

Санкт-Петербургский Государственный университет  
Биологический факультет  
Кафедра генетики и биотехнологии

Русакович Георгий Игоревич

Конструирование прокариотических систем экспрессии генов, кодирующих  
протективные антигены *Mycobacterium tuberculosis*.

Выпускная квалификационная работа магистра

Научный руководитель:  
Доцент кафедры генетики и биотехнологии  
к.б.н. Москаленко С.Е.

Научный консультант:  
Заведующий отделом биотехнологии  
ФГБУ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева МЗ РФ  
к.б.н. Грудинин М. П.

Санкт-Петербург

2018

## Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ .....	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	8
2.1 Туберкулез как заболевание .....	8
2.2. Эпидемиология туберкулеза.....	10
2.3. Характеристика <i>M. tuberculosis</i> .....	11
2.4. Патогенез туберкулеза.....	12
2.5. Диагностика туберкулеза.....	14
2.6. Вакцина БЦЖ (BCG, Bacillus Calmette - Guerin).....	16
2.7. Стратегия разработки новых вакцин .....	18
2.8. Разработка новых вакцин .....	19
2.8.1. Вакцинные кандидаты на основе живых модифицированных штаммов <i>Mycobacterium bovis</i> .....	19
2.8.2. Вакцинные кандидаты на основе живых аттенуированных штаммов <i>M. tuberculosis</i> .....	20
2.8.3. ДНК-вакцины .....	21
2.8.4. Вакцинные кандидаты на основе рекомбинантных вирусных векторов .....	22
2.8.5. Вакцинные кандидаты на основе рекомбинантных белков .....	23
2.9. Антигены <i>M. tuberculosis</i> .....	25
2.9.1. ESAT-6.....	26
2.9.2. TB 10.4.....	27
2.9.3. Heat shock protein X (Hsp X) .....	28
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	29
2.1 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	29
2.2 Горизонтальный электрофорез ДНК. ....	30
2.3 Очистка ПЦР-продукта из амплификационной смеси.....	30
2.4 Реакция рестрикции ДНК. ....	30
2.5 Выделение ПЦР-фрагментов из агарозного геля. ....	30
2.6 Получение рекомбинантных плазмид.....	30
2.7 Среды. ....	30
2.8 Штаммы бактерий. ....	30
2.9 Получение электрокомпетентных клеток. ....	31
2.10 Трансформация бактериальных клеток.....	31
2.11 Культивирование трансформантов <i>E. coli</i> .....	31
2.12 Отбор клонов с рекомбинантной ДНК.....	31
2.13 Выделение плазмидной ДНК. ....	31
2.14 Секвенирование.....	32
2.15 Индукция экспрессии рекомбинантных генов.....	32
2.16 Электрофорез белков. ....	32
2.17 Выделение телец включения.....	32

2.18 Хроматографическая очистка и рефолдинг целевых белков.....	33
2.19 Вестерн-блоттинг белков.....	34
2.20 Подготовка спленоцитов мышей к анализу на проточном цитометре.....	34
2.21 Тактика «гейтирования».....	35
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....</b>	<b>37</b>
3.1 Конструирование рекомбинантных экспрессионных плазмид.....	37
3.2 Экспрессия рекомбинантных генов в клетках штамма <i>E. coli</i> Rosetta™ (DE3).....	42
3.3 Очистка гибридных белков GST-HspX, GST-ESAT-6, GST-TB10.4.....	46
3.4 Вестерн-блоттинг гибридных белков GST-TB10.4 и GST-HspX.....	48
3.5 Изучение антигенных свойств гибридных белков <i>in vitro</i> . Специфическое взаимодействие с антителами к <i>M.tuberculosis</i> .....	49
3.6. Использование гибридных белков в качестве специфических индукторов при проведении исследований клеточного иммунитета.....	54
<b>4. ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>58</b>
<b>5. ВЫВОДЫ.....</b>	<b>61</b>
<b>6. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>62</b>
<b>7. ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>70</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК – аминокислота;  
АТФ – аденозинтрифосфат;  
БЦЖ – BCG, *Bacillus Calmette-Guerin*;  
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;  
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;  
КОЕ – колонеобразующие единицы;  
ИФА - иммуноферментный анализ;  
ЛТИ – латентная туберкулезная инфекция;  
ЛФТ – латентная форма туберкулеза;  
Мкл – микролитр;  
МЛУ – множественная лекарственная устойчивость;  
МТК – микобактерии туберкулезного комплекса;  
Нг – нанограмм;  
НИИ – научно-исследовательский институт;  
ПЦР – полимеразная цепная реакция;  
Рис. – рисунок;  
РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов;  
См. – смотрите;  
СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита;  
США – Соединенные Штаты Америки;  
ТБ – туберкулез;  
ТКТ – туберкулиновый кожный тест, реакция Манту;  
ФБС – фетальная бычья сыворотка;  
ФГБУ – Федеральное государственное бюджетное учреждение;  
ФМСФ – фенилметилсульфонил фторид;  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусную кислота;  
ЮАР – Южно-Африканская Республика;

DEAE – диэтиламиноэтил;  
dNTPs – дезоксинуклеотид трифосфат;  
*E.* – *Escherichia*;  
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; иммуноферментный анализ (ИФА);  
EliSpot – лабораторный метод исследования иммунного ответа в организме человека и животных;  
IFN- $\gamma$  - Interferon-gamma, интерферон- $\gamma$ ;  
IGRA – Interferon-gamma release assay, интерферон- $\gamma$  тест (квантифероновый тест)  
IPTG – изопропил- $\beta$ -D-1-тиоигалактопиранозид;  
IL-2 – Interleukin-2, интерлейкин-2;  
*M.* – *Mycobacterium*;  
OD – оптическая плотность;  
PBS – натрий-фосфатный буфер;  
RPMI – Roswell Park Memorial Institute; Мемориальный институт Роуэлла Парка;  
RD – region of differences – область различий;  
SCID – тяжелый комбинированный иммунодефицит;  
SDS – додецилсульфонат натрия;  
TAE – трис-ацетатный буфер;  
Taq – *Thermus aquaticus*;  
TBS – трис-солевой буферный раствор;

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли.

# 1. ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез (ТБ) – одно из самых распространенных заболеваний в мире, которое вызывается некоторыми видами рода *Mycobacterium*. Самым распространенным патогеном, вызывающим туберкулез у человека является *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Чаще всего при туберкулезе поражаются легкие, а также могут быть поражены органы центральной нервной системы, лимфатической системы, системы кровообращения и мочеполовой системы (Orme, 2015).

По данным ВОЗ, ежегодно туберкулезом заболевают не менее 10,4 млн. человек и 1,3 млн. умирают от этой болезни (в том числе 374 000 смертей среди больных ВИЧ). Устойчивость микобактерий ко многим лекарственным препаратам является глобальной проблемой при борьбе с туберкулезом. Так, в 2016 году обнаружено около 600 000 случаев инфицирования людей микобактериями, устойчивыми к рифампицину (основной антибиотик, применяемый при лечении туберкулеза). В 490 000 случаев туберкулез был вызван микобактериями, устойчивыми к целому ряду лекарственных препаратов (микобактерии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ *M. tuberculosis*)). Почти половина (47%) из этих случаев приходится всего на 3 страны: Индия, Китай, Российская Федерация. Ежегодно на лечение и профилактику туберкулеза расходуется в мире около 2,3 млрд. долларов США (WHO, 2017).

На данный момент существует только одна вакцина, которая применяется для профилактики туберкулеза во всем мире - вакцина БЦЖ (BCG, Bacillus Calmette-Guerin), которая была получена в начале XX века на основе вирулентного штамма *Mycobacterium bovis*.

Следует отметить, что применение этой вакцины эффективно для защиты от инфицирования патогенными штаммами *M. tuberculosis* только для младенцев и детей младшего возраста, и не рекомендуется взрослым и пациентам пожилого возраста из-за ряда причин, например, таких как низкая эффективность вакцины против легочного туберкулеза для взрослых (Orme, 2010). Помимо этого, защитный эффект вакцины может полностью отсутствовать спустя 7 лет после вакцинации (Russell, Barry and Flynn, 2010).

В настоящее время предпринимаются различные подходы конструирования новых вакцин для вакцинопрофилактики, бустирования (усиление иммунного ответа за счет ревакцинации) и вакцинотерапии.

В ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России проводится работа по созданию вакцинных кандидатов для профилактики туберкулеза на основе гриппозных векторов,

несущих различные гены, кодирующие протективные (вызывающие защитный иммунный ответ) белки *M. tuberculosis*. По результатам доклинических исследований на моделях экспериментального туберкулеза, наибольшими протективными свойствами обладают гриппозные векторы, несущие гены, кодирующие белки ESAT-6, TB10.4 и HspX в различных сочетаниях. Известно, что вирусный вектор способен формировать стойкий антиген-специфичный CD8<sup>+</sup> Т-клеточный иммунный ответ за счет внутриклеточной экспрессии микобактериальных генов, а субъединичная вакцина способна вызывать CD4<sup>+</sup> Т-клеточный иммунный ответ. Последовательное применение двух типов вакцинных кандидатов в режиме «prime-boost» может индуцировать продолжительный защитный эффект против туберкулеза за счет стимуляции основных звеньев клеточного иммунитета.

Данная работа посвящена получению и характеристике белков *M. tuberculosis* с целью дальнейшего исследования их вакцинного потенциала *in vivo*, а также их использования для диагностики туберкулезной инфекции.

**Целью** настоящей работы является получение гибридных белков *M. tuberculosis* GST-ESAT-6, GST-TB10.4 и GST-HspX в бактериальной экспрессионной системе и характеристика их антигенных свойств.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Сконструировать экспрессионные плазмиды для наработки препарата белков *M. tuberculosis* GST-ESAT-6, GST-TB10.4 и GST-HspX.
2. Создать штаммы-продуценты гибридных белков GST-ESAT-6, GST-TB10.4 и GST-HspX *M. tuberculosis* на основе штамма *E. coli*.
3. Изучить антигенные свойства полученных гибридных белков.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Туберкулез как заболевание

Туберкулез – заболевание животных и человека, вызываемое некоторыми видами рода *Mycobacterium*. Известно более 40 видов рода *Mycobacterium*. Они широко распространены в окружающей среде, но только немногие из них способны вызывать у человека и животных заболевание, поэтому патогенные бактерии объединяют в кластер микобактерий туберкулезного комплекса (МТК). К нему относят: *M. tuberculosis* и *M. canetti*; *M. africanum*, который вызывает туберкулез у людей, проживающих в определенных регионах Африки; *M. bovis*, *M. pinnipedii* и *M. caprae*, вызывающие туберкулез у диких и одомашненных млекопитающих; *M. avium*, вызывающий туберкулез у птиц; *M. microti*, вызывающий туберкулез у полевок. Ведущая роль в патогенезе туберкулеза человека принадлежит *M. tuberculosis*, который был открыт в 1882 году Робертом Кохом, однако зарегистрированы случаи инфицирования человека *M. bovis*, *M. africanum* и *M. canetti*, которые могут вызывать туберкулез у человека.

Основным источником туберкулезной инфекции человека является бациллярный больной, который выделяет бактерии со слюной или мокротой. Заражение может происходить алиментарным путем посредством употребления продуктов животного происхождения. При инфицировании по этому пути могут быть поражены почки, кости и суставы, периферические лимфоузлы, а также мочеполовые органы, глаза и органы центральной нервной системы. Возможна передача через поврежденные покровы кожи, например, при доении больных коров. При аэрогенном заражении, туберкулез чаще возникает в органах дыхания – легких. Патогенными бактериями рода *Mycobacterium* может быть инфицирован любой орган, но заражение бактериями, вызывающими туберкулез, может быть недостаточным условием для развития заболевания, ведь у 90% людей, инфицированных *M. tuberculosis* так никогда и не возникает активных форм туберкулеза (Nagelkerke *et al.*, 2006). С точки зрения клинического здоровья пациенты с туберкулезом классифицируются как имеющие латентную туберкулезную инфекцию (ЛТИ). Это состояние характеризуется бессимптомностью и отсутствием передачи микобактерий другим людям. Кроме того, ЛТИ сложно диагностировать. Пациенты, имеющие туберкулез в активной фазе, являются источником инфекции, у таких больных туберкулез диагностируется с высокой точностью. Хотя *M. tuberculosis* – легочный патоген, он может поражать и другие органы. Таким образом, ТБ представляет собой



динамический спектр различных форм заболевания: от бессимптомной инфекции до опасного для жизни заболевания (Barry *et al.*, 2009; Esmail *et al.*, 2014).

Форма заболевания может зависеть от иммунитета хозяина и сопутствующих заболеваний. Инфекция *M. tuberculosis* может быть полностью элиминирована благодаря врожденному или приобретенному иммунитету. Лица, у которых произошла элиминация инфекции благодаря врожденному иммунитету или иммунному ответу без активации Т-клеток памяти, могут иметь отрицательный результат на туберкулиновый кожный тест (ТКТ, реакция Манту) или интерферон- $\gamma$  тест (квантифероновый тест, IGRA, Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) release assay). В организмах некоторых людей патоген элиминируется, но сохраняется иммунный ответ, за который отвечают Т-клетки памяти, у этих людей тесты ТКТ или IGRA будут положительными. Лечение таких пациентов с латентными формами туберкулеза (ЛФТ) неэффективно. Диагностика латентных форм туберкулеза возможна с помощью тестов ТКТ или IGRA. Существует профилактическая терапия больных с ЛТИ (в основном, 6-9 месяцев изониазида). Пациенты с ЛТИ могут не иметь выраженных симптомов, но будут иметь положительный результат культурального посева (как правило, отрицательный результат в исследовании микроскопии мазка из-за низкой бациллярной нагрузки). Пациенты с активным туберкулезом испытывают такие симптомы, как кашель, лихорадка и потеря веса, а диагноз подтверждается микроскопией и посевом мокроты или молекулярными тестами. Пациенты с активным заболеванием могут иногда быть отрицательными в тестах ТКТ или IGRA из-за аллергии, которая вызвана непосредственно туберкулезом или иммунной подавленностью, вызванной сопутствующими заболеваниями, такими как ВИЧ-инфекция, или недоеданием. Следует отметить, что независимо от стадии и формы заболевания туберкулезом для предотвращения активации инфекции все пациенты должны получить один из рекомендуемых курсов терапии.

Существует предположение, что заболевание начинает прогрессировать при нарушении функционирования иммунной системы. Возможной причиной может быть формирование дисфункций иммунной системы при сопутствующих вирусных инфекциях, например, ВИЧ (Hussain *et al.*, 2007).

## 2.2. Эпидемиология туберкулеза

Туберкулез является одной из основных причин тяжелых заболеваний и смертей не только в мире, но и в Российской Федерации. Несмотря на то, что по данным Роспотребнадзора ежегодно показатель общей заболеваемости туберкулезом снижается, он остается на высоком уровне (около 55 на 100000 населения). Увеличивается и число лиц с МЛУ *M. tuberculosis* и латентными формами туберкулеза.

Частота встречаемости активного туберкулеза у мужчин в два раза выше, чем у женщин (Dye, 2006), 10% активных форм туберкулеза приходится на детей (Swaminathan and Rekha, 2010).

Одним из основных известных факторов риска при ТБ является ВИЧ-инфекция (Navlir *et al.*, 2008). Среди ВИЧ-инфицированных инфекция ТБ встречается в 12% случаев, а 25% смертей больных ВИЧ/СПИД связывают с *M. tuberculosis*. Это принципиально важно, так как по скорости появления новых случаев ВИЧ-инфицированных людей Российская Федерация занимает третье место после ЮАР и Нигерии, а количество людей с этим диагнозом составляет от 800 тысяч до 1,5 млн. человек в России (Clark, 2016).

При инфицировании *M. tuberculosis* и своевременной диагностике данной инфекции, в 5-15% случаев требуется от месяца до нескольких лет для развития активной формы туберкулеза (Vyunnyky and Fine, 1997), в то время как в остальных 85-95% случаев риск развития активной формы туберкулеза сохраняется на протяжении всей жизни (Dowdy, Basu and Andrews, 2013).

Во многих случаях до 50% всех людей с подтвержденной активной формой заболевания не имеют продолжительного продуктивного кашля (мокрота), и, по меньшей мере, 25% не имеют никаких симптомов (Ноа *et al.*, 2010). Таким образом, переход от латентной к активной форме заболевания ТБ может быть клинически не выражен и не диагностирован своевременно, и люди с предполагаемой латентной формой ТБ уже способны заражать других людей (Dowdy, Basu and Andrews, 2013).

### 2.3. Характеристика *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* - это аэробные, не спорообразующие и неподвижные бациллы, которые характеризуются медленным ростом с периодом деления 12-24 часа. Главной особенностью этих бактерий является структура их клеточной стенки, которая представляет непреодолимый барьер для многих лекарственных препаратов и играет важную роль в вирулентности бактерии. *M. tuberculosis* обладает наружной мембраной, функционально подобной мембране грамотрицательных бактерий и имеющей ассиметричный билипидный слой. Внутренняя часть мембраны состоит из длинноцепочечных разветвленных жирных кислот (миколовых кислот) и из гликолипидов и воскообразных веществ в наружной части мембраны. Внешняя и внутренняя мембрана образуют периплазматическое пространство с присутствием тонкого слоя пептидогликана, который связывается ковалентно с арабиногалактаном и липоарабиноманнаном на внутренней стороне, которые в свою очередь связаны с миколовыми кислотами (Hoffmann *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008).

Одним из важнейших факторов вирулентности патогенных микобактерий являются системы секреции белков. Для *M. tuberculosis* описаны пять различных систем секреции (рис. 1) («Системы секреции типа VII» - T7SS), которые кодируются различными кластерами генов и называются ESX1 - ESX5. Для ESX1 и ESX5 выделяют различные белки, участвующие в вирулентности *M. tuberculosis*: ESX1 секретирует антигены, которые мешают целостности фагосомной мембраны, приводя к фагосомальному разрыву и попаданию бактерий в цитозоль. ESX5 присутствует только в медленно растущих микобактериях, таких как *M. tuberculosis* и *M. marinum*, и считается, что он участвует в секреции белков с иммуномодулирующими свойствами (PPE и PE-PGRS). ESX3 участвует в поглощении цинка и железа и гомеостазе. Роль ESX2 и ESX4 остается неизвестной.

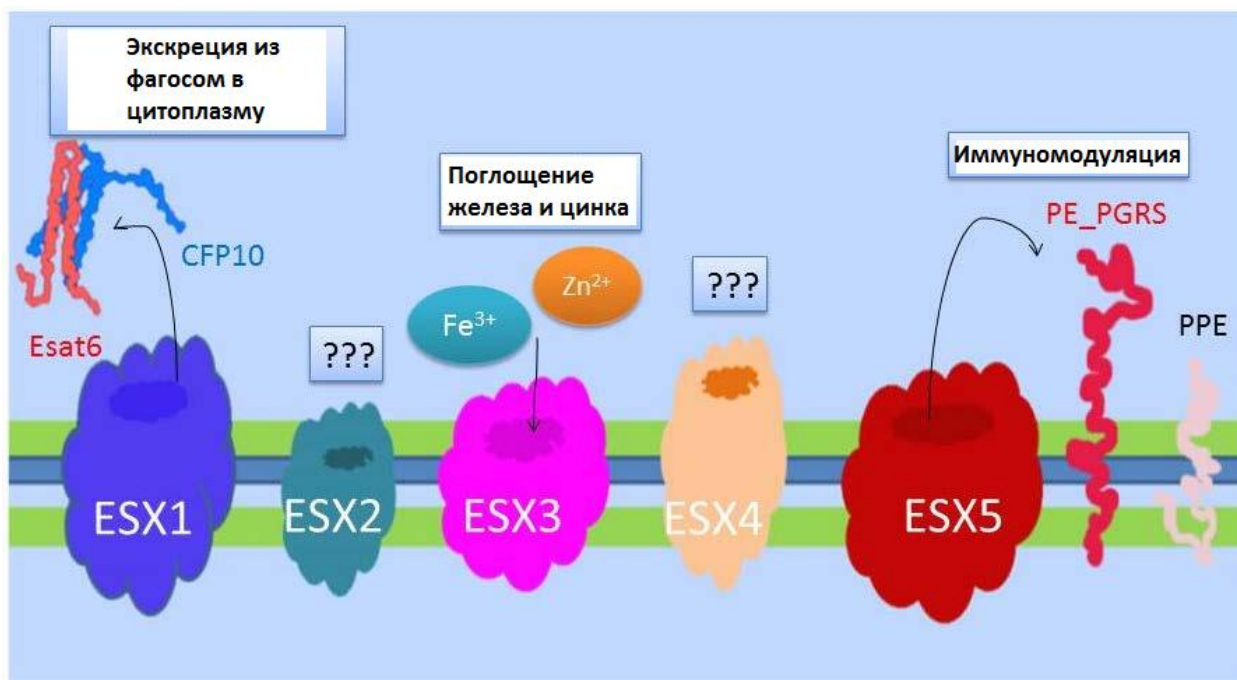


Рисунок 1. Системы секреции белка *M. tuberculosis* (Delogu, Sali and Fadda, 2013). См. описание в тексте.

## 2.4. Патогенез туберкулеза

Наше понимание ранней фазы развития туберкулеза у людей очень ограничено, но экспериментальные исследования на мелких млекопитающих (таких как мыши, морские свинки и кролики), а также приматах существенно помогли определить значимость ранних событий во время первичной инфекции (Orme, 2015). Проникновение *M. tuberculosis* осуществляется через дыхательные пути; после чего патоген попадает в нижние отделы дыхательных путей, где встречается с альвеолярными макрофагами, которые являются доминирующим типом клеток и борются с *M. tuberculosis*. Эти клетки захватывают бактерии с помощью рецептор-опосредованного фагоцитоза. Данный процесс давно изучался без учета микросреды, присутствующей в альвеоле. Сурфактант легких может сыграть важную роль в этом первоначальном взаимодействии хозяин-патоген (Watford *et al.*, 2001). Например, D-белок сурфактанта может предотвращать фагоцитоз *M. tuberculosis* альвеолярными макрофагами (Ferguson *et al.*, 1999; Russell, Barry and Flynn, 2010).

После попадания в клетку путем фагоцитоза *M. tuberculosis* активно блокирует слияние фагосом с лизосомой, обеспечивая свое выживание (Russell, 2011). Затем, благодаря активности системы секреции ESX-1, *M. tuberculosis* может нарушать фагосомную мембрану, вызывая высвобождение бактериальных продуктов, включая ДНК

микобактерий в цитозоль макрофагов, это может происходить на протяжении нескольких дней (Houben *et al.*, 2012; van der Wel *et al.*, 2007).

Способы доставки бактериальных продуктов в цитозоль являются активной областью исследований (Simeone *et al.*, 2016; Russell, 2016). Результатом попадания бактериальных продуктов в цитоплазму клетки является индукция IFN типа I ответа, который может способствовать росту внутриклеточных бактериальных патогенов, таких как *M. tuberculosis* (Manca *et al.*, 2001; Mayer-Barber *et al.*, 2014; Manzanillo *et al.*, 2012).

Кроме того, экспериментальные исследования показали, что тип гибели зараженных макрофагов (апоптоз или некроз) имеет решающее значение не только для врожденного ответа на инфекцию, но и для последующего адаптивного иммунного ответа (Kaufmann and Dorhoi, 2016; Schaible *et al.*, 2003; Behar, Divangahi and Remold, 2011).

После заражения альвеолярных макрофагов в дыхательных путях, *M. tuberculosis* получает доступ к другим клеткам легкого, где развивается инфекция. Однако, как именно *M. tuberculosis* проникает в паренхимальные клетки неизвестно. Существует два возможных механизма: 1) *M. tuberculosis* непосредственно инфицируют эпителиальные клетки, и 2) инфицированные *M. tuberculosis* макрофаги мигрируют в клетки эпителия. Независимо от механизма, *M. tuberculosis* инфицирует паренхимальные клетки, что за счет продукции цитокинов инфицированными клетками приводит к скоплению все большего числа клеток в месте заражения, вызывая ответную реакцию организма многоклеточного хозяина, что в свою очередь приводит к формированию так называемой гранулемы.

