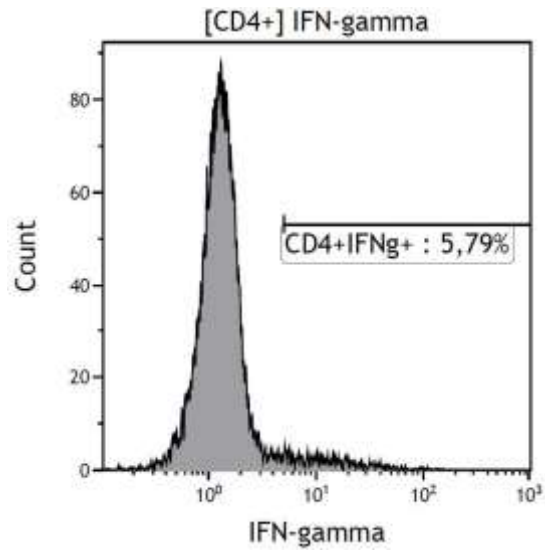
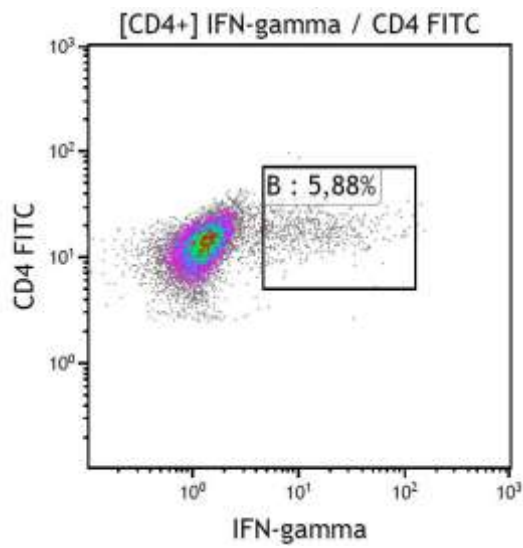


при
стимуляции
гибридным
белком в
концентрации
40 мкг/мл

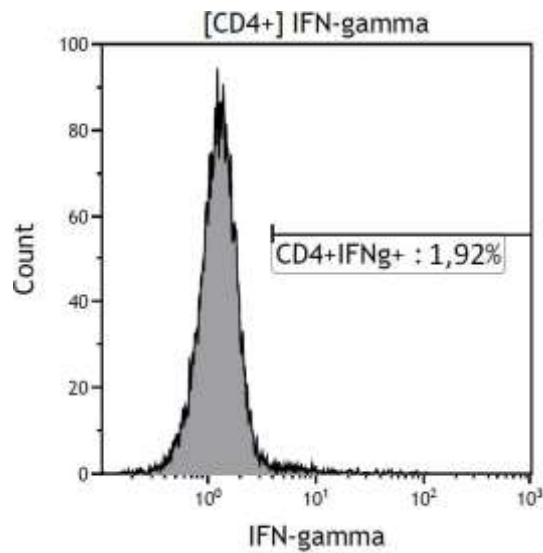
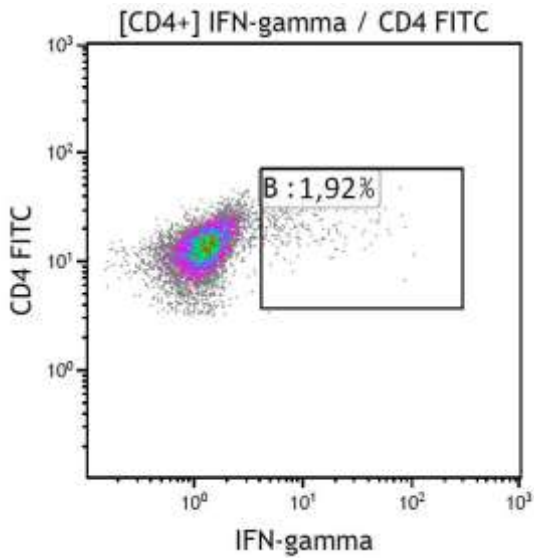


при
стимуляции
SEB

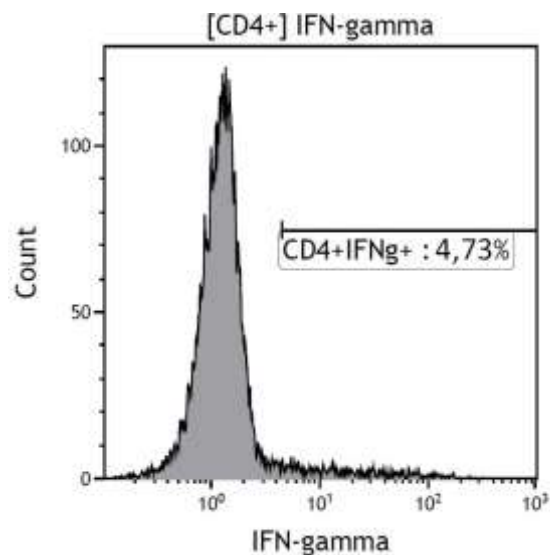
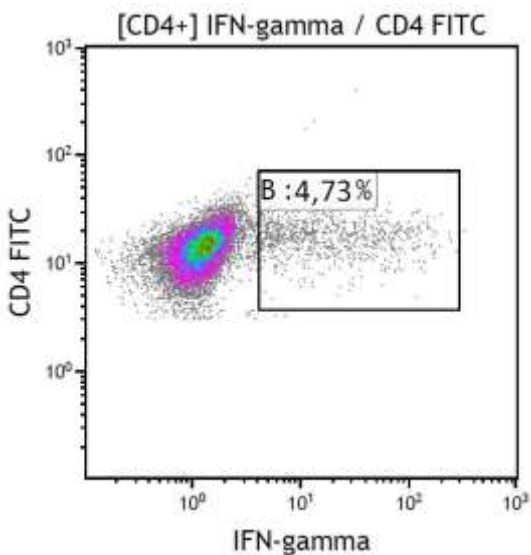
12.3.4. Группа «гибридный белок в/м»



при
отсутствии
стимуляции



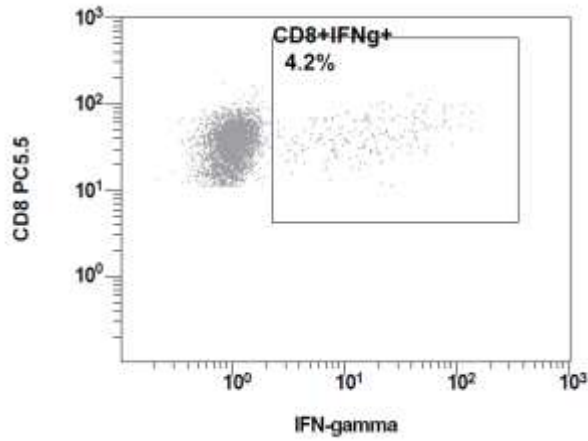
при
стимуляции
гибридным
белком в
концентрации
40 мкг/мл