После установления первичной инфекции, когда-либо инфицированные дендритные клетки (Wolf *et al.*, 2008), либо воспалительные моноциты (Samstein *et al.*, 2013) переносят *M. tuberculosis* в легочные лимфатические узлы для презентации Т-клеткам. *M. tuberculosis* активно задерживает активацию Т-клеток в лимфатических узлах, в то же время происходит снижение количества Т-клеток в легких (Wolf *et al.*, 2008; Chackerian *et al.*, 2002).

ВИЧ-инфекция существенно снижает количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток и, следовательно, является фактором риска прогрессирования инфекции *M. tuberculosis* до активной формы туберкулеза. Тем не менее, в некоторых исследованиях показано, что риск заболевания активной формой туберкулеза усиливается на ранней стадии ВИЧ-инфекции, когда число CD4<sup>+</sup> Т-клеток нормальное, что свидетельствует о том, что другие, не зависящие от Т-клеток механизмы иммунной защиты, также нарушаются (Sonnenberg *et al.*, 2005).

Исследования экспериментальной модели туберкулеза у мышей с дефицитом PD-1 (мембранного белка надсемейства иммуноглобулинов, играющего роль в ингибировании Т и В-клеточного ответа) показали, что увеличение общего ответа CD4<sup>+</sup> Т-клеток привело к

снижению защиты и увеличению смертности животных в исследуемой группе (Lazar-Molnar *et al.*, 2010; Barber *et al.*, 2011).

Таким образом, понимание механизмов регулирования, связанных с иммунитетом к ТБ, имеет основополагающее значение для разработки новых способов терапии и новых подходов к вакцинации, которые бы препятствовали росту бактерий и развитию инфекции.

## 2.5. Диагностика туберкулеза

Для диагностики различных форм туберкулеза используются принципиально различные тест-системы. Для идентификации ЛТИ на данный момент доступно только два теста: ТКТ и IGRA. С помощью IGRA можно также дифференцировать положительные результаты, вызванные вакцинацией БЦЖ и патогенными *M. tuberculosis* (Pai, Claudia M. Denkinge, *et al.*, 2014).

ТКТ (реакция Манту) представляет собой внутрикожную инъекцию 5 туберкулиновых единиц (5 ТЕ) очищенного белка PPD или 2 ТЕ белка PPD RT23. У человека, у которого есть Т-клеточный иммунитет к этим антигенам, реакция гиперчувствительности замедленного типа произойдет через 48-72 часа. Наличие выраженной кожной реакции свидетельствует о наличии напряженного иммунитета к туберкулину. При интерпретации ТКТ в зависимости от размера уплотнения оценивают вероятность заражения *M. tuberculosis* и риск развития активной формы ТБ.

Хотя ТКТ имеет ряд преимуществ, особенно в условиях недостаточности ресурсов, включая низкие затраты на реагенты и оборудование, а также простоту использования, он имеет два основных ограничения. Во-первых, его результат может не иметь диагностического значения, если уже была проведена первичная/бустерная вакцинация БЦЖ, или организм человека был заражен непатогенными микобактериями (Farhat *et al.*, 2006). В случае вакцинации БЦЖ положительный результат показывает либо на сенсibilизацию от прививки, либо на попадание инфекции в организм. Уменьшение частоты ревакцинации приводит к уменьшению числа положительных проб Манту в 2 раза, а числа гиперергических (выраженных) - в 7 раз. Также у 60% больных туберкулезом подростков наблюдаются сомнительные пробы Манту (Бородулина Е., Амосова Е., Бородулин Б., 2010). Во-вторых, тест имеет ограниченное предсказательное значение (Pai, Claudia, Denkinge, *et al.*, 2014). У большинства индивидуумов с положительными результатами ТКТ ТБ не переходит в активную форму заболевания. В настоящее время разрабатываются или проверяются новые кожные тесты, в которых PPD будут заменены на более специфичные антигены (Pai and Sotgiu, 2016).

В начале 2000-х годов был введен квантифероновый тест IGRA, которым рассчитывали заменить ТКТ (Pai, Riley and Colford, 2004). Данный тест основан на определении INF- $\gamma$  (гамма-интерферона), высвобождаемого сенсibilизированными Т-клетками, стимулированными *in vitro* специфическими протеинами (ESAT-6, CFP-10, TB7.7 (p4)) микобактерий туберкулеза, входящих в комплекс *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. microti*, *M. africanum* и др.). Эти протеины отсутствуют в вакцинных штаммах *M. bovis* БЦЖ и в большинстве нетуберкулезных микобактерий, за исключением *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* (Pai, Claudia M Denkinge, *et al.*, 2014; Pai and Sotgiu, 2016). Для теста снижена чувствительность при диагностике пациентов с ослабленным иммунитетом.

Ни один из существующих в настоящее время тестов не может точно различить ЛТИ и активную форму туберкулеза (Pai, Claudia M. Denkinge, *et al.*, 2014, Sester *et al.*, 2011). Кроме того, современные тесты не способны дифференцировать реактивацию инфекции от повторного заражения (Pai, Claudia M., Denkinge, *et al.*, 2014). Таким образом, ни один из доступных в настоящее время тестов не отвечает требованиям высокопрогностического теста, который может помочь выявить лиц, подверженных повышенному риску развития активной формы ТБ. Примечательно, что, поскольку все тесты ЛТИ имеют низкую прогностическую ценность, широко распространенный скрининг групп с низким уровнем риска является контрпродуктивным. Североамериканские программы гигиены труда являются примером, в котором повторное применение теста IGRA у работников здравоохранения показало высокую частоту изменений результатов теста, что вызвало обеспокоенность по поводу воспроизводимости теста (Pai, Claudia M. Denkinge, *et al.*, 2014). Таким образом, скрининг ЛТИ должен выполняться только в том случае, если он используется для контроля терапии и при положительном результате в других тестах.

Для выявления активной формы туберкулеза используются четыре основных технологии: методы визуализации (рентгенография грудной клетки и позитронно-эмиссионная компьютерная томография), микроскопия мазков мокроты, культуральные методы и молекулярные тесты.

Рентгенография грудной клетки является общепринятым тестом для выявления туберкулезной инфекции. Применение цифровой радиологии и компьютерного диагностического программного обеспечения позволяют значительно улучшить и оптимизировать диагностику ТБ (Pande *et al.*, 2015). Поскольку рентгеновские лучи не обладают специфичностью, необходимо подтверждать аномальные рентгенограммы грудной клетки с помощью микробиологических тестов. Расширенные методы

визуализации дают новое представление о разнообразии поражений легких. Однако они сравнительно дороги и не рекомендуются для рутинного использования (Esmail *et al.*, 2017).

Несмотря на то, что микроскопия мазка мокроты имеет множество ограничений, она по-прежнему является наиболее широко используемым тестом для выявления активной формы туберкулеза в странах с низким и средним уровнем доходов (Kik *et al.*, 2014). Из-за высокой точности по сравнению с микроскопией мазка мокроты (Boehme and Nabeta, 2010; Boehme *et al.*, 2011; Steingart *et al.*, 2013; Detjen *et al.*, 2015), ВОЗ в настоящее время рекомендует Xpert MTB / RIF (диагностический тест, основанный на амплификации нуклеиновых кислот *M. tuberculosis* методом ПЦР) в качестве диагностического теста первой линии у всех взрослых или детей, подозреваемых на наличие активной формы заболевания (WHO, 2013). Следует отметить, что у ВИЧ-инфицированных больных с помощью метода микроскопии мазка мокроты возможно обнаружить активную форму ТБ только в 22-43% случаев (Getahun *et al.*, 2007). Таким образом, ВОЗ настоятельно рекомендует применение диагностического теста Xpert MTB / RIF для таких пациентов (WHO, 2013).

Дети с активной формой туберкулеза часто имеют неспецифические симптомы, поэтому следует учитывать историю контакта с взрослым с активной формой заболевания. Для диагностики туберкулеза у детей в настоящее время не существует адекватного теста. Микроскопия мазка мокроты у детей часто отрицательна из-за низкого количества бактерий в мазке. Таким образом, алгоритм диагностики ТБ у детей основывается на признаках, симптомах, свидетельствах инфекции *M. tuberculosis* (положительный ТКТ или IGRA), истории контакта с людьми, больными активной формой ТБ, результатах рентгенографии грудной клетки и молекулярных тестах (Xpert MTB / RIF).

Все описанные выше причины свидетельствуют о том, что необходимо как совершенствовать диагностические тесты, созданные в прошлом, так и разрабатывать новые подходы в диагностике различных форм ТБ.

## **2.6. Вакцина БЦЖ (BCG, Bacillus Calmette - Guerin).**

В настоящее время для предупреждения туберкулеза используется вакцина БЦЖ, которая представляет собой живой аттенуированный штамм *M. bovis*, сохраняющий большую часть иммуногенных свойств. С 1948 по 1995 год БЦЖ были вакцинированы около 3 млрд. человек. В результате вакцинации была подтверждена высокая эффективность защиты от заболевания милиарной формой туберкулеза (гематогенная,



генерализованная форма туберкулеза, характеризующаяся равномерным густым высыпанием мелких туберкулезных бугорков в тканях разных органов) и туберкулезным менингитом в детском возрасте (Surekha Rani *et al.*, 2005).

Вакцина БЦЖ обеспечивает высокую степень защиты от легочной формы болезни, которая сама по себе является основным бременем глобального туберкулеза и является важной причиной заболеваемости и смертности. Кроме того, ревакцинация БЦЖ в подростковом возрасте у населения, уже вакцинированного при рождении, не улучшает защитную эффективность, как показано в крупном рандомизированном контролируемом исследовании в Бразилии (Pandey *et al.*, 2009; Behr *et al.*, 1999).

БЦЖ в настоящее время применяется для вакцинации новорожденных и взрослых в группах высокого риска в рамках расширенной программы иммунизации ВОЗ (McShane, 2009).

Вакцинация БЦЖ защищает новорожденных и детей от серьезных форм первичного заболевания, таких как менингеальный и распространенный легочный туберкулез, и спасает жизни 40 000 - 70 000 детей в год. Она также предотвращает массовое лимфогематогенное распространение болезни.

Однако при применении БЦЖ может наблюдаться полное отсутствие защитного эффекта против легочного туберкулеза у взрослых. Помимо этого, БЦЖ, являясь живой вакциной, способна вызвать осложнения и отрицательные эффекты, например, при вакцинации детей, инфицированных ВИЧ. Проводились эпидемиологические исследования, которые подтвердили различия в эффективности вакцины БЦЖ в разных популяциях, проживающих в различных географических регионах. Эффективность вакцинации может варьировать от 0% в тропических регионах до 80% в северных (McMurray, 2003). Согласно гипотезе «маскирования», вакцинация БЦЖ не способна существенно изменить иммунный ответ организма, сенсibilизированного микобактериями окружающей среды. Другая гипотеза (гипотеза «блокирования») заключается в том, что сформировавшийся под влиянием микобактерий окружающей среды иммунитет ограничивает персистенцию вакцинного штамма БЦЖ в организме привитого, препятствуя формированию полноценной противотуберкулезной защиты (Brandt *et al.*, 2002). Этим объясняется хороший защитный эффект вакцины БЦЖ у новорожденных и его отсутствие у взрослых лиц, которые потенциально могли контактировать с микобактериями.

Помимо этого, в отношении БЦЖ существуют противопоказания. Вакцина БЦЖ не назначается лицам с ослабленным иммунитетом, симптоматической ВИЧ-инфекцией, известным или подозреваемым врожденным иммунодефицитом, лейкемией, лимфомой

или генерализованным злокачественным заболеванием. БЦЖ также противопоказана пациентам, принимающим иммунодепрессивные препараты (например, кортикостероиды, алкилирующие агенты, антиметаболиты или проходящих курс лучевой терапии), а также ее не следует делать при беременности (McShane, 2009).

Ревакцинация БЦЖ у подростков не улучшает ни длительность защитного эффекта, ни его силу (Corbett and De Cock, 2010). Кроме того, аттенуированный штамм *M. bovis* в БЦЖ не содержит в своем составе ряда важнейших антигенов. Поэтому в настоящее время существует необходимость разработки вакцин нового поколения для более эффективной борьбы с туберкулезом и, в первую очередь, с его легочной формой (Sierra, 2006). Необходимо учитывать, что треть населения планеты инфицирована микобактериями, при этом многие из ныне живущих людей были вакцинированы БЦЖ. В связи с вышеперечисленными фактами новая вакцина должна формировать высокий постинфекционный иммунитет.

Вакцины являются эффективным инструментом защиты людей от инфекционных заболеваний. Создание вакцин, которые обеспечили бы защиту подростков и взрослых от туберкулеза, явилось бы продвижением в решении этой проблемы. Будущая вакцина должна быть безопасной и обеспечивать развитие иммунитета к туберкулезу у детей, подростков и взрослых, в том числе и людей, инфицированных ВИЧ.

## **2.7. Стратегия разработки новых вакцин**

Для обеспечения эффективной защиты против *M. tuberculosis* путем вакцинации необходимо активировать соответствующее звено иммунной системы. *M. tuberculosis* является внутриклеточной бактерией и преимущественно остается внутри макрофагов. Таким образом, гуморальный иммунитет вряд ли может играть важную роль в защите от *M. tuberculosis*, а клеточный иммунный ответ является наиболее существенным (McShane, 2009), особенно CD4<sup>+</sup> Т-клеток класса II (McShane *et al.*, 2005). Повышенная восприимчивость к туберкулезной инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов свидетельствует о важности CD4<sup>+</sup> Т-клеток класса II в иммунном ответе на *M. tuberculosis*, CD8<sup>+</sup> Т-клетки класса I также играют важную роль, вероятно, в развитии латентной формы заболевания, однако точный механизм действия этих клеток не установлен. Интерферон гамма (IFN- $\gamma$ ), секретируемый как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клетками, может играть роль в индукции активации инфицированных макрофагов и увеличивать экспрессию белков МНС класса I и II на антигенпрезентирующих клетках. Было показано значительное повышение восприимчивости к *M. tuberculosis* у мышей с дефектом гена, кодирующего IFN- $\gamma$  (McShane *et al.*, 2005). Лечение таких мышей экзогенным

рекомбинантным IFN- $\gamma$  задерживало развитие инфекции ТБ. Мутация в гене IFN- $\gamma$ -рецептора 1 делает человека более восприимчивым к тяжелым атипичным микобактериальным инфекциям (McShane, 2009) и, возможно, к часто встречающимся формам ТБ. Поэтому в отношении имеющейся в настоящее время информации идеальная вакцина против туберкулеза должна стремиться индуцировать как Т-клетки с CD4+, так и CD8+ (Corbett and De Cock, 2018).

## **2.8. Разработка новых вакцин**

При разработке новых вакцин уровень антител всегда использовался в качестве показателя эффективности вакцины. Однако в последние 10-15 лет были разработаны новые вакцины, которые могут индуцировать Т-клетки с или даже без антител, например, белок/адъювант (вещество, усиливающие специфический иммунный ответ при вакцинировании), ДНК-вакцины и рекомбинантные вирусные вектора. Тем не менее, существует несколько ограничений в индуцировании как сильных CD4+, так и CD8 + Т-клеточных ответов. Комбинации белок/адъювант способны индуцировать высокие уровни CD4+ Т-клеток и антител, но в настоящее время нет адъювантов, эффективных для индуцирования значительных CD8+ Т-клеточных ответов. У мышей ДНК-вакцины были очень эффективными, но у людей и приматов на ДНК-вакцины наблюдались только слабые ответы. С другой стороны, рекомбинантные вирусные векторы очень хороши при индуцировании CD4+ и CD8+ Т-клеток, а также способны индуцировать выработку антител. Тем не менее, на практике, ни одна из описанных видов вакцин не приводит к выработке высоких уровней антиген-специфических Т-клеток обеих популяций при использовании таких моновакцин.

Использование нескольких из этих вакцин совместно привело к разработке гетерологических стратегий иммунизации, чтобы вызвать более высокий уровень клеточно-опосредованного иммунного ответа. В гетерологических стратегиях иммунизации «prime-boost» используются две разные вакцины, каждая из которых содержит один и тот же антиген и вводится с промежутком в несколько недель.

### **2.8.1. Вакцинные кандидаты на основе живых модифицированных штаммов *Mycobacterium bovis***

Имеются модифицированные штаммы *M. bovis*, продуцирующие дополнительные белки. Введение в БЦЖ отсутствующих участков генома, ответственных за экспрессию группы генов RD-1, кодирующих белки, которые обладают высокими иммуногенными

свойствами, позволило бы теоретически увеличить защитный эффект вакцины. По этому принципу была сконструирована вакцина VPM1002 на основе рекомбинантного штамма БЦЖ, продуцирующего N-концевой домен белка 85B и листериолизин O - фактор вирулентности от *Listeria monocytogenes*, который опосредует перфорирование фагосомной мембраны, что обеспечивает выход рекомбинантных антигенов БЦЖ в цитозоль, и тем самым облегчает их захват и презентацию CD8+ Т-клеткам (Kaufmann *et al.*, 2014; Grode *et al.*, 2005). По результатам клинического исследования фазы IIa данная вакцина показала высокий защитный эффект по сравнению с каноническим штаммом БЦЖ (Gengenbacher *et al.*, 2016).

Основным недостатком данного типа вакцин является их небезопасность, то есть существует возможность восстановления вирулентности модифицированного в сторону «дикого типа» вакцинного штамма. Вакцина VPM 1002 защищала мышей от *M. tuberculosis* значительно лучше, чем БЦЖ (Velmurugan *et al.*, 2013). Введение вакцины мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) в дозах, превышающих целевую человеческую дозу, показало, что профиль безопасности VPM 1002 неотличим от БЦЖ и плацебо (солевой буферный раствор). Доклиническое исследование на модели новорожденных кроликов продемонстрировано, что вакцинный кандидат VPM 1002 не обнаруживался в органах и тканях на протяжении 90 дней после вакцинации. Два клинических исследования фазы I показали, хорошую переносимость и иммуногенные свойства VPM 1002. Исследование фазы 2 у ВИЧ-неинфицированных новорожденных, не привитых БЦЖ, продемонстрировало безопасность VPM 1002, сравнимую с безопасностью БЦЖ (Kaufmann *et al.*, 2014). Двойное слепое контролируемое рандомизированное исследование фазы 2 по оценке безопасности и иммуногенности VPM 1002 по сравнению с БЦЖ в настоящее время продолжается на 416 добровольцах.

### **2.8.2. Вакцинные кандидаты на основе живых аттенуированных штаммов *M. tuberculosis***

Предпринимаются попытки создания невирулентного штамма *M. tuberculosis*, который мог бы заменить используемый в настоящее время штамм *M. bovis* БЦЖ. Аттенуированный штамм *M. tuberculosis* будет обладать значительным преимуществом, так как его антигенный состав будет близок к патогену «дикого типа», что поможет обеспечить более специфический и эффективный иммунный ответ. Кроме того, появится возможность использования его для повторной иммунизации людей, которые ранее были

привиты БЦЖ. Такие вакцинные кандидаты конструируются генно-инженерными методами. Для этого в геноме микобактерии удаляются участки, ответственные за вирулентность или за возможность использования определенного питательного субстрата. В результате получают аттенуированные штаммы, зависящие от метаболитов, которые в организме человека не встречаются. Для повышения безопасности таких штаммов производят удаление или укорочение генов, что приводит к ауксотрофности. Однако, все живые вакцины потенциально небезопасны для ВИЧ-инфицированных или людей с подавленным иммунитетом.

MTBVAC - первая живая аттенуированная вакцина на основе *M. tuberculosis*. Это рекомбинантный штамм *M. tuberculosis*, в котором отсутствуют гены *phoP*, кодирующие ключевой фактор транскрипции для регуляции вирулентности, и *fadD26*, необходимый для синтеза сложного липидного фтиоцераола димикоцерозата, основного микобактериального фактора вирулентности. Сравнение генома штамма БЦЖ с клиническими изолятами *M. tuberculosis* показывает, что у БЦЖ отсутствуют некоторые основные антигены. MTBVAC содержит все гены, присутствующие в вакцине БЦЖ, а также гены, утерянные *M. bovis* при культивировании, и поэтому предоставляет иммунной системе хозяина более широкий набор микобактериальных антигенов, чем БЦЖ. MTBVAC продемонстрировала безопасность, сравнимую с БЦЖ у мышей, и значительно большую защитную эффективность, измеряемую снижением КОЕ (колонеобразующих единиц) как в легких, так и в селезенке, до интраназального заражения вирулентным *M. tuberculosis* (Arbues *et al.*, 2013). Кандидатная вакцина разрабатывается для замены БЦЖ. При этом остается неизвестным, сможет ли данная вакцина защитить от туберкулеза людей, которые при рождении были вакцинированы БЦЖ.

### 2.8.3. ДНК-вакцины

ДНК-вакцины используются для внутриклеточной экспрессии генов. Такие вакцины способны вызывать сильный иммунный ответ. ДНК-вакцина — это генно-инженерная конструкция, которая состоит из плазмиды, несущей один или нескольких генов, кодирующих белки патогена. Процесс вакцинации ДНК-вакцинами называется генетической иммунизацией. Его преимущество состоит в том, что вакцина способна вызывать не только гуморальный иммунный ответ, но и клеточный, что ранее было возможно только при использовании живых вакцин. Сами плазмиды не иммуногенны в

отличие от вирусных векторов, которые могут обладать высокой иммуногенностью, с чем связано развитие побочных эффектов. Комбинированные ДНК-вакцины могут усиливать эффект вакцинации при использовании нескольких антигенов. Хорошим примером, связанным с туберкулезом, является вакцина HG856A, которая содержит в себе 2 копии гена ESAT-6 и 1 копию гена Ag85a (Moliva, Turner and Torrelles, 2016). Вакцина продемонстрировала высокий специфический иммунный ответ, при этом мощные гуморальные иммунные ответы, а также терапевтические эффекты, вызванные этой ДНК-вакциной, наблюдались ранее у мышей, инфицированных *M. tuberculosis*. Повторная иммунизация HG856A дает умеренную защиту от заражения *M. tuberculosis* и значительно повышает иммунную защиту, обеспечиваемую вакцинацией БЦЖ. Авторы статьи предлагают использовать эту вакцину в качестве бустерной после вакцинации БЦЖ. К недостаткам ДНК-вакцин относятся: необходимость многократного введения, а также использование вспомогательных веществ для целевой доставки вакцины в клетки. Важно отметить, что ДНК-вакцины способны проникать внутрь клеток у мышей лучше, чем у приматов и человека.

#### **2.8.4. Вакцинные кандидаты на основе рекомбинантных вирусных векторов**

Одним из способов, позволяющих повысить иммуногенность микобактериальных антигенов без применения адъювантов, является использование аттенуированных вирусов в качестве вектора для доставки генов и их экспрессии в организме. На основе аттенуированных вирусов (аденовирус, вирус гриппа) разрабатываются вирусные векторы, которые несут микобактериальные гены.

MVA85A представляет собой вакцину с вирусными векторами на основе модифицированного вируса коровьей оспы Анкара, используемой в качестве вектора для антигена Ag85A *M. tuberculosis*. Доклинические исследования вакцинированных БЦЖ мышей, морских свинок и крупного рогатого скота продемонстрировали значительное улучшение эффективности в некоторых, но не во всех исследованиях. У мышей вакцинация БЦЖ и MVA85A вызывала значительно более высокие уровни защиты и снижение бактериальной нагрузки после заражения *M. tuberculosis*, чем только БЦЖ. Длительность защиты от развития туберкулеза оставалась на прежнем уровне, как и при иммунизации только БЦЖ (Goonetilleke *et al.*, 2003).

Вакцина TB/Flu-04L является живым аттенуированным вирусом гриппа А, содержащим антигены *M. tuberculosis* ESAT-6 и Ag85A. Доклинические исследования, включая исследования на нечеловекообразных обезьянах, продемонстрировали, что вакцина является безопасной и иммуногенной и обеспечивает большую защитную эффективность, чем БЦЖ на модели морских свинок после интраназального введения (Stukova *et al.*, 2015). Основным условием применения вакцинных препаратов на основе аттенуированных вирусных векторов является их безопасность. А при введении и проникновении вируса в организм должен поддерживаться постоянный уровень экспрессии генов вставки, что обеспечит эффективное формирование иммунитета.