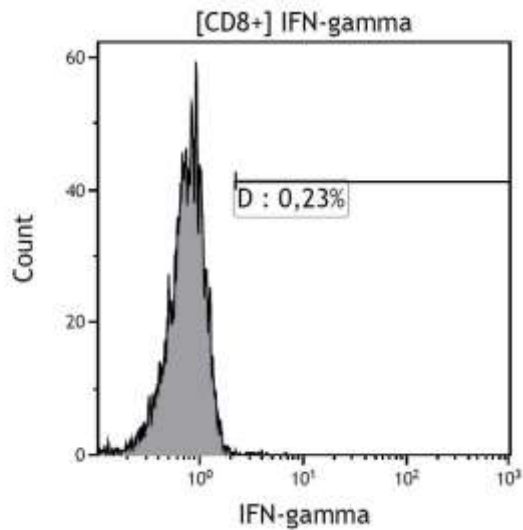
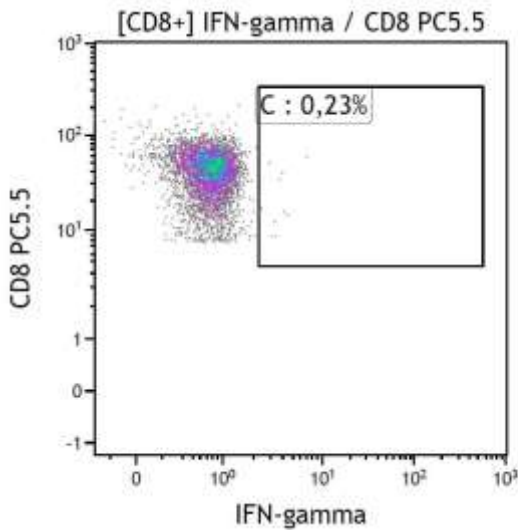
при
стимуляции
SEB

12.4. Графики распределения популяций CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ

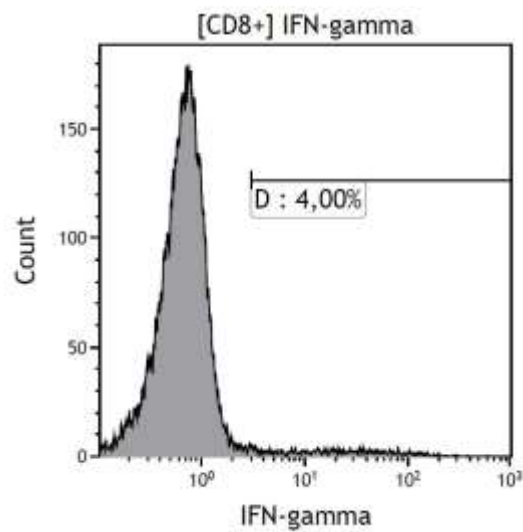
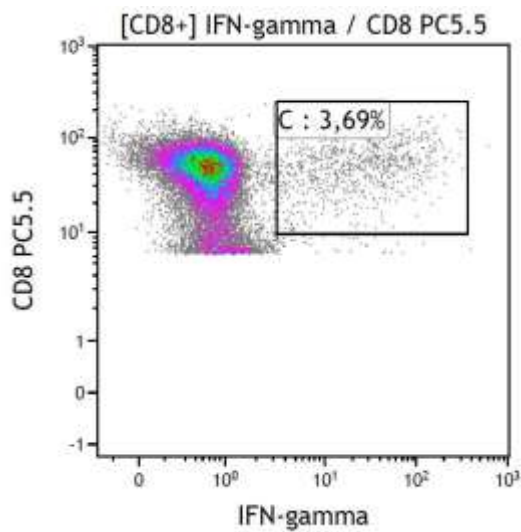
12.4.1. Группа интактных животных



при отсутствии стимуляции

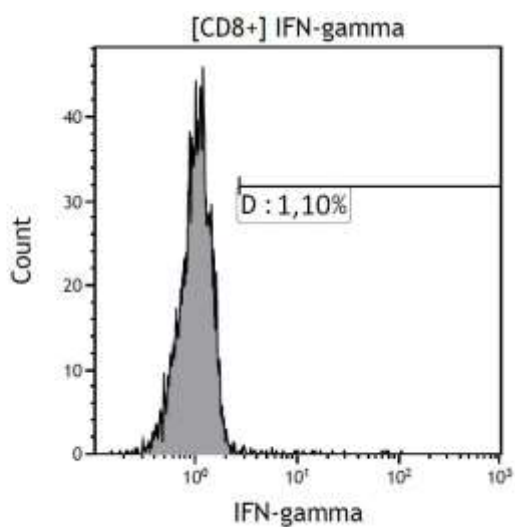
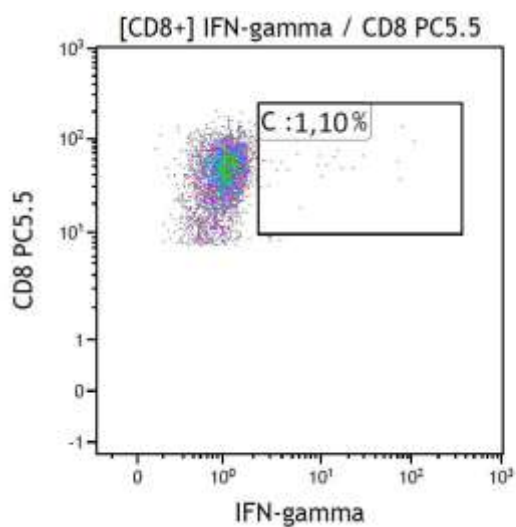


при
стимуляции
гибридным
белком в
концентрации
40 мкг/мл

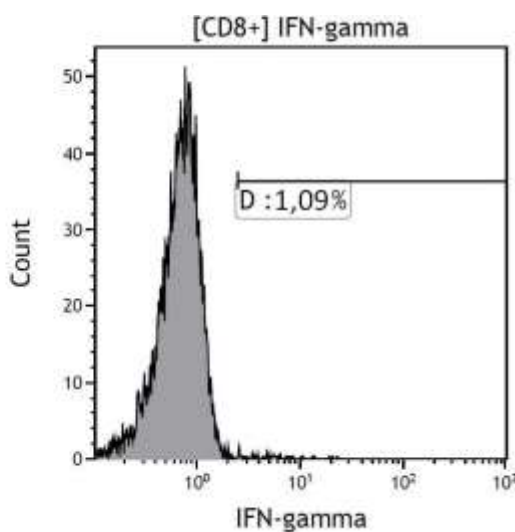
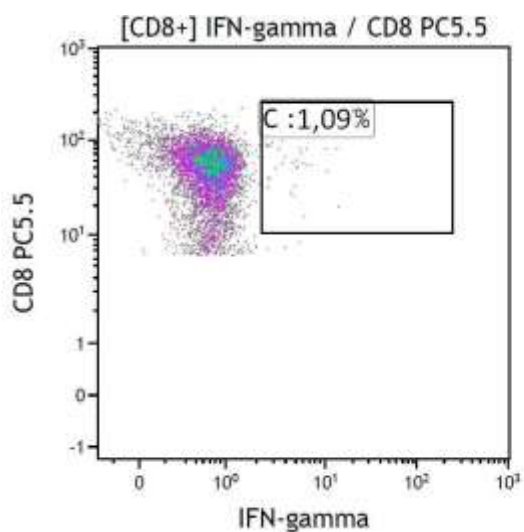


при
стимуляции
SEB

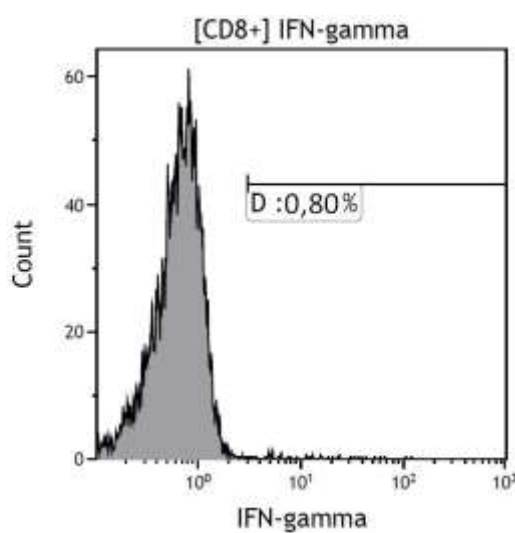
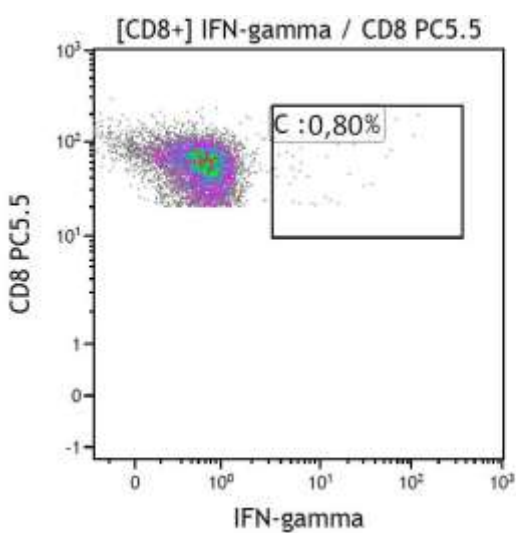
12.4.2. Группа контроля заражения