Доклинические исследования рекомбинантных гриппозных векторов, экспрессирующих ген, кодирующий белок ESAT-6 слитый с N-концом укороченного белка NS1 (FLU/ESAT-6), продемонстрировали высокий уровень протективной активности, по ряду показателей превышающий защитное действие вакцины БЦЖ (Sereinig *et al.*, 2006). Применение вирусных агентов в тканях, через которые проникает *M. tuberculosis*, повышает вероятность формирования стойкого иммунного ответа. Поэтому в случае вакцинации против туберкулеза интраназальное введение препарата является более эффективным по сравнению с введением его с помощью инъекций, ведь легочные формы туберкулеза передаются аэрогенным способом. В связи с этим, вакцинные кандидаты на основе респираторных вирусов являются более перспективными для дальнейших исследований.

### **2.8.5. Вакцинные кандидаты на основе рекомбинантных белков**

Эффективность разработки субъединичных вакцин определяется выбором специфических антигенов, обладающих протективными свойствами. Важным достоинством субъединичных вакцин является их безопасность, так как вакцина содержит только конкретные антигены, но не содержит вирусных или бактериальных агентов. Соблюдение правил очистки белков от липополисахаридов и ДНК-продукта, обеспечивает безопасность вакцины и простоту тестирования ее иммуногенности. При создании субъединичных вакцин важную роль играет выбор не только специфического антигена, но и адьюванта, без которого антигены могут оказаться неиммуногенны. Механизмы их действия могут сильно отличаться, поэтому их подбор осуществляется в зависимости от необходимого иммунного ответа (гуморальный, клеточный или мукозальный), а также способа введения вакцины (Vogel, 2000).

На данный момент существует не менее 5-ти вакцинных кандидатов на основе белков, в том числе рекомбинантных, в состав которых может входить несколько антигенов (обычно два или три).

H1: IC31 и H1: CAF01 является рекомбинантным слитым белком антигена Ag85B и ранней секреторной антигенной мишени 6 (ESAT-6), с использованием адьюванта IC31 в комбинации с иммуномодулирующим антибактериальным пептидом (KLKL) и синтетическим олиго-дезоксинуклеотидного агониста Толл-подобного рецептора 9 (van Dissel *et al.*, 2010). Защитный эффект после вакцинации H1: CAF01 (с использованием двухкомпонентного липосомального адьюванта CAF01) наблюдался в течении трех лет у взрослых добровольцах, которые не были вакцинированы БЦЖ (van Dissel *et al.*, 2014), при этом в клинических испытаниях фазы 1 при вакцинации H1: IC31 ответ наблюдался в течение 2,5 лет.

H56: IC31 представляет собой слитый белок, состоящий из Ag85B, ESAT-6 и Rv2660c, характерных для ранней инфекции и латентной формы ТБ, и адьювант IC31. Высокие уровни защиты после вакцинации H56: IC31 были продемонстрированы на моделях мышей как до, так и после контакта с патогеном по сравнению с БЦЖ (Aagaard *et al.*, 2011). H56: IC31, введенный в качестве бустирования БЦЖ, продемонстрировал задержку и снижение клинических симптомов туберкулеза у обезьян, зараженных *M. tuberculosis*, также предотвращая реактивацию латентной инфекции по сравнению с БЦЖ (Lin *et al.*, 2012).

H4: IC31 представляет собой рекомбинантный слитый белок Ag85B и TB10.4, применяемый с адьювантом IC31. В доклинических исследованиях на животных вакцина хорошо переносилась, вызывала выраженный иммунный ответ и значительно уменьшала бактериальную нагрузку в легких при заражении мышей *M. tuberculosis* по сравнению с невакцинированными мышами и мышами, в которых вакцинные антигены вводились по отдельности. В этих исследованиях уровень защиты от вакцины был аналогичен уровню, наблюдаемому у мышей, вакцинированных БЦЖ (Dietrich *et al.*, 2005).

ID93+ GLA-SE представляет собой рекомбинантный слитый белок, содержащий четыре антигена *M. tuberculosis* (Rv2608, Rv3619, Rv3620 и Rv1813) с GLA-SE (глюкопиранозил-липид-адьювант-стабильное масло на основе водной эмульсии сквалена), действующим как Toll-подобный рецептор 4. В модели с «prime-boost» на иммунизированных морских свинках была продемонстрирована более высокая защитная эффективность ID93 + GLA-SE у животных, привитых БЦЖ, которые затем были инфицированы *M. tuberculosis*, по сравнению с животными, вакцинированными только БЦЖ. Мыши, иммунизированные



вакциной ID93 + GLA-SE, показали антиген-специфические иммунные ответы типа Th1 и при заражении *M. tuberculosis* показали значительно более низкую бактериальную нагрузку в легких и / или селезенке по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор или только один антиген или адъювант (Bertholet *et al.*, 2010).

M72 представляет собой слитый белок, состоящий из двух антигенов *M. tuberculosis*, M72A и M72B и адъюванта AS01E. AS01E является адъювантом на основе липосом, содержащим MPL (очищенное нетоксичное производное эндотоксина), которое оказывает сильное иммуностимулирующее действие, как на клеточный, так и на гуморальный иммунный ответ (Garçon, Chomez and Van Mechelen, 2007) и QS21 (естественную молекулу сапонина), которая стимулирует клеточно-опосредованный иммунитет клеток Th1 и цитотоксическую активность лимфоцитов (Campbell and Peerbaye, 1992). Увеличенная продукция IFN- $\gamma$  и антител на оба антигена была продемонстрирована в модели заражения мышей, а также увеличение защитного эффекта после заражения *M. tuberculosis* по сравнению с мышами, привитыми с физиологическим раствором или только адъювантом. Морские свинки, иммунизированные M72, имели длительную выживаемость (> 1 год) после заражения интраназально *M. tuberculosis* по сравнению с теми, которые получали физиологический раствор или только адъювант, а выживаемость была аналогична выживанию особей, получивших только БЦЖ (Skeiky *et al.*, 2004).

Несмотря на потенциальную безопасность вакцин на основе рекомбинантных белков, у них есть существенный недостаток — низкая способность индуцировать или полное отсутствие индукции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Для создания вакцинных кандидатов, а также разработки стратегий вакцинации необходимо учитывать все особенности патогенеза *M. tuberculosis* и особенности организма человека по сравнению с животными моделями, на которых проводят доклинические испытания вакцинных кандидатов.

## **2.9. Антигены *M. tuberculosis***

Аннотирование генома *M. tuberculosis* выявило 3995 открытых рамок считывания, у 52% из них обнаруживается функциональная активность (Camus *et al.*, 2002). Анализ протеома выявил около 1800 структурных белков и 800 секретируемых. Перспективным считается поиск секреторных белков, что связано с их способностью экскретироваться из клеток и становиться доступными клеткам иммунной системы, при этом к ним формируется стойкий иммунитет. Идентификация секреторных белков в качестве антигенов представляет собой непростую задачу, так как полные данные о спектре всех

секретируемых белков *M. tuberculosis* отсутствуют. При этом известно, что их количественный и качественный состав может сильно варьировать в зависимости от реакции организма на патоген (Singh *et al.*, 2005).

### 2.9.1. ESAT-6

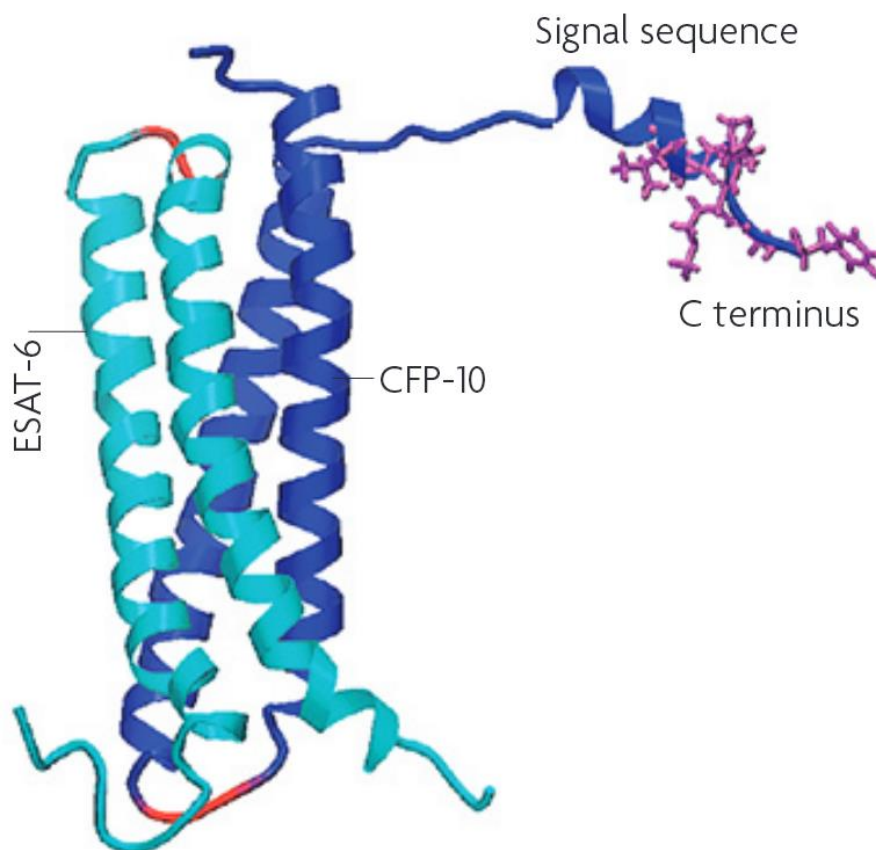
ESAT-6 – белок *M. tuberculosis*, относящийся к белкам ранней секреции (Early secreted antigen target). Он состоит из 95 аминокислотных остатков и кодируется геном *esxA*. Входит в условную группу генов RD-1 (RD–region of differences – область различий), которая в процессе длительного культивирования вакцинного штамма БЦЖ была утрачена (Mahairas *et al.*, 1996).

Существует предположение, что после проникновения в организм хозяина *M. tuberculosis* устанавливает скрытую инфекцию путем ингибирования созревания фагосом. Переход от латентной к активной форме туберкулеза происходит через разрыв фагосомальных мембран и попадания патогена в цитозоль. Именно способность ингибирования созревания фагосом была частично приписана ESAT-6 (van der Wel *et al.*, 2007).

Белки, относящиеся к данной группе, играют очень важную роль в формировании иммунитета и представляют значительный интерес с точки зрения их использования для создания новых вакцинных препаратов, так как отсутствуют в вакцинном штамме.

ESAT-6 обладает высокой иммуногенностью и на ранних этапах инфекции распознается иммунной системой, способствуя при этом пролиферации лимфоцитов, выделяющих интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ) – ключевой фактор иммунитета (Niemann, Cole and Brosch, 2002).

*M. tuberculosis* секретирует ESAT-6 совместно с белком CFP-10. Эти белки функционируют в составе гетеродимера (рис. 2).



**Рисунок 2. Пространственная структура гетеродимера ESAT-6/CFP-10**  
(Renshaw *et al.*, 2005).

Нокаут гена *esxA*, кодирующего белок ESAT-6, приводит к ослаблению вирулентности, в то время как добавление гена *esxA* в БЦЖ частично восстанавливает вирулентность аттенуированного штамма (Ma, Keil and Sun, 2015).

### 2.9.2. ТВ 10.4

ТВ 10.4 – это антиген *M. tuberculosis*, имеющий молекулярную массу 10 kDa и состоящий из 96 АК, который кодируется геном *esxH* длиной 291 п.о. Он также относится к семейству ранних секреторных белков (Early secreted antigen target), которые присутствуют только в штаммах микобактериального комплекса. Конкретные функции этого белка неизвестны, но он имеет важное значение для вирулентности *M. tuberculosis*. ТВ10.4 является одним из наиболее перспективных антигенных кандидатов для разработки вакцин против туберкулеза, так как способен стимулировать сильный Т-клеточный ответ (Hoang *et al.*, 2009).

ТВ10.4 белок является мишенью для антимикобактериальных иммунных реакций у людей (Skj t *et al.*, 2002; Skj t *et al.*, 2000). Действительно, ТВ 10.4 распознается иммунной системой вакцинированных БЦЖ людей, а также примерно у 70% пациентов с ТБ, и вызывает у этих людей высокие уровни продукции IFN-  (Skj t *et al.*, 2002).

### **2.9.3. Heat shock protein X (Hsp X)**

Семейство малых белков теплового шока Asp представляет собой АТР-независимые шапероны. Hsp X или белок теплового шока – это антиген *M. tuberculosis*, входящий в это семейство и имеющий молекулярную массу 16 kDa и состоящий из 144 АК. Он кодируется геном *hspX* длиной 435 п.о. HspX - стресс-белок, функции которого индуцируются при экстремальном понижении концентрации кислорода. Он играет роль в поддержании долгосрочной жизнеспособности при латентных, бессимптомных инфекциях и предлагаемой роли в репликации во время первичной инфекции. Предполагается, что шапероноподобный HspX является важным элементом управления в *M. tuberculosis*, поскольку избыточная экспрессия гена *hspX* ингибирует рост патогена (Yuan, Crane and Barry, 1996). Также HspX содержит домен  -кристаллина и, как и все  -кристаллины, функционирует как независимый от АТФ молекулярный шаперон, предотвращая неправильное складывание и разворачивание других белков внутри клетки. При этом этот антиген способен стимулировать CD4 + и CD8 + Т-клетки и индуцирует экспрессию TNF- , IL-2 и IFN-  (Taylor *et al.*, 2012).

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ПЦР проводили в реакционной смеси общим объемом 50 мкл следующего состава: 10 мкл 5xGreenbuffer (Диаэм, Россия), 1 мкл dNTPs, 1 мкл Taq-полимеразы, по 2 мкл прямого праймера (10 пМ/мл) и обратного праймера (10 пМ/мл), 1 мкл матрицы с концентрацией 10 нг/мкл, 33 мкл деионизованной воды. ПЦР проводили на приборе Bio-Rad CFX96.

В качестве матриц для синтеза целевых генов использовали плазмиды для сборки рекомбинантных вирусов гриппа pHW-НК-NS124-E85A (ген *esxA*), pHW-PR8-NSwt-HspX (ген *hspX*) и pHW-PR8-TB (ген *esxH*), предоставленные лабораторией векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А Смородинцева» Минздрава России.

Аmplификацию нуклеотидной последовательности генов *esxA*, *hspX* и *esxH* проводили с использованием оптимизированного температурного профиля (табл. 1) и праймеров (табл. 2), подбор которых осуществляли с помощью программы PrimerPremier 5.0 (PREMIER Biosoft, США).

**Таблица 1.**  
**Температурный профиль амплификации генов *esxA*, *hspX* и *esxH*.**

№	Фаза	Количество циклов	Температура, °C	Время, с
1	денатурация ДНК матрицы	1	95	120
2	денатурация ДНК матрицы	35	95	30
	отжиг праймеров		55	30
	синтез ДНК		72	60
3	завершение синтеза фрагментов	1	72	60

**Таблица 2.**  
**Праймеры, использованные для амплификации генов *esxA*, *esxH* и *hspX*.**

Праймеры	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')	Гены
ESAT-6-F ESAT-6-R	5'- <u>AAAgAATTCATgACAgAgCAgCAgTggAATTTTC</u> -3' 5'- <u>AAACTCgAgTTACCAATTTgCTgCCTCTgCTg</u> -3'	<i>esxA</i>
TB10.4-F TB10.4-R	5'- <u>AAAgAATTCATgTCACAAATgTATAATTACCCAgCA</u> -3' 5'- <u>AAACTCgAgTTACCAATTTgCTgCCTCTgCTg</u> -3'	<i>esxH</i>
HspX-F HspX-R	5'- <u>AAAgAATTCATggCCACCACACTgCC</u> -3' 5'- <u>AAACTCgAgTTAgTTggTgCTTCTgATCTggATgTg</u> -3'	<i>hspX</i>

## **2.2 Горизонтальный электрофорез ДНК.**

Электрофоретический анализ плазмидной ДНК проводили в 0.7 – 0.8% агарозе на 1x TAE буфере, содержащем бромистый этидий в концентрации 100 мкг/л. В качестве ДНК маркера для определения размера фрагментов ДНК использовали маркер Generuller 1kb plus (Invitrogen, США). Результаты электрофореза (ЭФ) визуализировали на ChemiDoc (Bio-Rad, США).

## **2.3 Очистка ПЦР-продукта из амплификационной смеси.**

Очистка амплифицированных нуклеотидных последовательностей из ПЦР смеси осуществлялось на колонках Centri-Sep (Princeton Separations, США) согласно инструкции производителя.

## **2.4 Реакция рестрикции ДНК.**

Рестрикцию вектора pGEX-4T-1 и ПЦР-фрагментов проводили согласно инструкции производителя ферментов (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

## **2.5 Выделение ПЦР-фрагментов из агарозного геля.**

Выделение ПЦР-фрагментов из агарозного геля проводили с использованием DEAE-бумаги ВУ-81 «Wattman» согласно ранее описанному протоколу (Dretzen et al. 1981)

## **2.6 Получение рекомбинантных плазмид.**

Для получения рекомбинантных плазмид амплифицированные последовательности целевых генов и вектор pGEX-4T-1 сначала обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EcoRI и XhoI. Лигирование проводили с помощью T4 лигазы согласно инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific Inc., США)

## **2.7 Среды.**

Для культивирования клеток *E. coli* использовали жидкую и агаризованную среду LB (Bertani 1951) с добавлением ампициллина до конечной концентрации 200 мкг/мл.

Для индукции синтеза целевых белков использовали автоиндукционную среду ZYM 5052 (Studier 2005) и 2xYT с последующим добавлением IPTG (Healthcare and Sciences 1994).

## **2.8 Штаммы бактерий.**

В ходе исследовательской работы использовали штамм-реципиент *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, США) с генотипом: F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) *phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1*.

В качестве штамма-реципиента для синтеза целевых белков использовали *E. coli* Rosetta™(DE3) (Invitrogen, США) с генотипом: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>).

## **2.9 Получение электрокомпетентных клеток.**

Для получения электрокомпетентных клеток штаммов *E. coli* DH5α и *E. coli* Rosetta™(DE3) и последующей их трансформации методом электропорации, клетки переводили в деионизованную воду и замораживали. Приготовление электрокомпетентных клеток осуществляли согласно протоколу (Miller and Nickoloff 1995). Готовые к электропорации клетки хранили при -70°C. Для этого вместо глицерина добавляли DMSO до конечной концентрации в растворе 7% (Inoue *et al.* 1990).

## **2.10 Трансформация бактериальных клеток.**

Клетки трансформировали методом электропорации (Inoue *et al.* 1990).

## **2.11 Культивирование трансформантов *E. coli*.**

Клетки *E. coli* DH5α трансформированные рекомбинантными плазмидами культивировали на агаризованной питательной среде LB в присутствии ампициллина (200 мкг/мл) 8 часов при температуре 37°C.

## **2.12 Отбор клонов с рекомбинантной ДНК.**

Отбор трансформированных клеток проводили с помощью ПЦР с колоний. Для этого фрагмент бактериальной колонии переносили с помощью стерилизованной деревянной зубочистки в пробирку с 15 мкл реакционной ПЦР смеси, содержащей специфичную для целевого гена пару праймеров. Зубочисткой с остатками бактерий наносили штрих на чистую чашку Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Чашки инкубировали ночь в термостате при температуре +37°C. ПЦР реакцию проводили по оптимизированной ранее программе (см. таблицу 1). Результат ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 100 мг/л.

## **2.13 Выделение плазмидной ДНК.**

Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса (Hofsteenge *et al.* 1991)

## 2.14 Секвенирование.

Секвенирование плазмидных конструкций проводили по Сэнгеру (Sanger & Coulson, 1975) с помощью коммерческого набора Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя, с использованием полимера ABI PRISM 3130 POP-7.

## 2.15 Индукция экспрессии рекомбинантных генов.

Индукцию экспрессии рекомбинантных генов штаммов-продуцентов *E. coli* Rosetta™(DE3) проводили на двух жидких питательных средах в нескольких вариантах:

- 1) В автоиндукционной среде ZYM 5052, в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) и хлорамфеникола (25 мкг/мл) 8 часов при температуре 37°C и скорости перемешивания 200 об/мин.
- 2) В автоиндукционной среде ZYM 5052, в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) и хлорамфеникола (25 мкг/мл) 14 часов при температуре 20°C и скорости перемешивания 200 об/мин.
- 3) В среде 2xYT в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) и хлорамфеникола (25 мкг/мл) до достижения  $OD_{600}=0,6$  после чего добавляли IPTG до концентрации 0,5 mM и культивировали пробы при температуре 20°C скорости перемешивания 200 об/мин.
- 4) В среде 2xYT в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) и хлорамфеникола (25 мкг/мл) до достижения  $OD_{600}=0,6$  после чего добавляли IPTG до концентрации 0,1 mM и культивировали пробы при температуре: 20°C, скорости перемешивания 200 об/мин.

## 2.16 Электрофорез белков.

Электрофорез белков проводили в 15% полиакриламидном геле по методу Лэммли (Laemmli, 1970).

## 2.17 Выделение телец включения.

Выделения телец включения проводили согласно протоколу Palmer and Wingfield (2004) с модификациями.

Клетки размораживали, ресуспендировали в лизирующем буфере (50 mM трис-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 1 mM фенилметилсульфонил фторид (ФМСФ), 5 mM  $\beta$ -меркаптоэтанол) из расчета 2 мл буфера на 1 г биомассы. Далее, клетки разрушали, подвергая суспензию клеток обработке ультразвуком при помощи дезинтегратора MSE



Soniprep 150 (5 циклов по 30 секунд озвучивания и 2 минуты охлаждения на ледяной бане). Полученные лизаты клеток центрифугировали в течение 1 часа с ускорением 15000 g при +4°C на центрифуге Eppendorf 5801R, затем супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в лизирующем буфере из расчета 1 мл буфера на 1 г осадка. Затем центрифугировали в течение 1 часа с ускорением 15000 g при температуре +10°C. Супернатант удаляли, а полученные осадки, содержащие тельца включения целевых гибридных белков хранили при -20°C.

## **2.18 Хроматографическая очистка и рефолдинг целевых белков.**

Хроматографическую очистку рекомбинантных белков осуществляли на колонках GSTrap HP согласно стандартному протоколу производителя (GE Healthcare, США), а их последующий рефолдинг по протоколу Chelating (1999) с модификациями, описанными ниже.

Тельца включения растворяли в денатурирующем буфере (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 M мочевины, 2 mM ЭДТА, 1 mM ФМСФ, 0,05% дитиотреитола) из расчета 5 мл буфера на 1 г телец включения. Раствор инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 часа, далее центрифугировали с ускорением 15000 g при температуре +10°C в течение 1 часа. Супернатант отбирали, фильтровали через шприцевой фильтр-насадку (производство Millipore, размер пор 0.45 мкм, материал мембраны – полиэфирсульфон).

Рефолдинг белка проводили методом разбавления. Раствор телец включения приливали к предварительно охлажденному буферу для рефолдинга (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM ЭДТА, 1 mM ФМСФ) до конечной концентрации белка 0.1 мг/мл и инкубировали на магнитной мешалке в течение 24 часов при температуре +4°C. Далее, раствор центрифугировали в течение 1 часа с ускорением 15000 g при +4°C, супернатант отбирали.

Хроматографическую очистку проводили методом аффинной хроматографии на иммобилизованном глутатионе. Хроматографическую колонку GSTrap HP (GE Healthcare, США) объемом 5 мл уравнивали 25 мл стартового буфера (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM ЭДТА, 1 mM ФМСФ) на скорости потока 5 мл/мин. Далее, вносили раствор рефолдированного белка на скорости потока 2 мл/мин, после чего промывали колонку 50 мл стартового буфера на скорости потока 2 мл/мин. Целевой белок элюировали буфером для элюции (100 mM трис-HCl, 20 mM восстановленный глутатион, pH 7.80) на скорости потока 2 мл/мин. Мониторинг элюции

вели по оптической плотности на длине волны 280 нм, отбирая фракции объемом 1 мл при помощи автоматического коллектора.

## 2.19 Вестерн-блоттинг белков

Электрофорез белков проводили в 10% полиакриламидном геле в присутствии SDS. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли с использованием 10xTBS буфера (1920 mM глицин (ДИА-М), 250 mM (НОСН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>СNH<sub>2</sub> Трисаминометан (UltraPureGrade, Helicon), 10% SDS (Helicon, Россия)) с добавлением 20% этанола. Активирование мембраны происходило при погружении на 5 сек. в 96% спирт. Перенос на мембрану проводили в течении 1,5 часа при 250 мА на холоде, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (Burnette 1981). После переноса белков мембрану инкубировали в течение ночи в буфере PBS (БиолоТ, Россия) содержащем 3% BSA (Amresco, США). Затем мембрану отмывали раствором 1xPBS с добавлением Tween (Ferak Berlin, Германия) до конечной концентрации 0,1%. Все антитела разводили согласно рекомендации фирмы-производителя. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными мышинными антителами к целевым белкам в течении часа. Далее мембрану три раза промывали в 1xPBS с добавлением 0,1% Tween и 3% BSA по 10 минут. Инкубировали со вторичными антителами в течение часа. Промывали 4 раза по 10 минут раствором 1xPBS с добавлением Tween до 0,1%. Детекцию осуществляли с использованием готового раствора субстрата Opti-4CN (Bio-Rad #170-8235, США).

В качестве первичных антител были использованы мышинные моноклональные антитела фирмы Abcam #ab361292 к белку TB 10.4 (#ab361292, разведение 1:5000), и к белку HspX (#ab64768, разведение 1:500). В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена козы антитела к IgG мыши (Invitrogen #G21040) в разведении 1:2000.

## 2.20 Подготовка спленоцитов мышей к анализу на проточном цитометре.

Селезенки мышей, инфицированных *M. tuberculosis*, гомогенизировали при помощи пластиковых гомогенизаторов для пробирок (Eppendorf, Германия) в клеточной среде 1 x RPMI 1640 с L-глутамином (Invitrogen, США). Гомогенаты фильтровали через 70-мкм фильтры в 15-мл пробирки, содержащие 10 мл 2% фетальная бычья сыворотка (ФБС) в натрий-фосфатный буфер (PBS). Дальнейшие действия проводили согласно протоколу, представленному в статье (Сергеева *et al.*, 2017) со следующими модификациями:

стимуляцию клеток проводили путем добавления в клеточную суспензию раствора гибридных белков GST-ESAT-6, GST-HSP, GST-TB10.4 до конечной концентрации 5 мкг/мл, а также костимулирующих антител к рецептору CD28 (Biolegend, США) в объеме 1 мкл (общий объем стимулятора – 10 мкл). В контрольные лунки вносили равный объем среды 1 x RPMI 1640, содержащей антитела к CD28. Планшеты инкубировали в течение 18 часов при 37°C, после чего во все лунки добавляли по 100 мкл брэфельдина А (BD, США) для ингибирования клеточного транспорта. Клетки инкубировали в течение 6 часов при 37°C. После инкубации клетки переносили в планшеты с V-образным дном и центрифугировали 10 мин при 500 g и 4°C, осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS. Дальнейшие процедуры, связанные с окраской поверхностных маркеров и внутриклеточных цитокинов, выполняли при помощи набора Fixation and Permeabilization Solution (BD, США) в соответствии с инструкциями производителя. Пробы анализировали на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter, США). Полученные данные обрабатывали с помощью программы Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

### 2.21 Тактика «гейтирования».

Панель флуорохром-конъюгированных антител была составлена с использованием данных описанных в статье (Won and Park 2009). Для анализа продукции цитокинов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами селезенки мышей использовали следующую панель флуорохром-конъюгированных антител:

Таблица 3.

Панель флуорохром-конъюгированных антител.

Маркер	Флуорохром	Объем антител
CD4	PerCp/Cy5.5	0.25 мкл /10 <sup>6</sup> кл
CD8	PC7	0.25 мкл /10 <sup>6</sup> кл
IFN $\gamma$	FITC	0.25 мкл /10 <sup>6</sup> кл
TNF $\alpha$	BV421	0.25 мкл /10 <sup>6</sup> кл
IL-2	PE	0.25 мкл /10 <sup>6</sup> кл
Live/Dead	Zombie Aqua	1.5 мкл /10 <sup>6</sup> кл

### 2.22 Пробоподготовка и иммуноферментный анализ.

Иммуноферментный анализ проводили с сыворотками крови людей, которые предварительно отделили центрифугированием при 2000g в течении 10 минут после инкубации цельной крови при комнатной температуре в течении 20 минут.

Методика постановки иммуноферментного анализа соответствовала описанной в документации (ELISA technical guide and protocols; ThermoScientific) при этом были внесены ряд изменений:

Иммуноферментный анализ проводили на планшетах Greiner#655080 Medium Binding (Greiner Bio-one, США). 100 мкл раствора белка в PBS-буфере (300 нг белка) наносили в лунки планшета и инкубировали в течение ночи при +4°C.

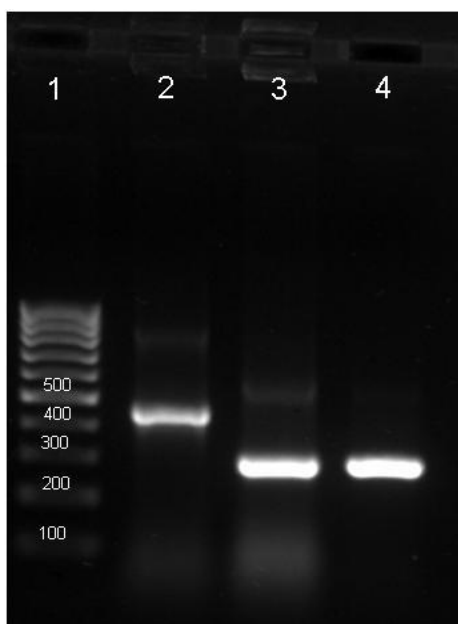
Для блокирования неспецифических сайтов связывания в лунки добавляли блокирующий буфер: 1xPBS с добавлением 0,1% Tween20 и 5% BSA (Biowest, Франция). Затем в лунки планшета добавляли сыворотку по 100 мкл в разных разведениях в блокирующем буфере (1:10, 1:40, 1:160, 1:640), инкубировали 1 час при температуре 22°C. Для детекции связавшихся человеческих антител в лунки добавляли конъюгат мышинных антител против человеческих (HRP\_Mouse-AntiHuman IgG#054220, Invitrogen, США) в разведении 1:500. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали готовый раствор ТМВ (DAKO #S1599). Для остановки реакции в лунки добавляли по 100 мкл 2N раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Измерение оптической плотности проводили на мультисканере BioTek Synergy H1 (BioTek, США) при длине волны 450нм.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1 Конструирование рекомбинантных экспрессионных плазмид.

Для экспрессии генов *esxA*, *esxH* и *hspX* *M. tuberculosis*, кодирующих протективные микобактериальные антигены ESAT-6, TB10.4 и HspX были сконструированы три рекомбинантные плазмиды. Амплификацию генов *esxA*, *esxH* и *hspX* *M. tuberculosis* осуществляли методом ПЦР с рекомбинантных плазмид: рНВ-НК-NS124-E85A, которая содержала ген *esxA*, рНВ-PR8-NSwt-HspX, содержащей ген *hspX* и рНВ-PR8-TB, содержащей ген *esxH*. Для этого использовали праймеры, на 5'-конце которых находятся сайты, узнаваемые эндонуклеазами рестрикции, необходимые для клонирования амплифицированных последовательностей в вектор рGEX-4Т-1: EcoRI (для прямых праймеров) и XhoI (для обратных праймеров) (см. Материалы и методы).

Результаты амплификации генов *esxA*, *esxH* и *hspX* посредством ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле (рис.3).

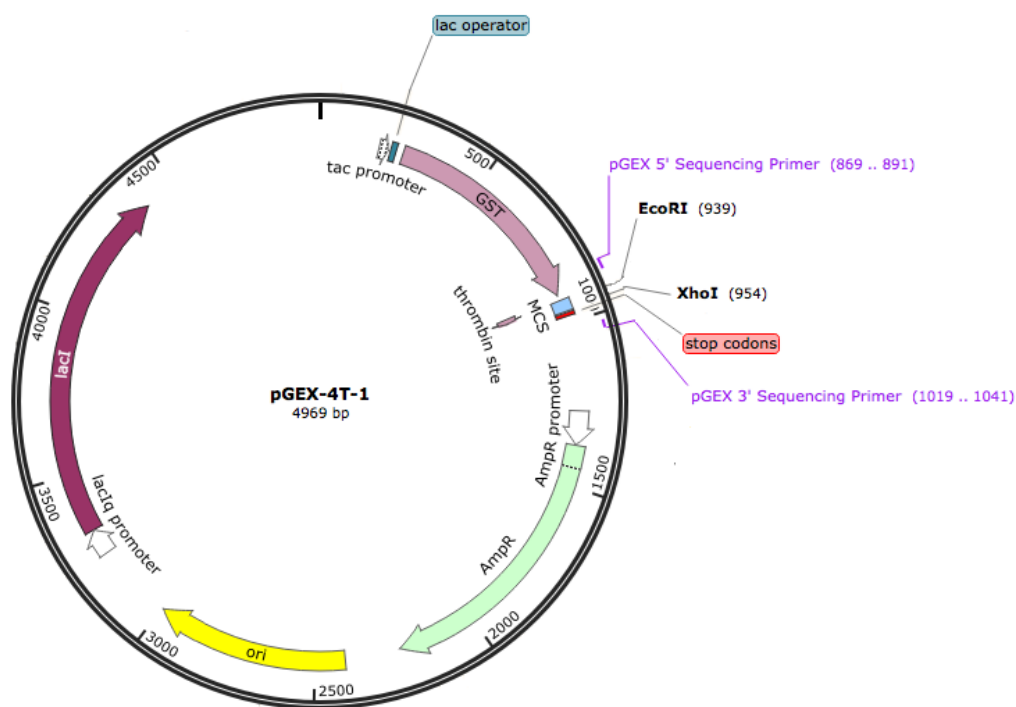


**Рисунок 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР.**

Дорожки: 1 – маркер (Gene ruler 1kb plus), 2- амплифицированная последовательность гена *hspX* (расчетный размер 453 bp), 3- амплифицированная последовательность гена *esxA* (расчетный размер 306 bp), 4- амплифицированная последовательность гена *esxH* (расчетный размер 309 bp).

Для клонирования генов *M. tuberculosis* был выбран экспрессионный вектор рGEX-4Т-1 (рис. 4). Вектор рGEX-4Т-1 (4969 bp) имеет MCS (multicloning site), содержащий сайты рестрикции для ряда эндонуклеаз рестрикции, тас-промотор, позволяющий индуцировать экспрессию генов, GST-тэг (глутатион-S-трансферазный тэг), позволяющий маркировать белки для их очистки методом аффинной хроматографии. Кроме того, глутатион-S-трансфераза по данным литературы увеличивает растворимость белкового

продукта, что также является преимуществом в использовании выбранного вектора (Harper & Speicher, 2011).



**Рисунок 4. Карта плазмиды pGEX-4T-1.**

EcoRI, XhoI – эндонуклеазы рестрикции, использованные в работе; pGEX 5' Seq.pr. и pGEX 3' Seq.pr – схематичное изображение сайтов посадки праймеров для секвенирования; Lac operator – лактозный оператор; tac promoter – промотор; GST – глутатион-S-трансфераза (GST-тэт); Trombone site –расположение сайта протеолиза тромбином; MCS - multicloning site, lacIq promoter – промотор лактозного оперона, lacI – лактозный репрессор AmpR promoter – ампициллиновый промотор; AmpR – ген β-лактомазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину; ori – точка начала репликации.

После обработки эндонуклеазами рестрикции EcoRI и XhoI амплифицированных последовательностей и вектора pGEX-4T-1 была проведена реакция лигирования. Полученной лигазной смесью были трансформированы компетентные клетки *E. coli*. Трансформантов отбирали согласно процедуре (см. Материалы и методы). Область вставки полученных рекомбинантных плазмид была секвенирована для подтверждения отсутствия нуклеотидных замен. Секвенирование провели с использованием праймеров для секвенирования, указанных в руководстве к данному вектору (GST\_gene\_fusion\_system\_handbook, GE). Локализация сайтов посадки праймеров схематично представлены на рис. 4. По результатам секвенирования были построены выравнивания секвенированных нуклеотидных последовательностей целевых генов с нуклеотидными последовательностями генов, использованных при амплификации (рис.5).

**A**

		1	50
» Seq_ESAT-6	(2)	ATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTTTCGCTGGAATAGAAGCAGCAGCAAGCGC	
» GST_ESAT-6	(2)	ATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTTTCGCTGGAATAGAAGCAGCAGCAAGCGC	
		51	100
» Seq_ESAT-6	(52)	AATCCAGGGAAACGTGACATCAATTCATAGCCTGCTGGACGAGGGAAAGC	
» GST_ESAT-6	(52)	AATCCAGGGAAACGTGACATCAATTCATAGCCTGCTGGACGAGGGAAAGC	
		101	150
» Seq_ESAT-6	(102)	AGTCACTTACAAAACCTTGCAGCAGCATGGGGAGGATCAGGATCAGAGGCA	
» GST_ESAT-6	(102)	AGTCACTTACAAAACCTTGCAGCAGCATGGGGAGGATCAGGATCAGAGGCA	
		151	200
» Seq_ESAT-6	(152)	TATCAAGGGGTGCAACAGAAATGGGATGCAACAGCAACAGAGCTGAACAA	
» GST_ESAT-6	(152)	TATCAAGGGGTGCAACAGAAATGGGATGCAACAGCAACAGAGCTGAACAA	
		201	250
» Seq_ESAT-6	(202)	CGCACTGCAGAACCTGGCAAGAACAATATCAGAGGCAGGACAGGCAATGG	
» GST_ESAT-6	(202)	CGCACTGCAGAACCTGGCAAGAACAATATCAGAGGCAGGACAGGCAATGG	
		251	291
» Seq_ESAT-6	(252)	CAAGCACAGAGGGAAATGTGACTGGAATGTTTCGCACTCGAG	
» GST_ESAT-6	(252)	CAAGCACAGAGGGAAATGTGACTGGAATGTTTCGCACTCGAG	

Seq\_ESAT-6 – нуклеотидная последовательность гена *esxA* *M. tuberculosis*, содержащаяся в плазмиде pHW-НК-NS124-E85A.

GST\_ESAT-6 – секвенированная нуклеотидная последовательность гена *esxA* *M. tuberculosis*, клонированная в вектор pGEX-4T-1;

**Б**

		1	50
» Seq_HspX	(2)	ATGGCCACCACACTGCCCGTGCAGAGACACCCCAGAAGCCTGTTCCCCGA	
» GST_HspX	(2)	ATGGCCACCACACTGCCCGTGCAGAGACACCCCAGAAGCCTGTTCCCCGA	
		51	100
» Seq_HspX	(52)	G TTCAGCGAGCTGTTTCGCCGCCTTCCCTAGCTTTGCCGGCCTGAGGCCTA	
» GST_HspX	(52)	G TTCAGCGAGCTGTTTCGCCGCCTTCCCTAGCTTTGCCGGCCTGAGGCCTA	
		101	150
» Seq_HspX	(102)	CCTTCGACACCCGGCTGATGCGGCTGGAAGATGAGATGAAGGAAGGCAGA	
» GST_HspX	(102)	CCTTCGACACCCGGCTGATGCGGCTGGAAGATGAGATGAAGGAAGGCAGA	
		151	200
» Seq_HspX	(152)	TACGAAGTGCGGGCCGAGCTGCCTGGCGTGGACCCTGATAAAGGACGTGGA	
» GST_HspX	(152)	TACGAAGTGCGGGCCGAGCTGCCTGGCGTGGACCCTGATAAAGGACGTGGA	
		201	250
» Seq_HspX	(202)	CATCATGGTGCGCGACGGCCAGCTGACCATCAAGGCCGAGAGAACCGAGC	
» GST_HspX	(202)	CATCATGGTGCGCGACGGCCAGCTGACCATCAAGGCCGAGAGAACCGAGC	
		251	300
» Seq_HspX	(252)	AGAAGGACTTCGACGGCAGAAGCGAGTTCGCCTACGGCAGCTTTGTGCGG	
» GST_HspX	(252)	AGAAGGACTTCGACGGCAGAAGCGAGTTCGCCTACGGCAGCTTTGTGCGG	
		301	350
» Seq_HspX	(302)	ACCGTGTCCCTGCCTGTGGGCGCCGATGAGGACGATATCAAGGCCACCTA	
» GST_HspX	(302)	ACCGTGTCCCTGCCTGTGGGCGCCGATGAGGACGATATCAAGGCCACCTA	
		351	400
» Seq_HspX	(352)	CGACAAGGGCATCCTGACCGTGTCTGTGGCCGTGTCCGAGGGCAAGCCTA	
» GST_HspX	(352)	CGACAAGGGCATCCTGACCGTGTCTGTGGCCGTGTCCGAGGGCAAGCCTA	
		401	438
» Seq_HspX	(402)	CCGAGAAGCACATCCAGATCAGAAGCACCAACCTCGAG	
» GST_HspX	(402)	CCGAGAAGCACATCCAGATCAGAAGCACCAACCTCGAG	

Seq\_HspX – нуклеотидная последовательность гена *hspX* *M. tuberculosis*, содержащаяся в плазмиде pHW-PR8-NSwt-HspX;

GST\_HspX– секвенированная нуклеотидной последовательности гена *hspX M. tuberculosis* клонированная в вектор pGEX-4T-1;

## В

		1	50
» Seq_TB10.4	(2)	ATGTCACAAAATTATGTATAAATTACCCAGCAATGCTTGGACATGCTGGGGA	
» GST_TB10.4	(2)	ATGTCACAAAATTATGTATAAATTACCCAGCAATGCTTGGACATGCTGGGGA	
		51	100
» Seq_TB10.4	(52)	TATGGCAGGATATGCTGGAACACTTCAATCACTTGGAGCAGAAATAGCAG	
» GST_TB10.4	(52)	TATGGCAGGATATGCTGGAACACTTCAATCACTTGGAGCAGAAATAGCAG	
		101	150
» Seq_TB10.4	(102)	TGGAACAAGCAGCATTGCAATCAGCATGGCAAGGGGATACAGGGATAACA	
» GST_TB10.4	(102)	TGGAACAAGCAGCATTGCAATCAGCATGGCAAGGGGATACAGGGATAACA	
		151	200
» Seq_TB10.4	(152)	TATCAAGCTTGGCAAGCACAATGGAATCAAGCAATGGAAGATCTTGTTAG	
» GST_TB10.4	(152)	TATCAAGCTTGGCAAGCACAATGGAATCAAGCAATGGAAGATCTTGTTAG	
		201	250
» Seq_TB10.4	(202)	AGCATATCATGCAATGTCATCAACACATGAAGCAAACACAATGGCAATGA	
» GST_TB10.4	(202)	AGCATATCATGCAATGTCATCAACACATGAAGCAAACACAATGGCAATGA	
		251	288
» Seq_TB10.4	(252)	TGGCAAGAGATACAGCAGAGGCAGCAAAATGGCTCGAG	
» GST_TB10.4	(252)	TGGCAAGAGATACAGCAGAGGCAGCAAAATGGCTCGAG	

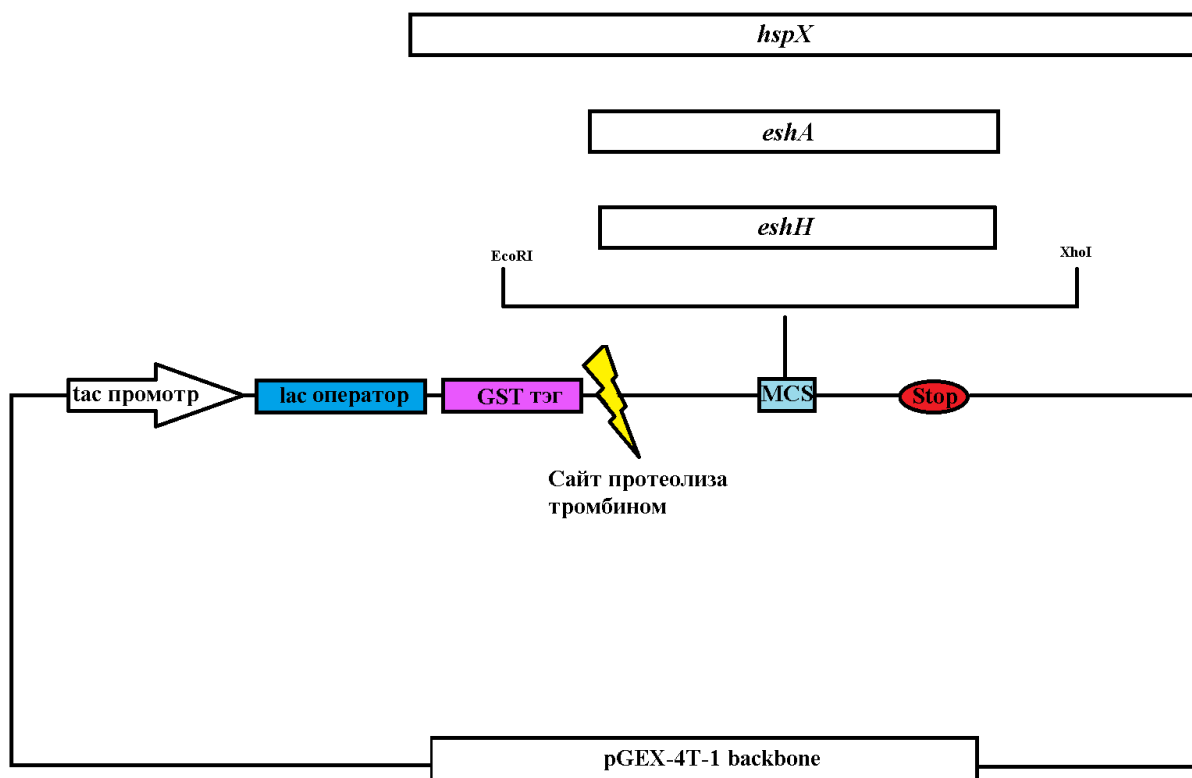
Seq\_TB10.4 – нуклеотидная последовательность гена *eshH M. tuberculosis*, содержащаяся в плазмиде pHW-НК-TBGST\_TB10.4– секвенированная нуклеотидная последовательность гена *eshH M. tuberculosis* клонированная в вектор pGEX-4T-1.

**Рисунок 5. Выравнивание секвенированных нуклеотидных последовательностей целевых генов: *esxA (A)*, *hspX (B)*, *eshH (B) M. tuberculosis*, клонированных в вектор pGEX-4T-1 с нуклеотидными последовательностями генов, использованных при амплификации.**

Как видно из рисунка 5, нуклеотидная последовательности генов *esxA* (рис. 5 А, GST\_ESAT-6), *hspX* (рис. 5 Б, GST\_HspX) и *eshH* (рис. 5 В, GST\_TB10.4) *M. tuberculosis* клонированных в вектор pGEX-4T-1 относительно нуклеотидных последовательностей целевых генов, использованных при амплификации, не содержали нуклеотидных замен. Таким образом, анализ выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *M. tuberculosis* позволяет сделать заключение, что последовательности клонированных генов *M. tuberculosis* в вектор pGEX-4T-1 имеют 100% идентичность с последовательностями генов, использованных для амплификации.

В результате проведенных манипуляций были сконструированы рекомбинантные плазмиды pGEX-4T-1/ESAT-6, pGEX-4T-1/TB10.4, pGEX-4T-1/HspX, содержащие гены *esxA*, *eshH*, *hspX M. tuberculosis*, соответственно (рис. 6).