при
отсутствии
стимуляции

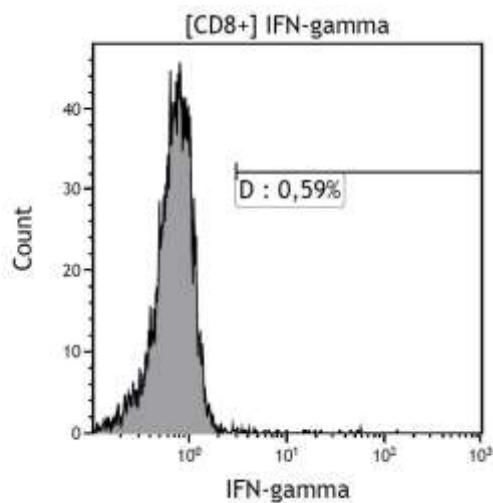
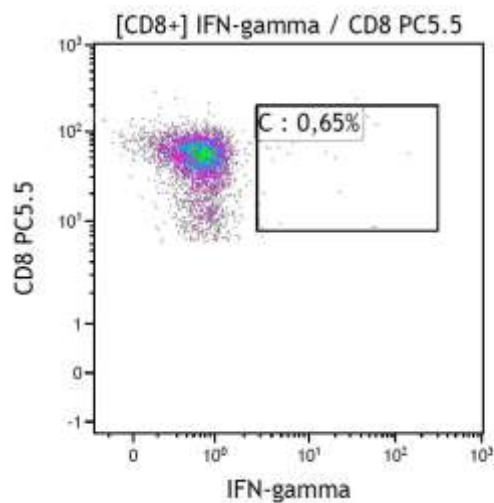


при
стимуляции
гибридным
белком в
концентрации
40 мкг/мл

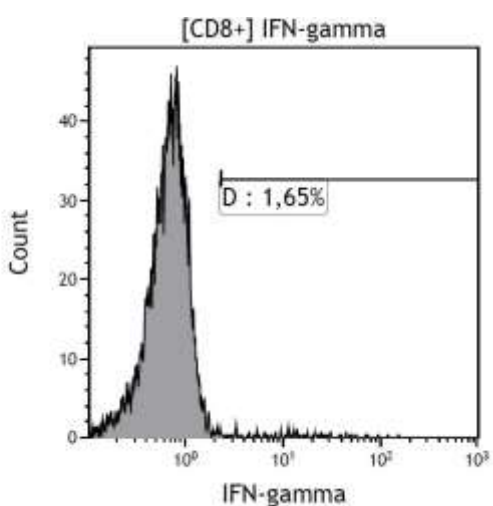
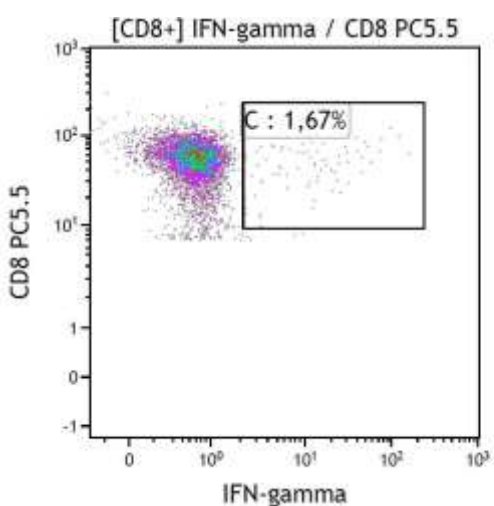