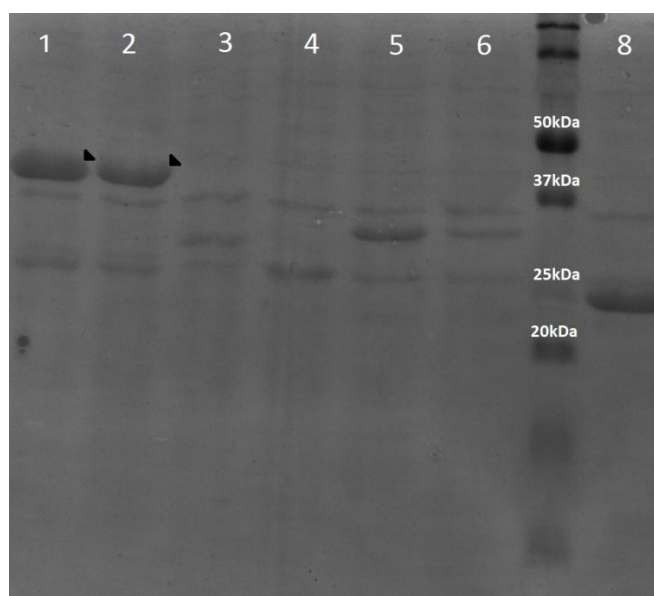
**Рисунок 6. Схема строения рекомбинантных плазмид, содержащих гены *M. tuberculosis* на основе вектора pGEX-4T-1.**

**Обозначения:** pGEX-4T-1 backbone – остов плазмиды pGEX-4T-1, tac промотор – промотор; Lac оператор – лактозный оператор; GST-тэг – глутатион-S-трансферазный тэг; MCS - multicloning site, Stop – стоп-кодон; EcoRI, XhoI – эндонуклеазы рестрикции, используемые для клонирования амплифицированных генов; *hspX*, *eshH*, *eshA* – гены *M. tuberculosis*, клонированные в вектор pGEX-4T-1.

### 3.2 Экспрессия рекомбинантных генов в клетках штамма *E. coli* Rosetta™ (DE3)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие целевые гибридные белки, были проанализированы с помощью программы GenScript Rare Codon Analysis Tool (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>), которая позволяет предсказать эффективность экспрессии гена в зависимости от аминокислотного состава, кодируемого им белка и наиболее часто используемых кодонов организма-продуцента белка (в данном случае *E. coli*). Согласно результатам анализа индекс оптимизации кодонов (CAI, Codon Adaptation Index) для всех трех целевых белков варьирует от 0,62 до 0,66, хотя допустимым считается значение от 0,8 до 1. В связи с этим в качестве штамма-реципиента был выбран штамм *E. coli* Rosetta™(DE3), так как этот штамм содержит плазмиду, позволяющую клеткам *E. coli* увеличивать синтез белков, в состав которых входят шесть редких кодонов, которые почти не используются при кодировании белков *E. coli* (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA). Стабильность данной плазмиды контролируется наличием гена, определяющего устойчивость клеток к хлорамфениколу.

Для анализа экспрессии изучаемых генов штамм *E. coli* Rosetta™(DE3) был трансформирован плазмидами pGEX-4T-1/eshA, pGEX-4T-1/eshH, pGEX-4T-1/hspX. Результаты экспрессии анализировали методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле (рис. 7 и 8). По результатам анализа были отобраны штаммы, продуцирующие гибридные белки GST-HspX, GST-TB10.4 или GST-ESAT-6.



**Рисунок 7. Электрофореграмма лизата клеток штамма-производителя гибридного белка GST-TB10.4 и клеток, трансформированных вектором pGEX-4T-1**

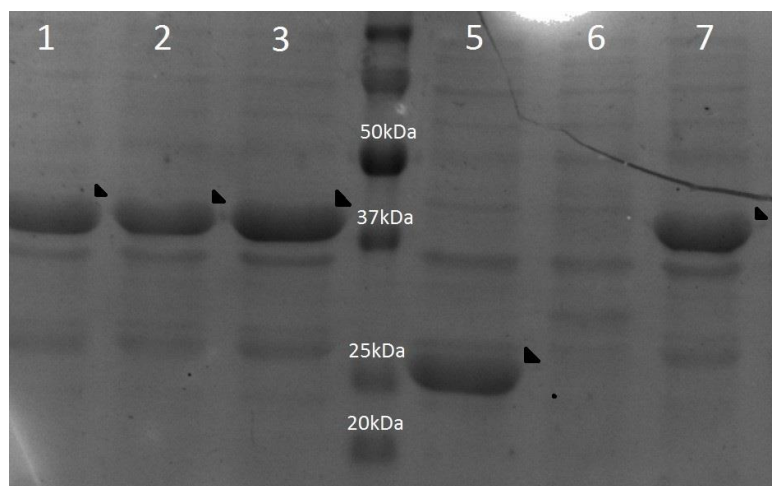
Дорожки:

1,2 - лизаты клеток, продуцирующих гибридный белок GST-TB10.4 (расчетный размер 35 kDa);

3,4,5,6 - лизаты клеток, в которые отсутствует экспрессия рекомбинантного гена;

8 - лизат клеток штамма, содержащего исходный вектор pGEX-4T-1, продуцирующего глутатион-S-трансферазу (расчетный размер 25 kDa);

Необозначенная дорожка – маркер молекулярной массы (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards);



**Рисунок 8. Электрофореграмма лизата клеток штаммов-производителей гибридных белков GST-HspX, GST-ESAT-6 и клеток, трансформированных вектором pGEX-4T-1.**

Дорожки:

1,2,3 – лизаты клеток, продуцирующих гибридный белок GST-HspX (расчетный размер 39 kDa);

5 - лизат клеток штамма, содержащего исходный вектор pGEX-4T-1, продуцирующего глутатион-S-трансферазу (расчетный размер 25 kDa);

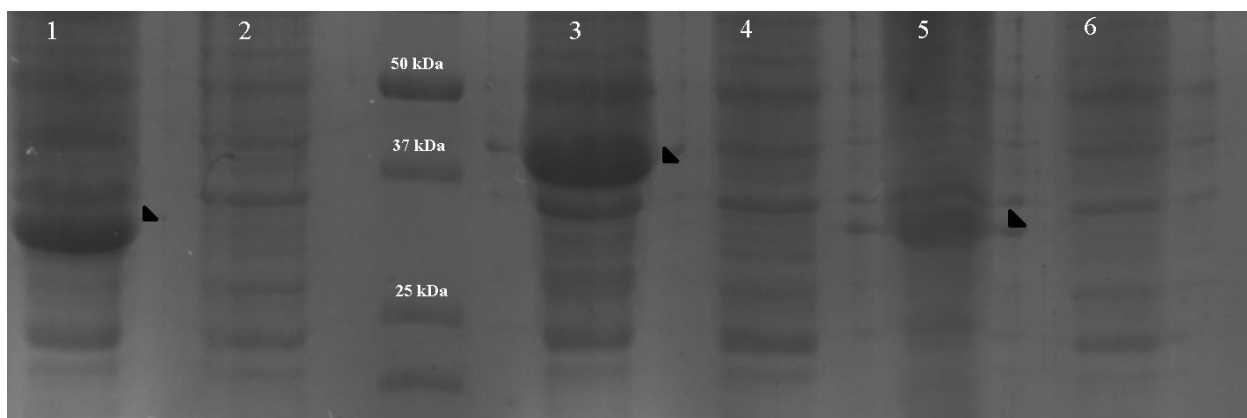
6 - лизат клеток, с отсутствующей продукцией GST-ESAT-6;

7 – лизат клеток, продуцирующих целевой химерный белок GST-ESAT-6 (расчетный размер 37 kDa);

Необозначенная дорожка – маркер молекулярной массы (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards);

Таким образом, было показано, что клетки штамма *E. coli* Rosetta™(DE3), трансформированные рекомбинантными плазмидами pGEX-4T-1/eshA, pGEX-4T-1/eshH, pGEX-4T-1/hspX в автоиндукционной среде ZYM 5052 продуцируют гибридные белки GST-ESAT-6, GST-TB10.4 и GST-HspX, соответственно.

Необходимо было установить локализацию продукции гибридных белков, находились ли они в тельцах включения или цитоплазме. Для этого анализировали растворимую и нерастворимую фракции лизатов клеток штаммов-продуцентов гибридных белков методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле. Это позволило установить, что гибридные белки GST-HspX, GST-TB 10.4, GST-ESAT-6 накапливаются в тельцах включения (рис. 9).



**Рисунок 9. Электрофореграмма разных фракций лизата клеток штаммов-продуцентов гибридных белков GST-HspX, GST-TB 10.4 и GST-ESAT-6.**

Дорожки:

- 1 - Нерастворимая фракция лизата клеток штамма-продуцента Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/ESAT-6, продуцирующего гибридный белок GST-TB10.4;
- 2 - Растворимая фракция лизата клеток штамма-продуцента Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/ESAT-6, продуцирующего гибридный белок GST-TB10.4 (расчетный размер: 35 kDa);
- 3 - Нерастворимая фракция лизата клеток штамма-продуцента Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/HspX, продуцирующего гибридный белок GST-HspX (расчетный размер 39 kDa);
- 4 - Растворимая фракция лизата клеток штамма-продуцента Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/HspX, продуцирующего гибридный белок GST-HspX;
- 5 - Нерастворимая фракция лизата клеток штамма-продуцента Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/TB10.4, продуцирующего гибридный белок GST-ESAT-6 (расчетный размер 37 kDa);
- 6- Растворимая фракция лизата клеток штамма-продуцента Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/TB10.4, продуцирующего гибридный белок GST-ESAT-6;

Необозначенная дорожка - маркер молекулярного массы (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards).

Таким образом, созданы штаммы-продуценты *E. coli* Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/TB10.4, Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/HspX, Rosetta™(DE3)/pGEX-4T-1/ESAT-6 микобактериальных белков в составе гибридных белков GST-TB10.4, GST-HspX и GST-ESAT-6, соответственно. По результатам анализа фракций лизата клеток было

обнаружено, что все целевые гибридные белки накапливаются в клетках в тельцах включения.

Существует предположение, что при сверхпродукции белков в *E. coli* белок синтезируется быстрее, чем клеточные системы успевают его фолдировать. Поэтому он агрегирует в тельца включения, что создает сложности для возвращения ему нативной структуры, так как многие антигенные эпитопы образуются за счет особенностей укладки  $\alpha$ -спиралей  $\beta$ -слоев белка.

Поэтому было принято решение подобрать условия эффективной продукции данных белков в растворимой форме. Следуя указаниям в документации к вектору (GST\_gene\_fusion\_system\_handbook, GE) осуществляли подбор условий индукции экспрессии генов, содержащихся в плазмидных конструкциях в штаммах-продуцентах *E. coli* Rosetta™(DE3). Понижение температуры культивирования позволяет шаперонам и другим белкам, участвующим в фолдинге вновь синтезированных белков, препятствовать их агрегации. Так же были поставлены эксперименты по снижению концентрации индуктора экспрессии IPTG в диапазоне от 0,5 мМ до 0,1 мМ (Приложения Б-Г).

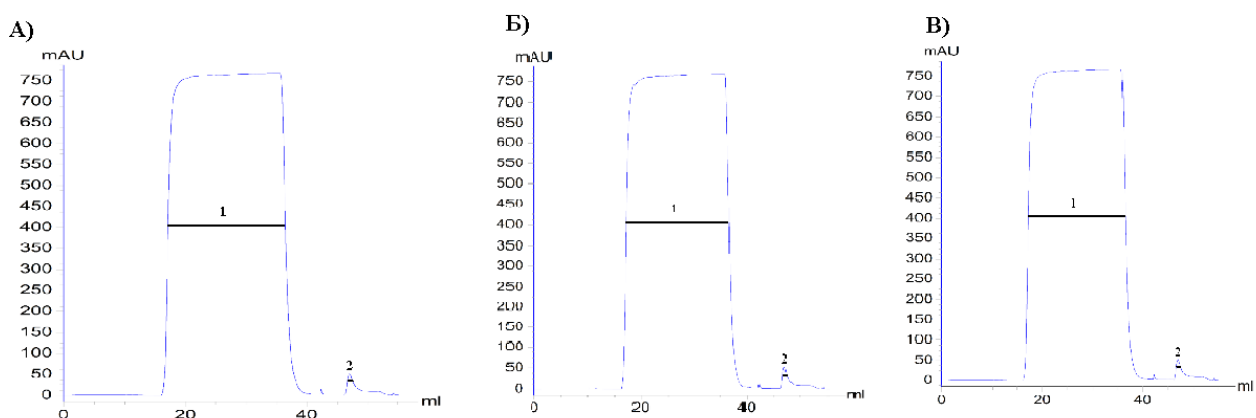
Согласно результатам эксперимента по подбору условий экспрессии (см. Приложение) можно сделать вывод о том, что при понижении температуры культивирования происходит сильное снижение продукции целевых белков, при этом следует отметить, что количество растворимой формы данных белков в клетках ограничено и не превышает (5%) согласно результатам денситометрии электрофореграмм проведенной с помощью Image Lab™ Software (Bio-Rad).

Таким образом, было принято решение выделять целевые гибридные белки из телец включения.

### 3.3 Очистка гибридных белков GST-HspX, GST-ESAT-6, GST-TB10.4.

На первом этапе тельца включения, растворяли в 8М растворе мочевины с добавлением дитиотреитола до конечной концентрации 0,05% в общем объеме раствора (см. Материалы и методы).

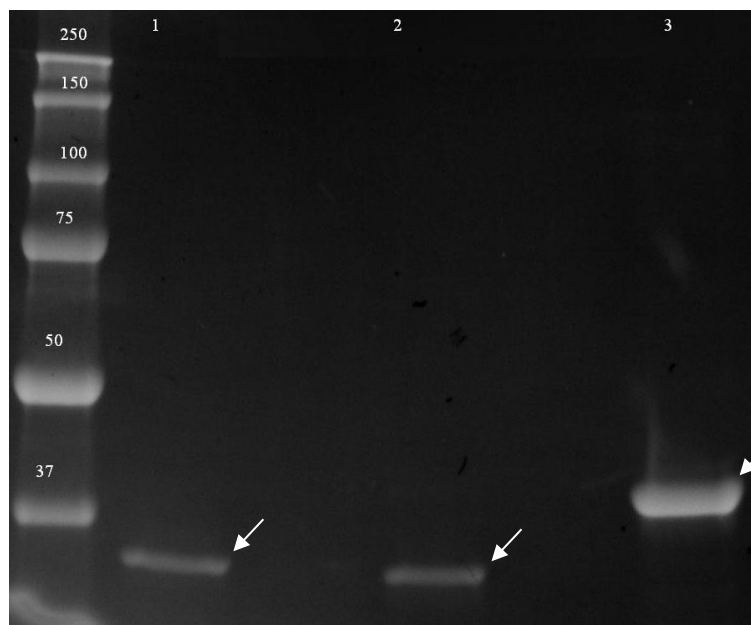
Аффинная хроматография GST-меченных белков на иммобилизованном глутатионе неэффективна в присутствии высоких концентраций денатурирующих агентов, таких, как мочевина. Поэтому необходимо было подобрать условия рефолдинга с учетом условий очистки гибридных белков методом аффинной хроматографии. В качестве исходного варианта был выбран рефолдинг растворенного белка из телец включения гибридных белков в фосфатно-солевой буфере методом разбавления (см. Материалы и методы). После чего гибридные белки GST-HspX, GST-ESAT-6, GST-TB10.4 были очищены методом аффинной хроматографии (рис.8).



**Рисунок 10. Хроматограммы очистки гибридных белков GST-ESAT-6 (А), GST-TB10.4(Б) и GST-HspX(В) методом аффинной хроматографии на колонке GSTrap HP. 1 - фракция не связавшегося материала; 2 - фракция элюата; шкала показывает оптическую плотность на длине волны 280 нм.**

Приведенные выше хроматограммы показывают, что синтезируемые гибридные белки, меченные глутатион-S-трансферазой, взаимодействуют с иммобилизованным глутатионом, что обеспечивает эффективное отделение целевых гибридных белков из общей белковой фракции.

Чистоту полученных проб анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (см. Материалы и методы). По результатам электрофореза можно заключить, что используемый протокол выделения удовлетворяет условиям дальнейшего использования этих химерных белков (рис.11).



**Рисунок 11. Электрофореграмма элюата проб химерных белков GST-HspX, GST-TB 10.4 и GST-ESAT-6 после аффинной хроматографии.**

Дорожки:

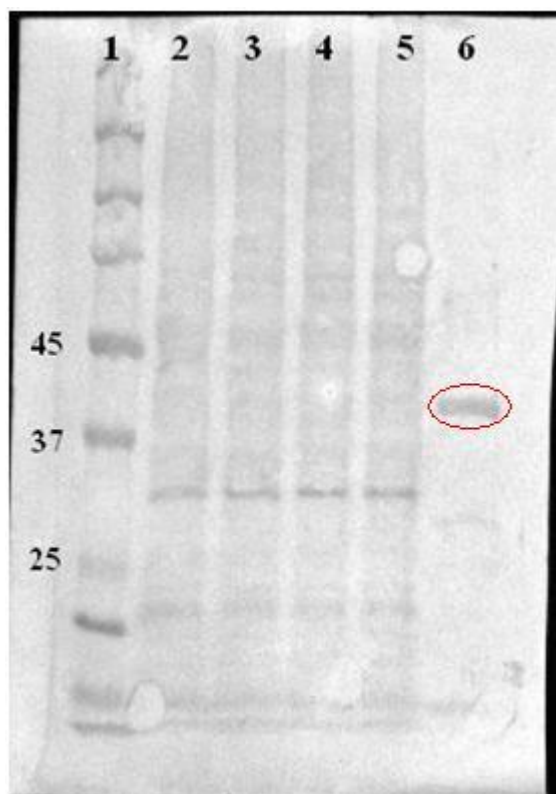
- 1 - Гибридный белок GST-ESAT-6 (расчетный размер 37 kDa);
- 2 – Гибридный белок GST-TB10.4 (расчетный размер: 35 kDa);
- 3 - Гибридный белок GST-HspX (расчетный размер 39 kDa);

Определения количества полученных белков осуществлялось с помощью встроенного в хроматограф программного обеспечения Unicorn 6.3 (GE Healthcare).

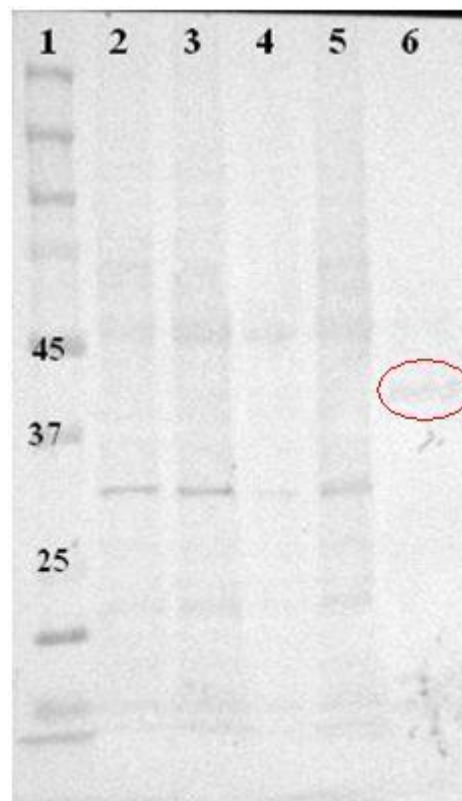
### 3.4 Вестерн-блоттинг гибридных белков GST-TB10.4 и GST-HspX.

Для подтверждения специфичности микобактериальных фрагментов гибридных белков GST-TB10.4 и GST-HspX провели вестерн-блоттинг с использованием коммерческих мышинных антител к микобактериальным белкам TB10.4 и HspX (см. Материалы и методы). Согласно результатам вестерн-блоттинга (рис. 12) полученные белковые препараты содержат в своем составе микобактериальный компонент.

А)



Б)



**Рисунок 12. Фотография результатов иммуноблота гибридных белков (А) GST-HspX с антителами к HspX и (Б) GST-TB10.4 с антителами к TB10.4.**

А) Дорожка 1 – Маркер молекулярной массы (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad, США)).

Дорожки 2-5 – гибридный белок Hsp, продуцирующийся в культуре эукариотических клеток HeLa, несущих вектор pHW-PR8-NSwt-HspX (разные клоны).

Дорожка 6 – гибридный белок GST-HspX

Б) Дорожка 1 – Маркер молекулярной массы (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards).

Дорожки 2-5 – гибридный белок TB10.4, продуцирующийся в культуре эукариотических клеток HeLa, несущих вектор pHW-PR8-TB (разные клоны).

Дорожка 6 – гибридный белок GST-TB10.4



### 3.5 Изучение антигенных свойств гибридных белков *in vitro*. Специфическое взаимодействие с антителами к *M.tuberculosis*.

Гибридные белки GST-HspX, GST-TB 10.4 и GST-ESAT-6 были использованы для детекции антител в сыворотках крови больных активной и латентной формой туберкулеза, при этом поиск антител к гибридным белкам проводили и в сыворотке крови здоровых людей. Для этого проводили иммуноферментный анализ. Белки сорбировали на планшетах в течении ночи при +4°C. После чего на следующий день осуществляли все остальные этапы проведения ИФА согласно протоколу (см. материалы и методы). Всего было 22 образца, каждый из которых развели в 10 раз, а затем сделали еще 3 разведения с шагом в 4 и после остановки реакции добавление одно нормальной серной кислоты проводили измерение оптической плотности на мультисканере BioTek Synergy H1 (BioTek, США) при длине волны 450нм (рис.13).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Hsp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
2	A	0,388	0,460	0,608	0,332	0,535	0,397	0,390	0,382	0,311	0,529	0,940	0,448	450
3	B	0,181	0,193	0,297	0,171	0,209	0,207	0,163	0,204	0,150	0,305	0,483	0,248	450
4	C	0,102	0,108	0,137	0,126	0,109	0,104	0,094	0,107	0,085	0,146	0,191	0,118	450
5	D	0,087	0,081	0,086	0,078	0,080	0,078	0,079	0,077	0,069	0,084	0,100	0,076	450
6	E	0,627	0,939	0,262	0,329	0,493	0,724	0,210	0,200	0,517	1,187	0,070	0,071	450
7	F	0,407	0,432	0,133	0,180	0,207	0,297	0,166	0,121	0,245	0,298	0,065	0,064	450
8	G	0,218	0,203	0,091	0,103	0,111	0,133	0,162	0,095	0,140	0,114	0,066	0,058	450
9	H	0,153	0,131	0,077	0,083	0,092	0,124	0,163	0,087	0,089	0,098	0,062	0,082	450
10														
11	TB104	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
12	A	1,217	1,514	2,260	0,884	1,604	1,906	1,278	1,051	0,699	2,874	1,906	0,932	450
13	B	0,518	0,484	1,249	0,329	0,659	0,705	0,369	0,328	0,236	2,132	1,001	0,435	450
14	C	0,153	0,124	0,369	0,127	0,169	0,176	0,116	0,124	0,099	1,046	0,439	0,174	450
15	D	0,072	0,070	0,101	0,076	0,080	0,077	0,079	0,081	0,071	0,392	0,157	0,083	450
16	E	2,865	2,369	0,321	0,668	1,674	2,169	0,352	0,294	1,759	0,684	0,061	0,067	450
17	F	2,047	1,143	0,147	0,297	0,746	1,104	0,244	0,139	0,962	0,237	0,059	0,061	450
18	G	0,881	0,291	0,085	0,094	0,154	0,276	0,242	0,085	0,293	0,091	0,058	0,059	450
19	H	0,179	0,109	0,062	0,070	0,082	0,108	0,200	0,067	0,093	0,070	0,058	0,062	450
20														
21	ESAT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
22	A	1,171	1,372	2,031	0,810	1,439	1,421	1,067	1,052	0,657	2,083	1,731	0,992	450
23	B	0,473	0,484	1,064	0,299	0,566	0,607	0,355	0,450	0,272	1,515	0,947	0,502	450
24	C	0,132	0,137	0,269	0,116	0,155	0,159	0,111	0,149	0,096	0,675	0,353	0,211	450
25	D	0,080	0,080	0,088	0,073	0,080	0,078	0,087	0,077	0,068	0,173	0,135	0,108	450
26	E	2,422	1,886	0,333	0,101	1,447	1,653	0,302	0,234	1,626	0,548	0,060	0,059	450
27	F	1,433	0,982	0,152	0,066	0,638	0,873	0,238	0,136	0,848	0,200	0,059	0,057	450
28	G	0,661	0,343	0,081	0,062	0,167	0,238	0,245	0,090	0,310	0,097	0,058	0,058	450
29	H	0,216	0,106	0,062	0,059	0,081	0,085	0,212	0,069	0,094	0,070	0,058	0,058	450

**Рисунок 13. Результаты измерения оптической плотности после остановки ИФА.**

Значения в таблице соответствуют OD.

Важно было понять, есть ли статистически-значимые различия между группами (больные активной формой, больные латентной формой туберкулеза и здоровые) в реакции на антигены.

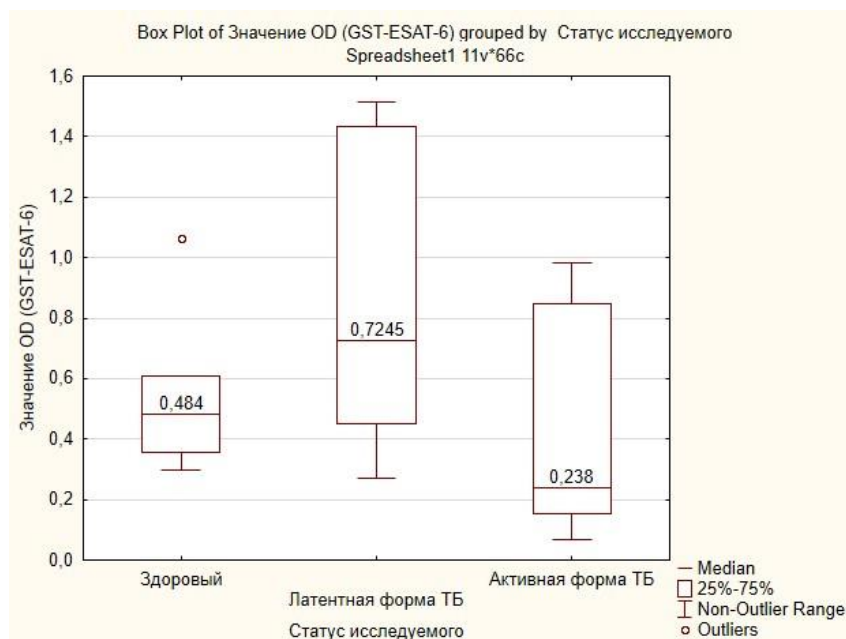
Полученные результаты статистически не имели нормального распределения по критерию Лиллифорса и критерию Шапиро-Уилка, значимость критериев составляла менее 0,05 хотя бы в одной из групп по каждому гибриднему белку (рис.14). Поэтому для анализа полученных результатов использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса так как он позволяет сравнить несколько групп между собой при отсутствии в этих группах выборок, имеющих нормальное распределение (рис. 14).

Variable	Tests of Normality (Spreadsheet1)				
	N	max D	Lilliefors p	W	p
ESAT-6 здоровые	7	0,266994	p < ,15	0,845726	0,112278
ESAT-6 латентная форма	7	0,204778	p > .20	0,914858	0,430531
ESAT-6 активная форма	8	0,303697	p < ,05	0,811858	0,038287
Hsp X здоровые	7	0,303990	p < ,05	0,805043	0,045934
HspX латентная форма	7	0,188483	p > .20	0,946889	0,701317
HspX активная форма	8	0,157453	p > .20	0,918223	0,415611
TB10.4 здоровые	7	0,244742	p > .20	0,843015	0,105982
TB 10.4 латентная форма	7	0,209143	p > .20	0,868966	0,181798
TB 10.4 активная	8	0,309420	p < ,05	0,816685	0,043060

**Рисунок 14. Анализ нормальности распределения результатов ИФА сывороток крови людей с гибридными белками (STATISTICA, StatSoft).**

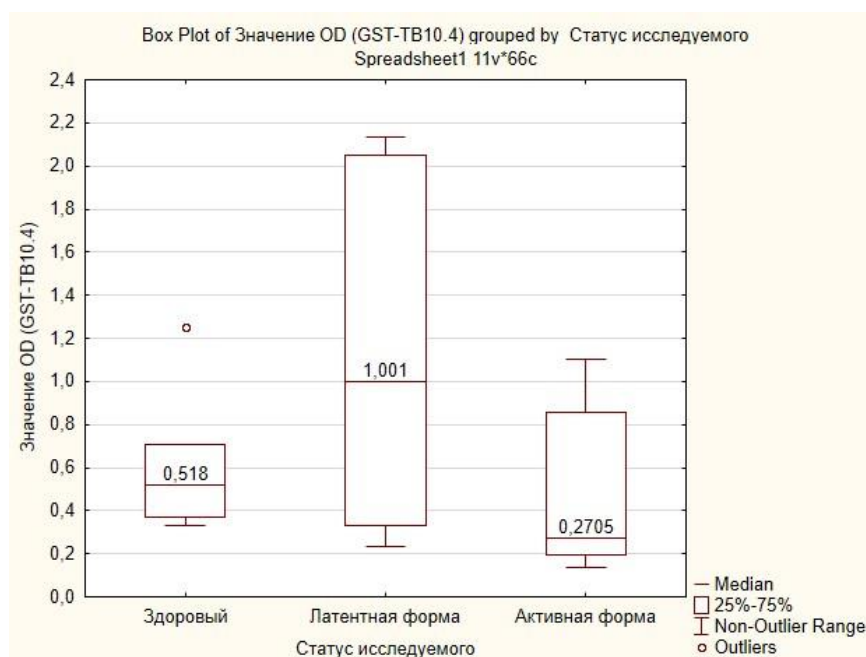
Variable – Переменные (названия каждой из групп переменных отображены в столбце); Test of Normality (Spreadsheet1) – тест на нормальность (таблица1); N – количество значений в выборке; max D – максимальная дисперсия в выборке; Lilliefors, p - критерий Лиллиефорса, значимость; W – критерий Критерий Шапиро-Уилка, p – значимость критерия.

Для статистической оценки разброса значений OD при детекции в результате реакции антиген-антитело при использовании гибридных белков GST-ESAT-6, GST-TB10.4 и GST-TB10.4 были построены диаграммы размаха значений в программном обеспечении STATISTICA (StatSoft) (рис. 15-17).



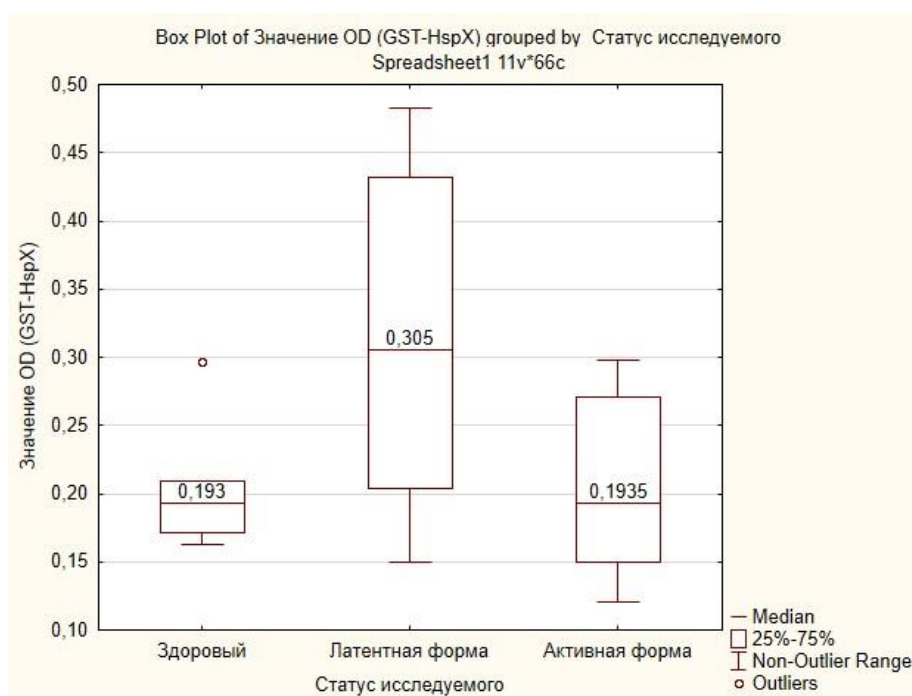
**Рисунок 15. Диаграмма размаха значений OD при детекции в результате реакции антиген-антитело при использовании гибридного белка GST-ESAT-6.**

Median – медиана; Non-Outlier Range – Диапазон без выпадающих значений; Outliers – выпадающие значения.



**Рисунок 16. Диаграмма размаха значений OD при детекции в результате реакции антиген-антитело при использовании гибридного белка GST-TB10.4.**

Median – медиана; Non-Outlier Range – Диапазон без выпадающих значений; Outliers – выпадающие значения.



**Рисунок 17.** Диаграмма размаха значений OD при детекции в результате реакции антиген-антитело при использовании гибридного белка GST-HspX.

Median – медиана; Non-Outlier Range – Диапазон без выпадающих значений; Outliers – выпадающие значения.

		Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Значение OD (ESAT-6) (Spreadsheet1)			
		Independent (grouping) variable: Статус исследуемого			
		Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 22) =2,666102 p = ,2637			
Depend.:		Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
Значение OD (ESAT-6)					
Здоровый		103	7	83,00000	11,85714
Латентная форма ТБ		104	6	88,00000	14,66667
Активная форма ТБ		105	9	82,00000	9,11111

		Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Значение OD (TB10.4) (Spreadsheet1)			
		Independent (grouping) variable: Статус исследуемого			
		Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 22) =3,155421 p = ,2064			
Depend.:		Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
Значение OD (TB10.4)					
Здоровый		101	7	87,00000	12,42857
Латентная форма		102	7	99,00000	14,14286
Активная форма		103	8	67,00000	8,37500

		Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Значение OD (HspX) (Spreadsheet1)			
		Independent (grouping) variable: Статус исследуемого			
		Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 22) =4,339316 p = ,1142			
Depend.:		Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
Значение OD (HspX)					
Здоровый		101	7	68,0000	9,71429
Латентная форма		102	7	110,0000	15,71429
Активная форма		103	8	75,0000	9,37500

**Рисунок 18.** Статистический анализ группы выборок с использованием критерия Краскела-Уоллиса. Sum of Ranks – сумма рангов, mean rank – значение ранга, valid N – число действительных значений переменных.

Так как во всех трех случаях при статистическом сравнении групп  $p > 0,05$ , следовательно, различия между группами выборок по каждому из антигенов недостоверны (рис.18).

Однако, установлено, что максимальные значения оптической плотности (OD) при детекции в результате реакции антиген-антитело в ИФА были выявлены в сыворотках, полученных от лиц с латентной туберкулезной инфекцией; в группах здоровых лиц и лиц с активным туберкулезом эти значения были ниже и практически не отличались между собой. Полученные результаты свидетельствуют о специфическом взаимодействии рекомбинантных белков с антителами к *M. tuberculosis* и способностью выявлять положительные сыворотки по антителам среди разных групп, обследуемых.

### 3.6. Использование гибридных белков в качестве специфических индукторов при проведении исследований клеточного иммунитета.

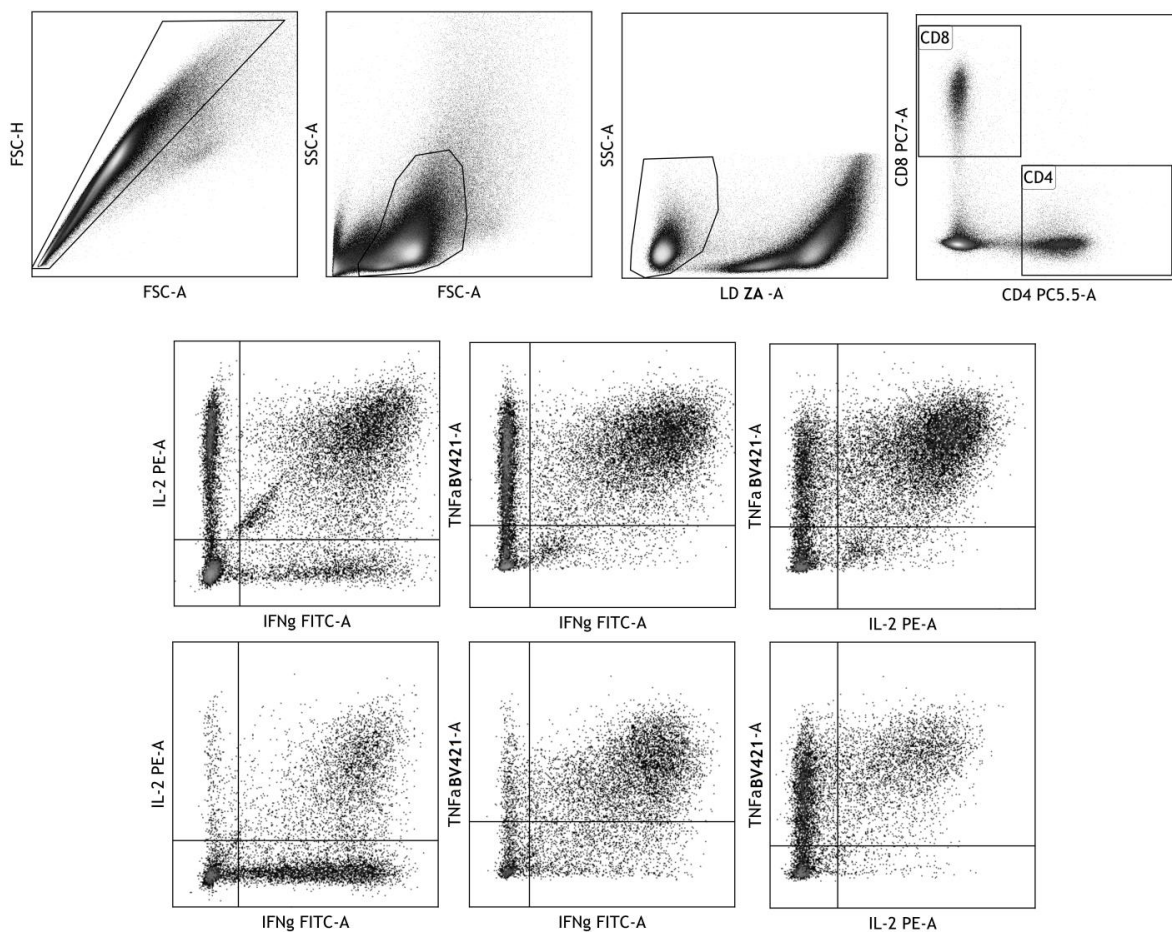
Диагностика латентного и активного туберкулеза основана на определении количества (частоты) Т-клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$  лимфоцитами периферической крови у людей после их стимуляции *in vitro* антигенами *M. tuberculosis*. На этом принципе основаны современные тест-системы на основе IGRA (Interferon-gamma release assay).

Аналогичный подход широко используется и в научных исследованиях протективной активности новых вакцин и лекарственных препаратов на моделях экспериментальной туберкулезной инфекции у мышей путем определения выработки IFN- $\gamma$  в ответ на специфическую стимуляцию. Наиболее часто используют методики, такие как РБТЛ (реакция бласттрансформации лимфоцитов), определение секретируемого IFN- $\gamma$  стимулированными лимфоцитами методом ИФА (иммуоферментный анализ) и EliSpot.

Альтернативным подходом, который дает возможность фенотипической и функциональной оценки Т-лимфоцитов на уровне одной клетки и позволяет оценить иммунологические параметры защиты от туберкулеза, является технология внутриклеточного и поверхностного окрашивания клеток с использованием метода проточной цитофлуориметрии (Pala, Hussell, & Openshaw, 2000). Преимуществом последнего метода является возможность детального изучения фенотипа клеток, секретирующих не только IFN- $\gamma$ , а также другие цитокины, в том числе, TNF- $\alpha$  и IL-2 (Abel *et al.*, 2010). В последние годы показана связь полифункциональных в отношении продукции IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 антиген-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток с их защитным потенциалом (Prezzemolo *et al.*, 2014; Thakur, Pedersen, & Jungersen, 2012)

В связи с этим была изучена способность полученных гибридных белков GST-ESAT-6, GST-HspX и GST-TB10.4 *M. tuberculosis* индуцировать *in vitro* продукцию цитокинов IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$  спленоцитами мышей, зараженными вирулентным штаммом *M. tuberculosis* Erdman. Контролем служили интактные животные.

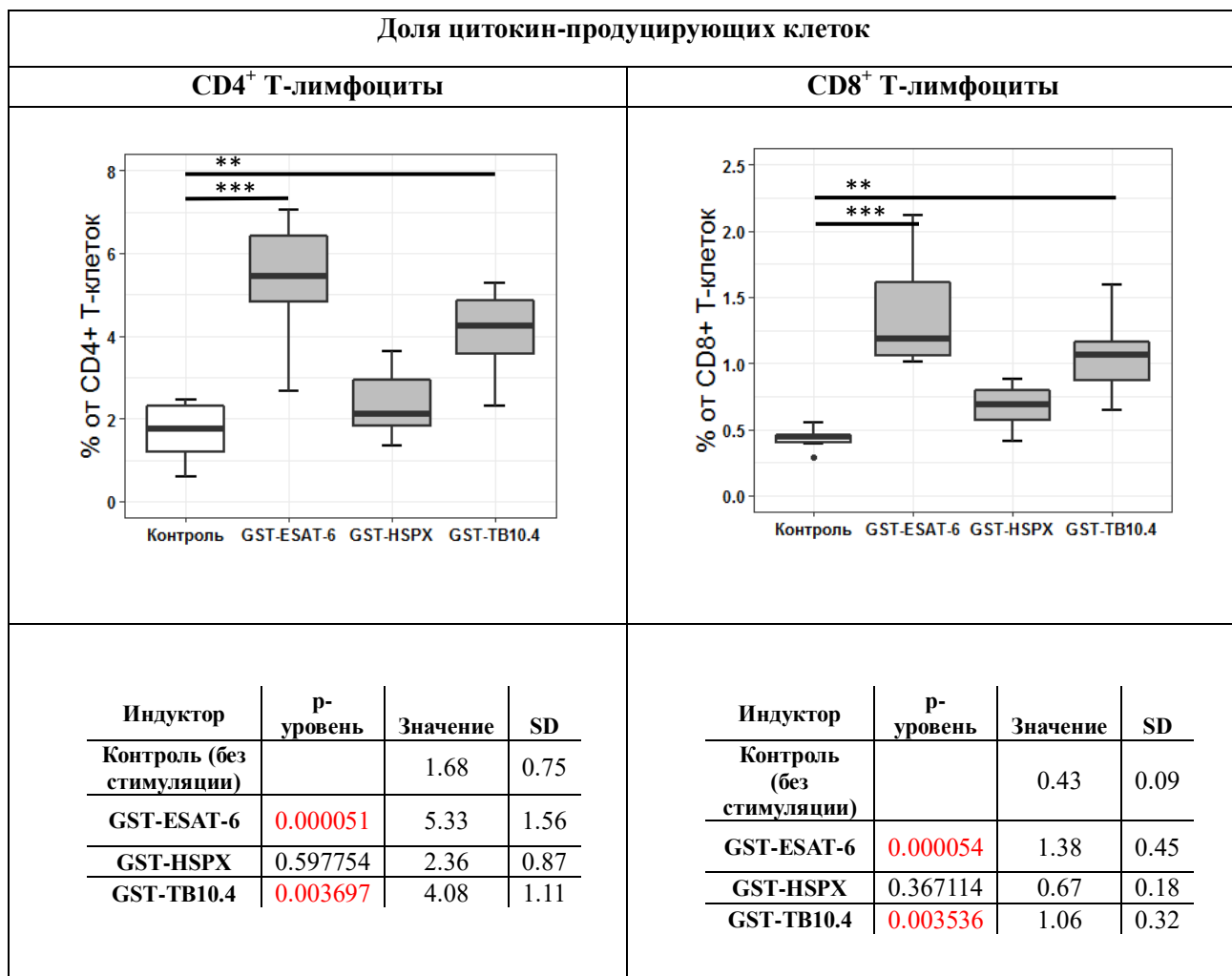
С помощью метода проточной цитофлуориметрии мы провели исследование относительного содержания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клеток, способных под действием специфической стимуляции синтезировать IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 или различные комбинации данных цитокинов в селезенках мышей через 4 недели после внутривенного заражения вирулентным штаммом *M. tuberculosis* Erdman. Измеряли количество клеток, секретирующих IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , или комбинации данных цитокинов в ответ на стимуляцию гибридными белками GST-ESAT-6, GST-HspX и GST-TB10.4.



**Рисунок 19. Цитокин-продуцирующие клетки. Тактика «гейтирования».**

Одиночные клетки выявлялись на основании характеристик светорассеяния (FS/SS, FS-A/FS-H). Живые клетки отделяли при помощи маркера Zombie Aqua. Лимфоциты разделяли на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки по наличию соответствующих маркеров. После этого оценивали относительный состав клеток данных популяций, содержащих внутриклеточные цитокины IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ .

Согласно полученным данным все три исследуемых рекомбинантных белка вызвали формирование пула цитокин-продуцирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в селезенке зараженных мышей (рис.20). Следует отметить, что стимуляция спленоцитов интактных животных рекомбинантными белками не вызывала значительного превышения фоновой продукции цитокинов по сравнению с нестимулированным контролем (Приложение А).



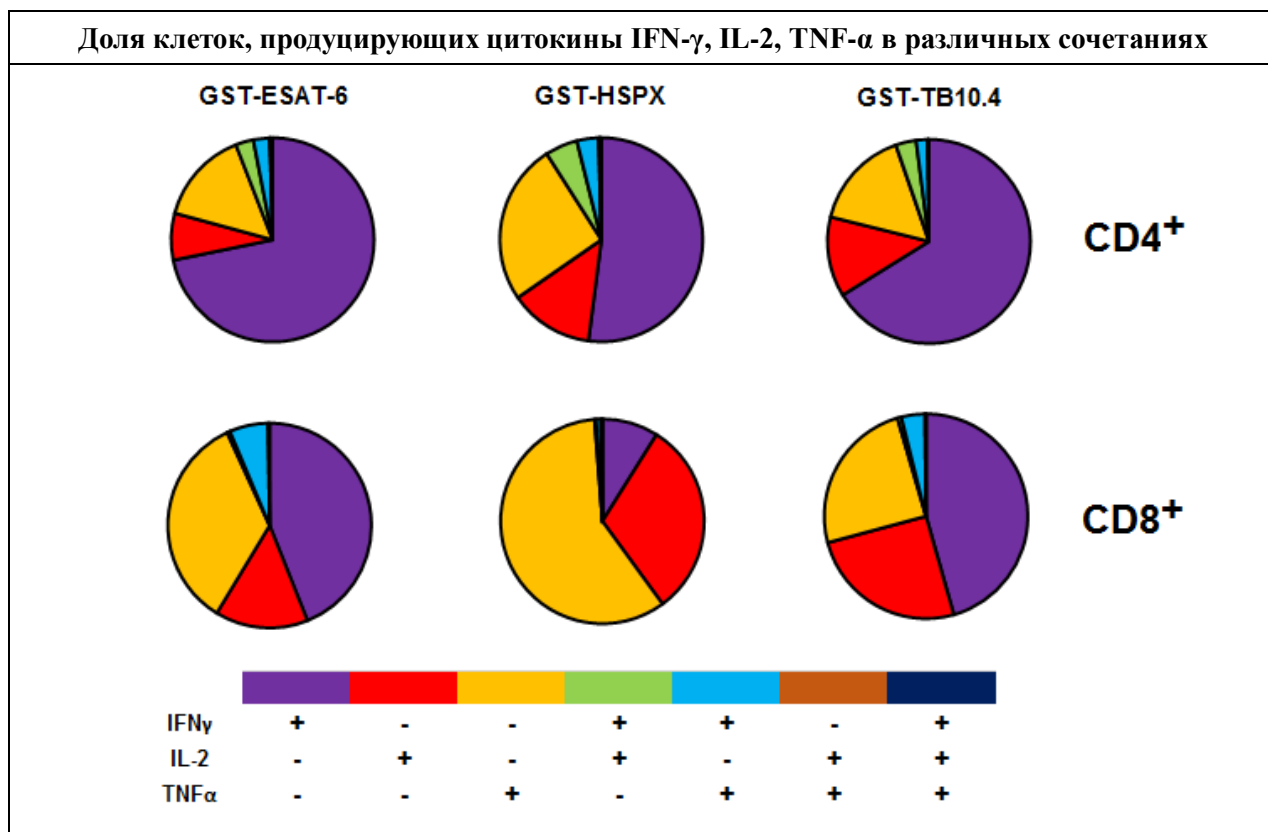
**Рисунок 20. Общая продукция цитокинов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами мышей, перенесших инфекцию *M. tuberculosis* в ответ на стимуляцию гибридными белками GST-ESAT-6, GST-HspX и GST-TB10.4**

В таблицах под графиками представлены средние значения (Mean) доли цитокин-продуцирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, стандартные отклонения (SD), а также р-уровни значимости, полученные в результате сравнения групп при помощи критерия Даннетта. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Число наблюдений по каждой группе ( $n = 6$ ).