при
стимуляции
SEB

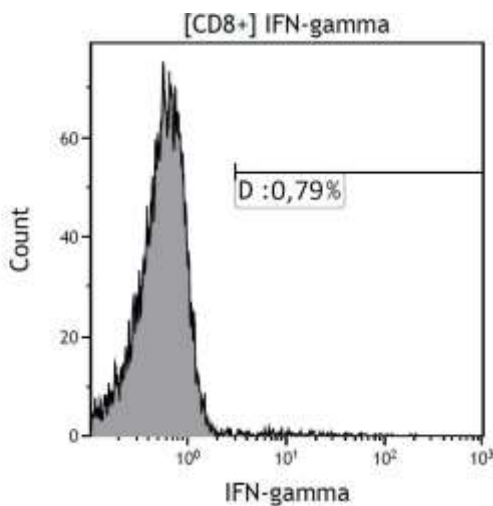
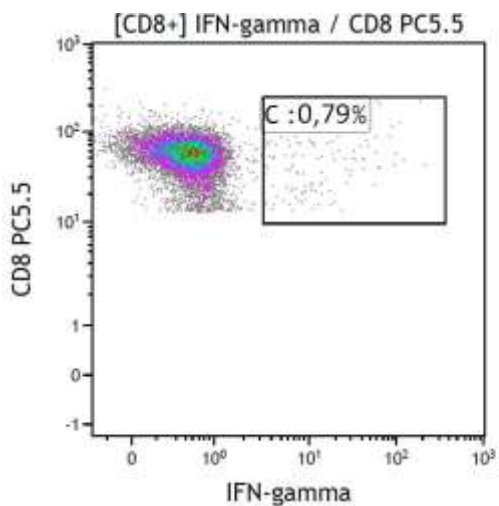
12.4.3. Группа БЦЖ, введенной по стандартной методике



при
отсутствии
стимуляции

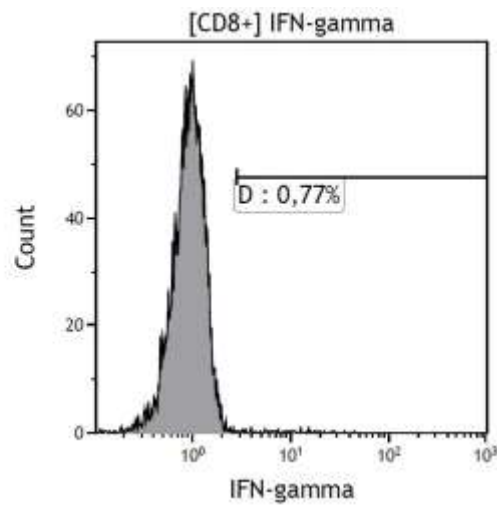
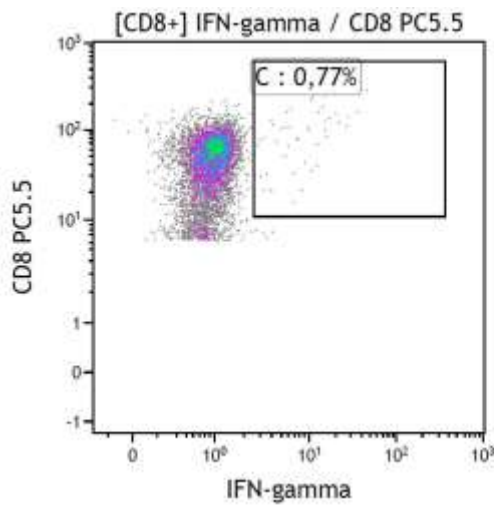