При использовании в качестве индуктора гибридного белка GST-ESAT-6 были выявлены достоверные различия процентного содержания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов по сравнению с нестимулированным контролем ( $p < 0,01$ ). Аналогичные результаты были показаны для гибридного белка GST-TB10.4 (рис.20). При индукции лимфоцитов селезенки гибридным белком GST-HspX общая доля цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов селезенки была выше в образцах, стимулированных гибридным белком GST-HspX по сравнению с контролем, однако статистически значимых различий выявлено не было. Данное обстоятельство, по-видимому, является отражением различий в иммунных ответах на ТБ белки, относящиеся к различным фазам жизненного цикла микобактерий, при острой экспериментальной туберкулезной инфекции.



В гетерогенном пуле Т-лимфоцитов содержатся семь различных субпопуляций цитокин-продуцирующих клеток, способных к выработке IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 в различных комбинациях. Проведено изучение доли антиген-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, секретирующих внутриклеточно один (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  или IL-2), два (IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-2, или TNF- $\alpha$  и IL-2) или три цитокина (IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  и IL-2) в селезенке зараженных мышей (рис.21).



**Рисунок 21. Продукция цитокинов IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$  CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами мышей, перенесших инфекцию *M. tuberculosis* в ответ на стимуляцию гибридными белками GST-ESAT-6, GST-HspX и GST-TB10.4**

На круговых диаграммах представлена средняя доля Т-лимфоцитов, продуцирующих 1, 2 или 3 цитокина одновременно (относительно общего числа цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов).

Обращает на себя внимание тот факт, что основной вклад в изменение общего числа цитокин-продуцирующих клеток на фоне стимуляции гибридными белками GST-ESAT-6 и GST-TB10.4 вносило усиление продукции IFN- $\gamma$ , а при стимуляции гибридным белком GST-HspX – увеличение доли TNF $\alpha$ <sup>+</sup>-лимфоцитов.

Таким образом, было показано, что полученные гибридные белки могут быть использованы в качестве специфических индукторов при проведении иммунологических исследований, что позволит сократить расходы на покупку дорогостоящих коммерческих реагентов при выполнении научно-исследовательских работ.

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В течение многих лет предпринимаются усилия для разработки новой вакцины против туберкулеза, а также методов диагностики этого заболевания. На данный момент не существует биомаркеров, по которым можно было бы судить о развитии защитного иммунитета против туберкулеза у индивидуума. Но лучшее понимание того, что представляет собой защитный ответ Т-клеток, может способствовать созданию такой вакцины (Woodworth *et al*, 2011). В настоящий момент идет разработка не только новых вакцинных кандидатов, но и рассматриваются разные стратегии иммунизации, одна из самых перспективных из них является стратегия гетерологичной иммунизации, при которой могут использоваться разные типы вакцин, каждая из которых содержит один и тот же набор антигенов. Именно использование данной стратегии может индуцировать сильные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточные ответы. Использование вакцины на основе вируса, вызывающего CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ, совместно с субъединичной вакциной, способной индуцировать CD4<sup>+</sup> Т-клеточный теоретически позволило бы добиться значительного защитного эффекта. Применение накопленных знаний о продукции антигенов *M. tuberculosis* позволит качественно подойти к решению этой проблемы. При различных формах туберкулеза секретируются разные антигены. Следует отметить, что для *M. tuberculosis* существуют уникальные антигены - ESAT6 и TB10.4, которые секретируются метаболически активным *M. tuberculosis*. ESAT6 и TB10.4 кодируются группой генов (RD-1), которая присутствует в *M. tuberculosis* и отсутствует в БЦЖ (Kaufmann S. H., 2010). Белок HspX - стресс-белок, который продуцируется во время латентной инфекции и играет роль в поддержании жизнеспособности патогена. Поэтому получение этих белков и характеристика их антигенных свойств являлось особенно значимой частью исследования.

В данной работе была сконструирована прокариотическая система экспрессии генов, кодирующих протективные антигены *M. tuberculosis* на основе вектора pGEX4-T-1 и штамма-реципиента *E. coli* Rosetta™(DE3). Был проведен подбор условий экспрессии в результате которого было выяснено, что понижение температуры культивирования приводит к уменьшению продукции всех гибридных белков и в цитоплазме, и в тельцах включения. Для полученных в этой работе целевых белков существует пиковая концентрация белка в цитоплазме, после которой он начинает накапливаться в виде телец включения. Эта концентрация составляет 5% от общего количества белка в клетке, что делает процесс выделения гибридных белков из растворимой фракции лизатов клеток менее эффективным, чем из телец включения. При этом, культивирование в автоиндукционной среде ZYM5052 при температуре 37°C обеспечивает накопление белка

в среднем до концентрации, составляющей 15% от общего количества белка в клетках согласно результатам денситометрии. В связи с накоплением гибридных белков в составе телец включения были подобраны и оптимизированы протоколы выделения методом разбавления в мочеvine и последующего рефолдинга (см. Материалы и методы).

Изучение антигенных свойств полученных гибридных белков проводилось *ex vivo* на спленоцитах селезенки мышей, инфицированных *M. tuberculosis* и *in vitro* на сыворотках крови людей как здоровых, так и имеющих активную и латентную формы туберкулеза, при этом был осуществлен статистический анализ результатов обоих исследований.

При стимуляции спленоцитов селезенки мышей основной вклад в изменение общего числа цитокин-продуцирующих клеток на фоне стимуляции гибридными белками GST-ESAT-6 и GST-TB10.4 усиливает продукцию  $IFN\gamma$ , а стимуляция гибридным белком GST-HspX – увеличивает долю  $TNF\alpha$ -лимфоцитов, что, по-видимому, является отражением различий в характере течения экспериментальной туберкулезной инфекции. При этом стимуляция спленоцитов интактных животных гибридными белками не вызывала значительного превышения фоновой продукции цитокинов  $IFN\gamma$ , IL2 и  $TNF\alpha$  по сравнению с нестимулированным контролем, что позволяет сделать вывод о специфичности полученных белков и доступности иммуногенных эпитопов в их структуре.

При исследовании антигенных свойств гибридных белков на сыворотках крови было выявлено, что больше всего антител к полученным гибридным белкам имеется у людей с латентной формой туберкулеза. При этом люди с активной формой туберкулеза имели такой же по силе ответ, как и здоровые люди. Это может объясняться несколькими причинами.

Во-первых, люди, болеющие туберкулезом в активной форме, проходят интенсивное лечение противотуберкулезными препаратами, которые оказывают токсическое действие на клетки иммунной системы (van den Boogaard, Kibiki, Kisanga, Boeree, & Aarnoutse, 2009).

Во-вторых, среди исследуемых людей не было никого младше 20 лет, поэтому можно предполагать, что они могут быть инфицированы микобактериями окружающей среды.

В-третьих, все образцы крови были взяты от людей, проживающих в России, а в нашей стране подавляющему большинству была введена вакцина БЦЖ, что может объяснить наличие у здоровых людей антител к GST-HspX и GST-TB10.4 (данные белки содержатся в БЦЖ).

В-четвертых, TB10.4 был обнаружен у около 70% больных туберкулезом, но также обнаруживался и у вакцинированных БЦЖ лиц (Skjot *et al.*, 2002, Skjot *et al.*, 2000). И даже вакцинация БЦЖ и отсутствие у БЦЖ геномной области RD-1 лишь позволяет утверждать, что многие люди инфицированы *M. tuberculosis*.

При статистическом анализе результатов эксперимента по изучению антигенных свойств гибридных белков *in vitro* и специфического взаимодействия с антителами к *M. tuberculosis* не было выявлено значимых различий в силе антительного ответа, Данный параметр измеряется как показатель оптической плотности между группами здоровых людей, а также людей имеющих латентную форму заболевания и ее активную форму туберкулеза. Полученные результаты могут быть объяснены недостаточным объемом выборки. В целом, обнаружение антител к антигенам *M. tuberculosis* не является перспективным диагностическим подходом из-за неоднозначности ответа на сам возбудитель (Lagrange P.H. *et al.*, 2006-2008; Kunnath-Velayudhan S, *et al.*, 2010).

Проведенные исследования антигенных свойств гибридных белков GST-ESAT-6, GST-TB10.4, GST-HspX и продукция цитокинов в ответ на стимуляцию ими, а также наличие антител к данным антигенам в сыворотках крови позволяет сделать вывод о специфичности полученных антигенов.

Таким образом, полученные гибридные белки могут быть использованы в качестве специфических индукторов при проведении иммунологических исследований, а также для дальнейшего изучения протективных свойств данных белков на моделях экспериментального туберкулеза в схеме «прайм-буст» иммунизации.

## 5. ВЫВОДЫ

1. Гибридные белки GST-ESAT-6, GST-HspX и GST-TB10.4 способны вызывать формирование пула цитокин-продуцирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, инфицированных *M. tuberculosis* мышей;
2. Гибридные белки GST-ESAT-6, GST-HspX и GST-TB10.4 *in vitro* индуцируют продукцию цитокинов IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$  Т-лимфоцитами спленоцитов, выделенных из селезенок мышей, инфицированных *M. tuberculosis*.
3. Выявлены различия в характере иммуногенности гибридных белков GST-ESAT-6, GST-HspX и GST-TB10.4. Стимуляция Т-клеток гибридными белками GST-ESAT-6 и GST-TB10.4 индуцируют продукцию преимущественно IFN $\gamma$ , тогда как гибридный белок GST-HspX приводит к формированию преимущественно TNF $\alpha$ -продуцирующих Т-лимфоцитов.
4. При детекции антител в сыворотках крови больных активной и латентной формой туберкулеза было показано, что гибридные белки GST-HspX, GST-TB 10.4 и GST-ESAT-6 специфически взаимодействуют с антителами к *M. tuberculosis*
5. Полученные гибридные белки могут быть использованы в качестве специфических индукторов при проведении иммунологических исследований, а также для дальнейшего изучения протективных свойств данных белков на моделях экспериментального туберкулеза.

## 6. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aagaard, C. *et al.* (2011) 'A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure', *Nature Medicine*, 17(2), pp. 189–194. doi: 10.1038/nm.2285.
2. Abel B, Tameris M, Mansoor N, Gelderbloem S, Hughes J, Abrahams D, Makhetha L, *et al.* The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(12):1407-17.
3. Arbues, A. *et al.* (2013) 'Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials', *Vaccine*, 31(42), pp. 4867–4873. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.051.
4. Barber, D. L. *et al.* (2011) 'CD4 T Cells Promote Rather than Control Tuberculosis in the Absence of PD-1-Mediated Inhibition', *The Journal of Immunology*, 186(3), pp. 1598–1607. doi: 10.4049/jimmunol.1003304.
5. Barry, C. E. *et al.* (2009) 'The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the goals of prophylaxis', *Nat Rev Microbiol*, 7(12), pp. 845–855. doi: 10.1038/nrmicro2236.
6. Behar, S. M., Divangahi, M. and Remold, H. G. (2011) 'Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? (NIH public access manuscript)', *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), pp. 668–674. doi: 10.1038/nrmicro2387.
7. Behr, M. A. *et al.* (1999) 'Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray.' *Science (New York, N.Y.)*, 284(5419), pp. 1520–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348738> (Accessed: 20 May 2018).
8. BERTANI G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62:293–300. doi: citeulike-article-id:149214
9. Bertholet, S. *et al.* (2010) 'A Defined Tuberculosis Vaccine Candidate Boosts BCG and Protects Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*', *Science Translational Medicine*, 2(53), p. 53ra74-53ra74. doi: 10.1126/scitranslmed.3001094.
10. Boehme, C. C. *et al.* (2011) 'Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: A multicentre implementation study', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 377(9776), pp. 1495–1505. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60438-8.
11. Boehme, C. and Nabeta, P. (2010) 'Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance', *England Journal of ...*, 363(11), pp. 1005–1015. doi: 10.1056/NEJMoa0907847.
12. van den Boogaard, J., Kibiki, G. S., Kisanga, E. R., Boeree, M. J., & Aarnoutse, R. E. (2009). New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in

- clinical development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 849–862.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00749-08>
13. Brandt, L. *et al.* (2002) ‘Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis.’ *Infection and immunity*, 70(2), pp. 672–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796598> (Accessed: 25 May 2018).
  14. Burnette WN (1981) ‘Western blotting’: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195–203
  15. Campbell, J. B. and Peerbaye, Y. A. (1992) ‘Saponin.’, *Research in immunology*, 143(5), pp. 526-30;discussion 577–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1439133> (Accessed: 19 May 2018).
  16. Chackerian, A. *et al.* (2002) ‘Dissemination of Mycobacterium tuberculosis Is Influenced by Host Factors and Precedes the Initiation of T-Cell Immunity Dissemination of Mycobacterium tuberculosis Is Influenced by Host Factors and Precedes the Initiation of T-Cell Immunity’, *Infection and immunity*, 70(8), pp. 4501–4509. doi: 10.1128/IAI.70.8.4501.
  17. Chelating H (1999) Rapid and efficient purification and refolding of a (His) 6 -tagged recombinant protein produced in *E. coli* as inclusion bodies. *Europe* 18–21
  18. Clark, F. (2016) ‘Gaps remain in Russia’s response to HIV/AIDS’, *Lancet (London, England)*. Elsevier Ltd, 388(10047), pp. 857–858. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31480-5.
  19. Corbett, E. L. and De Cock, K. M. (2010) ‘Tuberculosis in the HIV-positive patient.’ *British journal of hospital medicine*, 56(5), pp. 200–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879697> (Accessed: 19 May 2018).
  20. Delogu, G., Sali, M. and Fadda, G. (2013) ‘The biology of mycobacterium tuberculosis infection’, *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5(1). doi: 10.4084/mjhid.2013.070.
  21. Detjen, A. K. *et al.* (2015) ‘Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis’, *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(6), pp. 451–461. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00095-8.
  22. Dietrich, J. *et al.* (2005) ‘Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy.’ *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(10), pp. 6332–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879133> (Accessed: 19 May 2018).
  23. Dretzen G, Bellard M, Sassone-Corsi P, Chambon P (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal Biochem* 112:295–8

24. van Dissel, J. T. *et al.* (2010) 'Ag85B–ESAT-6 adjuvanted with IC31® promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in naïve human volunteers', *Vaccine*, 28(20), pp. 3571–3581. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.094.
25. van Dissel, J. T. *et al.* (2014) 'A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived Mycobacterium tuberculosis-specific T-cell responses in human', *Vaccine*, 32(52), pp. 7098–7107. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.036.
26. Dowdy, D. W., Basu, S. and Andrews, J. R. (2013) 'Is passive diagnosis enough? The impact of subclinical disease on diagnostic strategies for tuberculosis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(5), pp. 543–551. doi: 10.1164/rccm.201207-1217OC.
27. Dye, C. (2006) 'Essay Focus Global epidemiology of tuberculosis', *Lancet*, 367, pp. 938–940. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68384-0.
28. Esmail, H. *et al.* (2014) 'The ongoing challenge of latent tuberculosis', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1645), pp. 20130437–20130437. doi: 10.1098/rstb.2013.0437.
29. Esmail, H. *et al.* (2017) 'Europe PMC Funders Group Characterization of progressive HIV-associated tuberculosis using 2-deoxy-2- [ 18 F ] fluoro-D-glucose positron emission and computed tomography', 22(10), pp. 1090–1093. doi: 10.1038/nm.4161.Characterization.
30. Farhat, M. *et al.* (2006) 'False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria?', *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 10(11), pp. 1192–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17131776> (Accessed: 20 May 2018).
31. Ferguson, J. S. *et al.* (1999) 'Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages.' *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(1), pp. 312–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384130> (Accessed: 20 May 2018).
32. Garçon, N., Chomez, P. and Van Mechelen, M. (2007) 'GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives', *Expert Review of Vaccines*, 6(5), pp. 723–739. doi: 10.1586/14760584.6.5.723.
33. Getahun, H. *et al.* (2007) 'Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes', *Lancet*, 369(9578), pp. 2042–2049. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60284-0.
34. Goonetilleke, N. P. *et al.* (2003) 'Enhanced immunogenicity and protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis of bacille Calmette-Guérin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara.',



*Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(3), pp. 1602–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874255> (Accessed: 19 May 2018).

35. Harper, S., & Speicher, D. W. (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 681, 259–280. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_14)
36. Havlir, D. V *et al.* (2008) ‘Opportunities and challenges for HIV care in overlapping HIV and TB epidemics’, *Jama*, 300(4), pp. 423–430.
37. Healthcare GE, Sciences L (1994) High-throughput Process Development with PreDictor Plates Handbooks from GE Healthcare GST Gene Fusion System. *J Mol Biol* 238:815–832. doi: 10.1007/s10529-008-9909-9
38. Hoa, N. B. *et al.* (2010) ‘National survey of tuberculosis prevalence in Viet Nam’, *Bulletin of the World Health Organization*, 88(4), pp. 273–280. doi: 10.2471/BLT.09.067801.
39. Hofsteenge J, Vincentini a, Stone SR (1991) Purification and characterization of truncated ribonuclease inhibitor. *Biochem J* 275 ( Pt 2:541–3. doi: 10.1042/bj2750541
40. Hoffmann, C. *et al.* (2008) ‘Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), pp. 3963–3967. doi: 10.1073/pnas.0709530105.
41. Houben, D. *et al.* (2012) ‘ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria’, *Cellular Microbiology*, 14(8), pp. 1287–1298. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01799.x.
42. Hussain, T. *et al.* (2007) ‘Seroprevalence of HIV infection among paediatric tuberculosis patients in Agra, India: A hospital-based study’, *Tuberculosis*, 87(1), pp. 7–11. doi: 10.1016/j.tube.2006.01.001.
43. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P
44. Kaufmann, S. H. Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. *Immunity*. 2010;33(4):567-77.
45. Kaufmann, S. H. *et al.* (2014) ‘The BCG replacement vaccine VPM1002: from drawing board to clinical trial’, *Expert Review of Vaccines*. Taylor & Francis, 13(5), pp. 619–630. doi: 10.1586/14760584.2014.905746.
46. Kaufmann, S. H. and Dorhoi, A. (2016) ‘Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions’, *Immunity*. Elsevier Inc., 44(3), pp. 476–491. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.014.
47. Kik, S. V. *et al.* (2014) ‘Replacing smear microscopy for the diagnosis of tuberculosis: what is the market potential?’ *European Respiratory Journal*, 43(6), pp. 1793–1796. doi: 10.1183/09031936.00217313.

48. Kunnath-Velayudhan S, Salamon H, Wang HY, et al. Dynamic antibody responses to the Mycobacterium tuberculosis proteome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107: 14703-8
49. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. doi: 10.1038/227680a0
50. Lagrange PH, Thangaraj SK, Dayal R, et al. A toolbox for tuberculosis (TB) diagnosis: an Indian multi-centric study (2006-2008); evaluation of serological assays based on PGL-Tb1 and ESAT-6/CFP10 antigens for TB diagnosis. *PLoS One* 2014;9:e96367
51. Lazar-Molnar, E. et al. (2010) 'Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30), pp. 13402–13407. doi: 10.1073/pnas.1007394107.
52. Lin, P. L. et al. (2012) 'The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent Mycobacterium tuberculosis infection', *Journal of Clinical Investigation*, 122(1), pp. 303–314. doi: 10.1172/JCI46252.
53. Manca, C. et al. (2001) 'Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- $\gamma$ ', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), pp. 5752–5757. doi: 10.1073/pnas.091096998.
54. Manzanillo, P. S. et al. (2012) 'Mycobacterium Tuberculosis Activates the DNA-Dependent Cytosolic Surveillance Pathway within Macrophages', *Cell Host & Microbe*, 11(5), pp. 469–480. doi: 10.1016/j.chom.2012.03.007.
55. Mayer-Barber, K. D. et al. (2014) 'Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk', *Nature*, 511(7507), pp. 99–103. doi: 10.1038/nature13489.
56. McShane, H. et al. (2005) 'Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials', *Tuberculosis*, 85(1–2), pp. 47–52. doi: 10.1016/j.tube.2004.09.015.
57. McShane, H. (2009) 'Vaccine strategies against tuberculosis.' *Swiss medical weekly*, 139(11–12), pp. 156–60. doi: smw-12374.
58. Miller EM, Nickoloff JA (1995) Escherichia coli Electrotransformation. In: Electroporation Protocols for Microorganisms. Humana Press, New Jersey, pp 105–114
59. Nagelkerke, N. J. D. et al. (2006) 'The search for a tuberculosis vaccine: An elusive quest?', *Tuberculosis*, 86(1), pp. 41–46. doi: 10.1016/j.tube.2005.06.001.
60. Orme, I. M. (2010) 'The Achilles heel of BCG', *Tuberculosis*. Elsevier Ltd, 90(6), pp. 329–332. doi: 10.1016/j.tube.2010.06.002.
61. Orme, I. M. (2015) 'NIH Public Access', 94(1), pp. 1–16. doi: 10.1016/j.tube.2013.07.004.A.

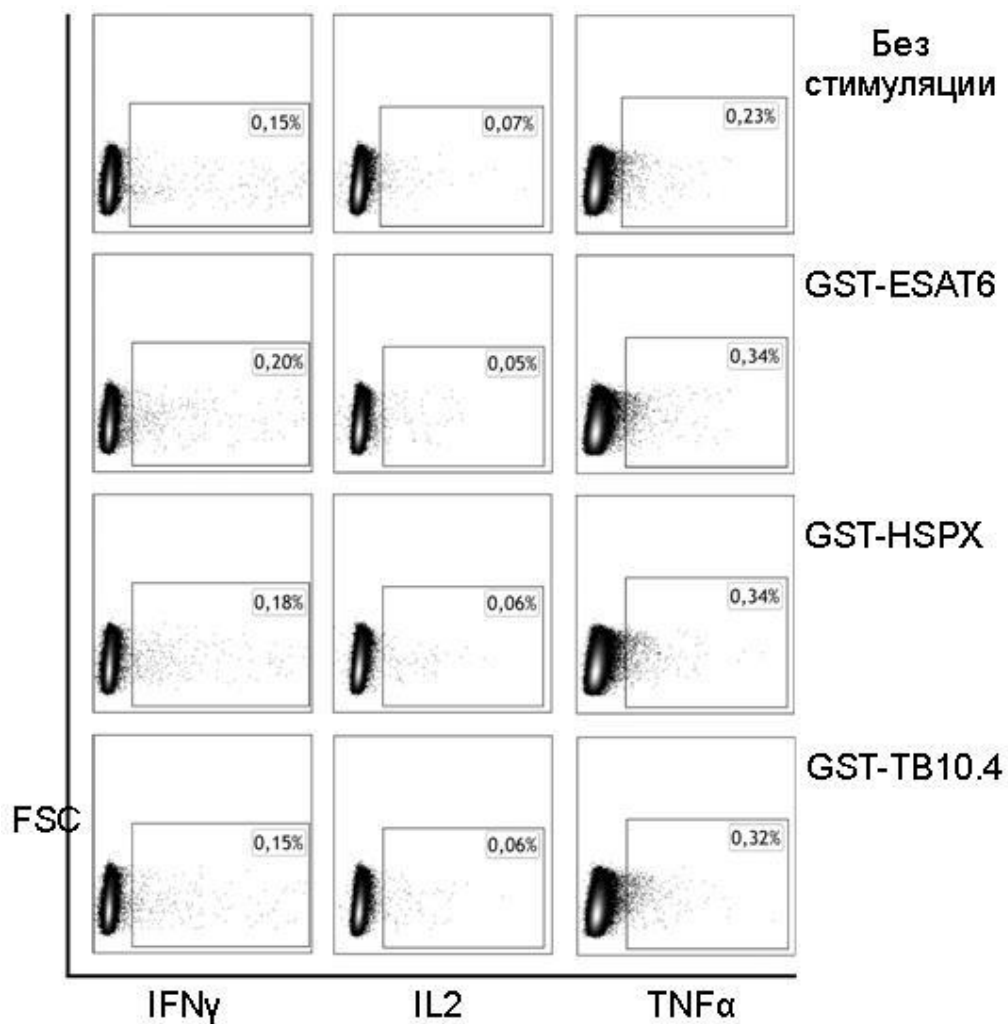
62. Pai, M., Denkinger, C. M., *et al.* (2014) 'Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection.' *Clinical microbiology reviews*. American Society for Microbiology (ASM), 27(1), pp. 3–20. doi: 10.1128/CMR.00034-13.
63. Pai, M., Riley, L. W. and Colford, J. M. (2004) 'Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: A systematic review', *Lancet Infectious Diseases*, 4(12), pp. 761–766. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01206-X.
64. Pai, M. and Sotgiu, G. (2016) 'Diagnostics for latent TB infection: Incremental, not transformative progresses', *European Respiratory Journal*, 47(3), pp. 704–706. doi: 10.1183/13993003.01910-2015.
65. Palmer I, Wingfield PT (2004) Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli. *Curr Protoc protein Sci* Chapter 6:Unit 6.3. doi: 10.1002/0471140864.ps0603s38
66. Pala P., Hussell T., Openshaw P.J. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods*. 2000; 243 (1-2):107-24.
67. Pande, T. *et al.* (2015) 'Use of chest radiography in the 22 highest tuberculosis burden countries', *European Respiratory Journal*, 46(6), pp. 1816–1819. doi: 10.1183/13993003.01064-2015.
68. Pandey, A. K. *et al.* (2009) 'Nod2, Rip2 and Irf5 play a critical role in the type I interferon response to Mycobacterium tuberculosis', *PLoS Pathogens*, 5(7). doi: 10.1371/journal.ppat.1000500.
69. Prezzemolo T, Guggino G, La Manna MP, Di Liberto D, Dieli F, Caccamo N. Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol*. 2014; 5:180.
70. Russell, D. G. (2011) 'Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection', *Immunological Reviews*, 240(1), pp. 252–268. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00984.x.
71. Russell, D. G. (2016) 'The ins and outs of the Mycobacterium tuberculosis -containing vacuole', *Cellular Microbiology*, 18(8), pp. 1065–1069. doi: 10.1111/cmi.12623.
72. Russell, D. G., Barry, C. E. and Flynn, J. L. (2010) 'NIH Public Access', *Russell The Journal Of The Bertrand Russell Archives*, 328(5980), pp. 852–856. doi: 10.1126/science.1184784.Tuberculosis.
73. Samstein, M. *et al.* (2013) 'Essential yet limited role for CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes during Mycobacterium tuberculosis -specific T cell priming', *eLife*, 2, pp. 1–10. doi: 10.7554/eLife.01086.
74. Sester, M. *et al.* (2011) 'Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis', *European Respiratory Journal*, 37(1), pp. 100–111. doi: 10.1183/09031936.00114810.