при
стимуляции
гибридным
белком в
концентрации
40 мкг/мл

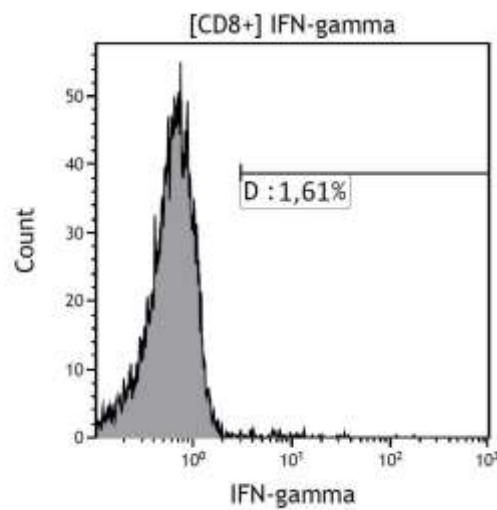
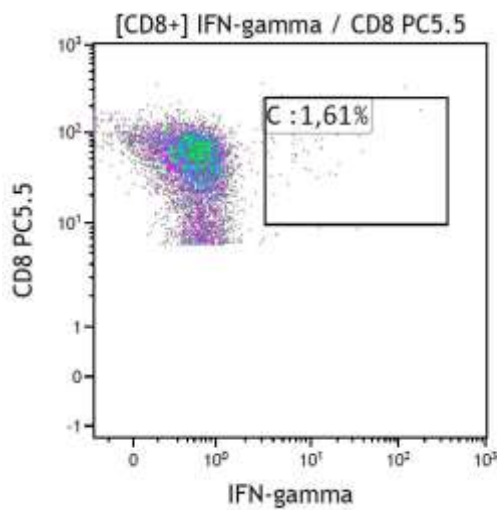


при
стимуляции
SEB

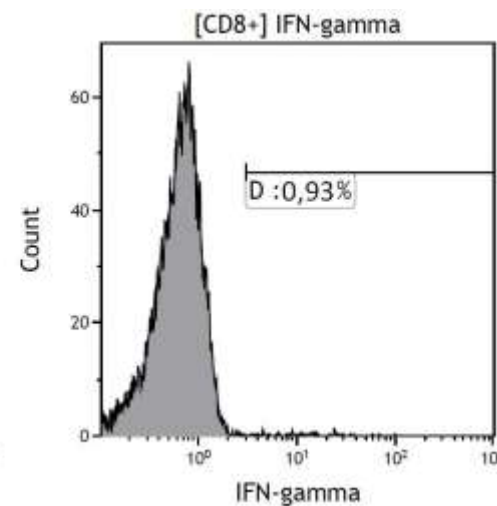
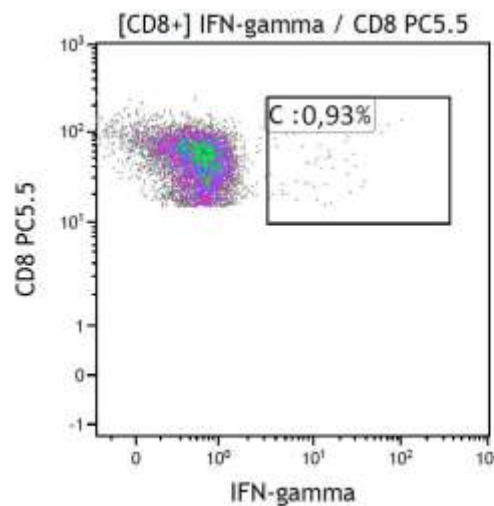
12.4.4. Группа «гибридный белок в/м»



при
отсутствии
стимуляции



при
стимуляции
гибридным
белком в
концентрации
40 мкг/мл



при
стимуляции
SEB