75. Simeone, R. *et al.* (2016) 'Perspectives on mycobacterial vacuole-to-cytosol translocation: the importance of cytosolic accesses, *Cellular Microbiology*, 18(8), pp. 1070–1077. doi: 10.1111/cmi.12622.
76. Skeiky, Y. A. W. *et al.* (2004) 'Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein.' *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(12), pp. 7618–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187142> (Accessed: 19 May 2018).
77. Skjöt, R. L. *et al.* (2000) 'Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens.', *Infection and immunity*, 68(1), pp. 214–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603390> (Accessed: 19 May 2018).
78. Skjöt, R. L. V. *et al.* (2002) 'Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family.' *Infection and immunity*, 70(10), pp. 5446–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228269> (Accessed: 19 May 2018).
79. Sonnenberg, P. *et al.* (2005) 'How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners.' *Aids*, 19(2), pp. 150–8. doi: 10.1086/426827.
80. Stanley, S. A. *et al.* (2007) 'The Type I IFN Response to Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Requires ESX-1-Mediated Secretion and Contributes to Pathogenesis', *The Journal of Immunology*, 178(5), pp. 3143–3152. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.3143.
81. Steingart, K. R. *et al.* (2013) 'Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults', in Steingart, K. R. (ed.) *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. CD009593. doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub2.
82. Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41:207–234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016
83. Stukova M, Khairullin B, Bekembaeva G, Erofeeva M and Shurygina AP, Pisareva M, Buzitskaya J, Grudin M, Kassenov M, Sandybaev N, Nurpeisova A, Sarsenbaeva G, Bogdanov N, Volgin E, Isagulov T, Kudryavstev I, Egorov A, Abildaev T, K. O. (2015) 'Randomized double-blind placebo-controlled phase 1 trial of intranasal TB/FLU-04L tuberculosis vaccine in BCG vaccinated healthy adults aged 18-50 years. Poster presentation', *TB Vaccines 4th Global Forum*, p. 1.
84. Thakur A, Pedersen LE, Jungersen G. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine*. 2012; 30(33):4907-20.
85. Velmurugan, K. *et al.* (2013) 'Nonclinical Development of BCG Replacement Vaccine Candidates', *Vaccines*, 1(2), pp. 120–138. doi: 10.3390/vaccines1020120.

86. Vynnycky, E. and Fine, P. E. M. (1997) 'The natural history of tuberculosis: The implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection', *Epidemiology and Infection*, 119(2), pp. 183–201. doi: 10.1017/S0950268897007917.
87. Watford, W. T. *et al.* (2001) 'Surfactant Protein A Regulates Complement Activation', *The Journal of Immunology*, 167(11), pp. 6593–6600. doi: 10.4049/jimmunol.167.11.6593.
88. van der Wel, N. *et al.* (2007) 'M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells', *Cell*, 129(7), pp. 1287–1298. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.059.
89. WHO (2013) 'Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children: Policy update', *World Health Organisation*, pp. 1–79. doi: ISBN 978 92 4 150633 5.
90. WHO (2017) *Global Tuberculosis Report 2017*, *Who*. doi: WHO/HTM/TB/2017.23.
91. Wolf, A. J. *et al.* (2008) 'Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs', *The Journal of Experimental Medicine*, 205(1), pp. 105–115. doi: 10.1084/jem.20071367.
92. Won D II, Park JR (2009) Flow cytometric measurements of TB-specific T cells comparing with QuantiFERON-TB gold. *Cytom Part B Clin Cytom* 9999B: NA-NA. doi: 10.1002/cyto.b.20503
93. Woodworth JS, Shin D, Volman M, Nunes-Alves C, Fortune SM, Behar SM. *Mycobacterium tuberculosis* directs immunofocusing of CD8+ T cell responses despite vaccination. *The Journal of Immunology*. 2011;186(3):1627-37.
94. Zuber, B. *et al.* (2008) 'Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state.' *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 190(16), pp. 5672–80. doi: 10.1128/JB.01919-07.
95. Бородулина Е., Амосова Е., Бородулин Б., Г. М. (2010) 'Voprosy Sovremennoj Pediatrii., *Вопросы современной педиатрии.*, p. 9(1):70-74Во. Available at: <http://vsp.spr-journal.ru/jour/article/view/830> (Accessed: 25 May 2018).
96. Сергеева М., Пулькина А., Васильев К., Романовская-Романько Е., Комиссаров А., Кучур О., Егоров А., Цыбалова Л. СМ (2017) Безопасность и иммуногенность холодаадаптированного гриппозного вектора, экспрессирующего антигены ESAT-6 и Ag85A *M. tuberculosis*. *Вопросы вирусологии* 266–272. doi: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-266-272>

## 7. ПРИЛОЖЕНИЯ

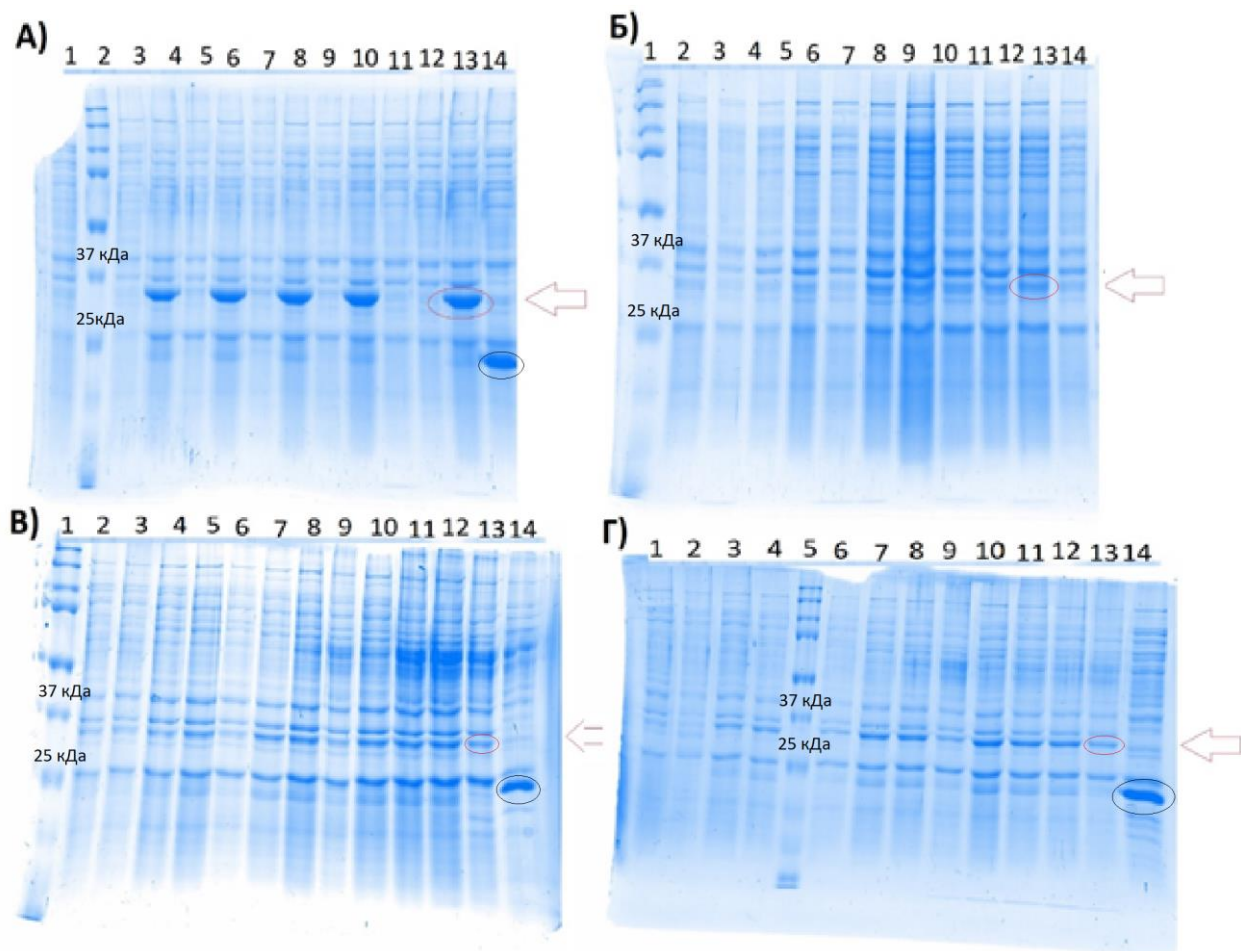
### Приложение А



Доля цитокин-продуцирующих клеток от общего количества живых спленоцитов при стимуляции здоровых мышей гибридными белками.

GST-ESAT-6, GST-HspX, GST-TB10.4 – гибридные белки, FSC – прямое светорассеяние.

## Приложение Б



### Электрофореграммы разных фракций лизата клеток штамма-продуцента гибридного белка GST-ESAT-6.

В описании указывается: номер дорожки, время культивирования в часах (ч.), фаза лизата клеток (**Р**-растворимая\нерастворимая-**Н**).

Standards dual xtra (Bio-Rad) – маркер молекулярного веса;

Целевой белок (обведен красным кругом); Стрелками указано примерное расположение целевого белка GST-ESAT-6 в геле.

Свободная глутатион-S-трансфераза (обведена черным кругом);

А) Культивирование в ZYM-5052 при температуре 37°C

1) 2ч, **Н**; 2) Standards dual xtra; 3) 3ч, **Н**; 4) 4ч, **Н**; 5) 4ч, **Р**; 6) 5ч, **Н**; 7) 5ч, **Р**; 8) 6ч, **Н**; 9) 6ч, **Р**; 10) 7ч, **Н**; 11) 7ч, **Р**; 12) 8ч, **Н**; 13) 8ч, **Р**; 14) pGex4T1 (отрицательный контроль – 8 часов).

Б) Культивирование в ZYM-5052 при температуре 20°C

1) Standards dual xtra; 2) 2ч, **Н**; 3) 3ч, **Н**; 4) 4ч, **Н**; 5) 5ч, **Н**; 6) 6ч, **Н**; 7) 7ч, **Н**; 8) 8ч, **Н**; 9) 9ч, **Н**; 10) 10ч, **Н**; 11) 10ч, **Р**; 12) 11ч, **Н**; 13) 12ч, **Н**; 14) 12ч, **Р**;

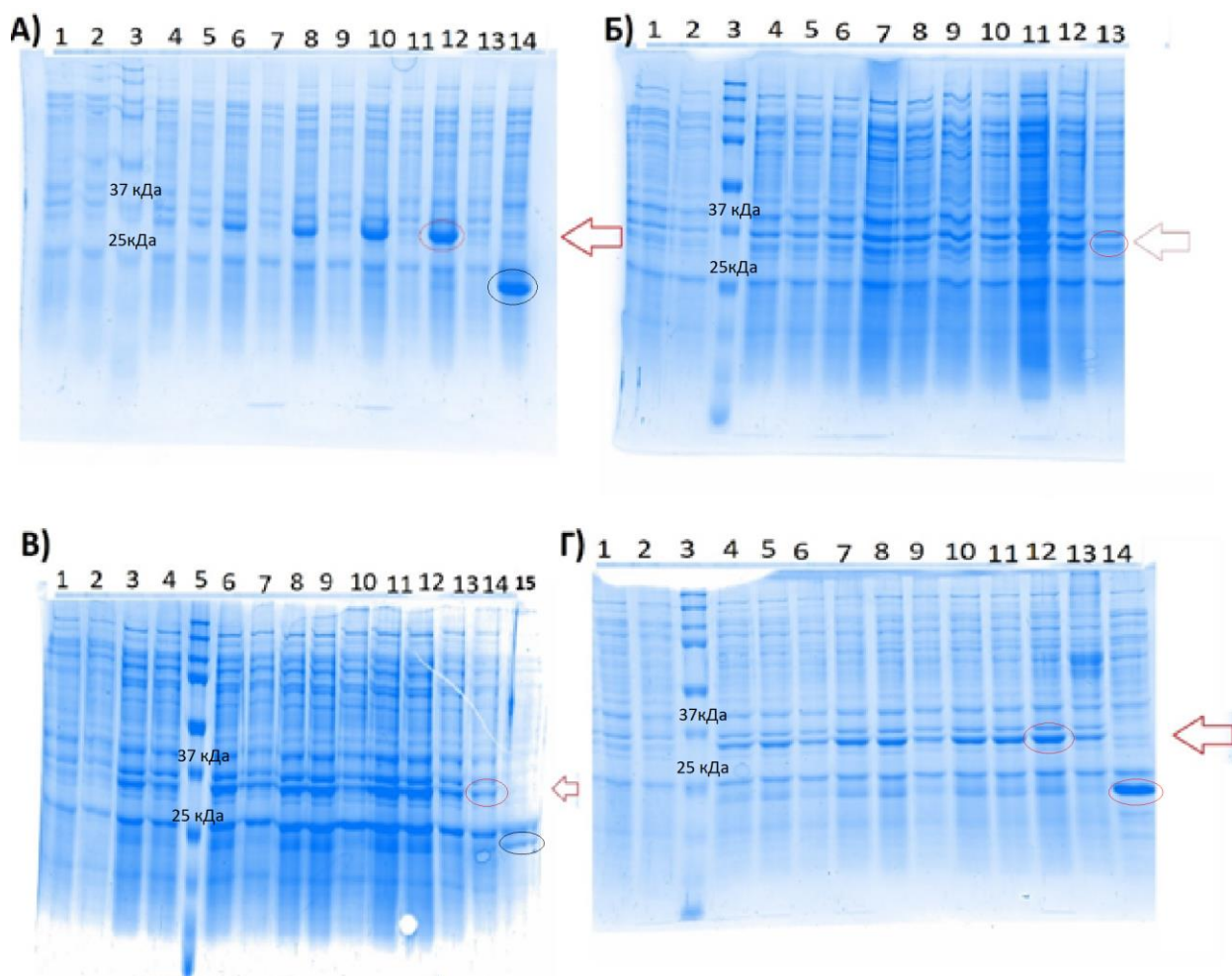
В) Культивирование в 2xYT при температуре 20 °C, при добавлении IPTG до 0,5 mM

1) Standards dual xtra; 2) 4ч, **Н**; 3) 5ч, **Н**; 4) 6ч, **Н**; 5) 7ч, **Н**; 6) 7ч, **Р**; 7) 8ч, **Н**; 8) 9ч, **Н**; 9) 9ч, **Р**; 10) 10ч, **Н**; 11) 11ч, **Н**; 12) 12ч, **Н**; 13) 12ч, **Р**; 14) pGex4T1 (отрицательный контроль – 12 часов).

Г) Культивирование в 2xYT при температуре 20 °C, при добавлении IPTG до 0,1 mM

1) 3ч, **Н**; 2) 4ч, **Н**; 3) 5ч, **Н**; 4) 6ч, **Н**; 5) Standards dual xtra; 6) 7ч, **Р**; 7) 8ч, **Н**; 8) 9ч, **Н**; 9) 9ч, **Р**; 10) 10ч, **Н**; 11) 11ч, **Н**; 12) 12ч, **Н**; 13) 12ч, **Р**; 14) pGex4T1 (отрицательный контроль – 12 часов).

## Приложение В



**Электрофореграмма разных фракций лизата клеток штамма-продуцента гибридного белка GST-TB10.4.**

В описании указывается: номер дорожки, время культивирования в часах (ч.), фаза лизата клеток (**Р**-растворимая\нерастворимая-**Н**).

Standards dual xtra (Bio-Rad) – маркер молекулярного веса;

Целевой белок (обведен красным кругом); Стрелками указано примерное расположение целевого белка GST-TB10.4 в геле.

Свободная глутатион-S-трансфераза (обведена черным кругом);

А) Культивирование в ZYM-5052 при температуре 37°C

1) 2ч, **Н**; 2) 3ч, **Н**; 3) Standards dual xtra; 4) 4ч, **Н**; 5) 4ч, **Р**; 6) 5ч, **Н**; 7) 5ч, **Р**; 8) 6ч, **Н**; 9) 6ч, **Р**; 10) 7ч, **Н**; 11) 7ч, **Р**; 12) 8ч, **Н**; 13) 8ч, **Р**; 14) pGex4T1 (отрицательный контроль – 8 часов).

Б) Культивирование в ZYM-5052 при температуре 20°C

1) 2ч, **Н**; 2) 3ч, **Н**; 3) Standards dual xtra; 4) 5ч, **Н**; 5) 6ч, **Н**; 6) 7ч, **Н**; 7) 8ч, **Н**; 8) 9ч, **Н**; 9) 10ч, **Н**; 10) 10ч, **Р**; 11) 11ч, **Н**; 12) 12ч, **Н**; 13) 12ч, **Р**;

В) Культивирование в 2xYT при температуре 20 °С, при добавлении IPTG до 0,5 мМ

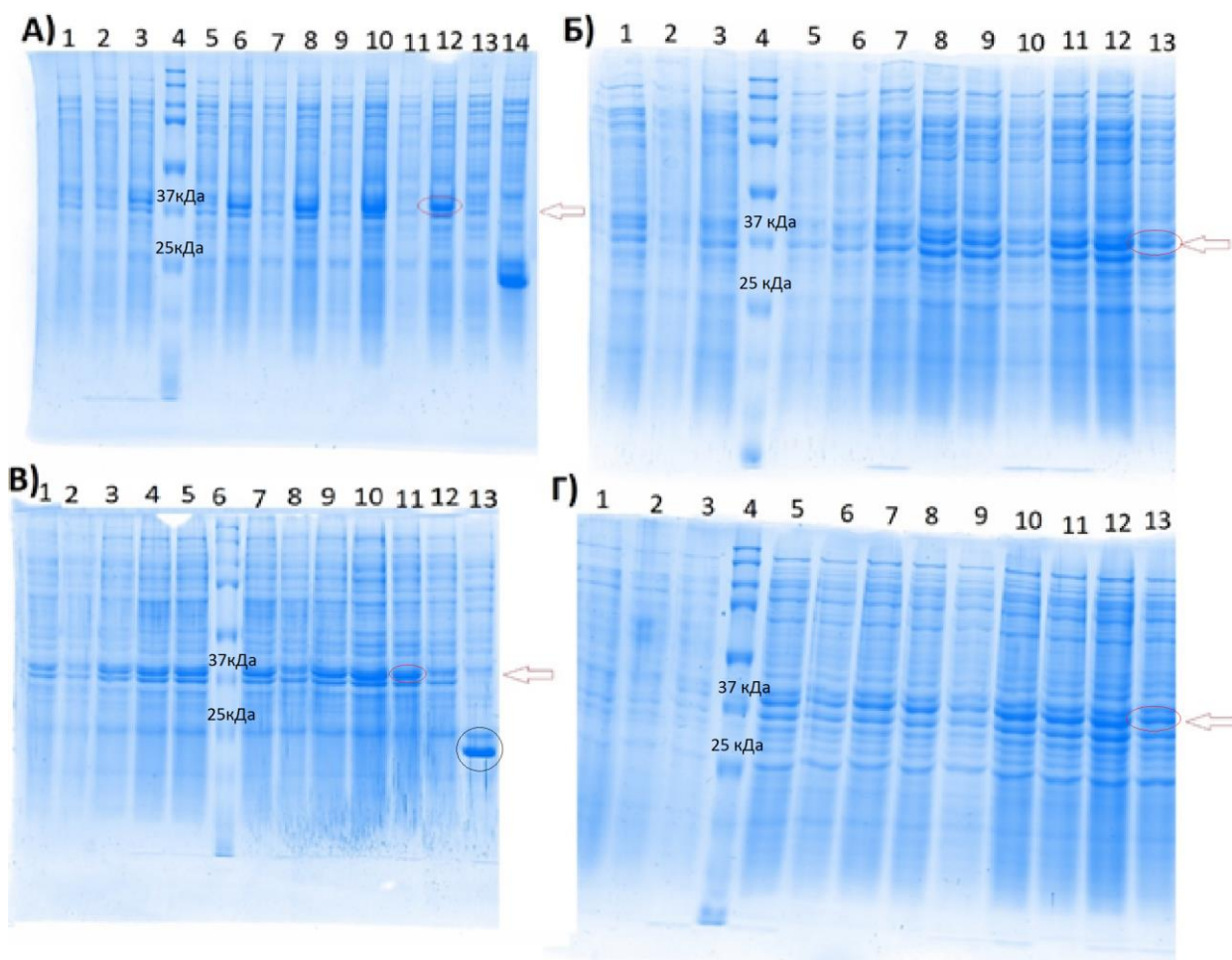
1) 4ч, **Н**; 2) 5ч, **Н**; 3) 6ч, **Н**; 4) 7ч, **Н**; 5) Standards dual xtra; 6) 7ч, **Н**; 7) 7ч, **Р** 8) 9ч, **Н** 9) 9ч, **Н**; 10) 9ч, **Р**; 11) 10ч, **Н** 12) 11ч, **Н** 13) 12ч, **Н**; 14) 12ч, **Р** 15) pGex4T1 (отрицательный контроль – 12 часов).

Г) Культивирование в 2xYT при температуре 20 °С, при добавлении IPTG до 0,1 мМ

1) 3ч, **Н** 2) 4ч, **Н**; 3) Standards dual xtra; 4) 5ч, **Н**; 5) 6ч, **Н**; 6) 6ч, **Р** 7) 7ч, **Н** 8) 8ч, **Н** 9) 8ч, **Р** 10) 10ч, **Н** 11) 11ч, **Н** 1



## Приложение Г



### Электрофореграмма разных фракций лизата клеток штамма-продуцента гибридного белка GST-HspX.

В описании указывается: номер дорожки, время культивирования в часах (ч.), фаза лизата клеток (P-растворимая\нерастворимая-H).

Standards dual xtra (Bio-Rad) – маркер молекулярного веса;

Целевой белок (обведен красным кругом); Стрелками указано примерное расположение целевого белка GST-HspX в геле.

Свободная глутатион-S-трансфераза (обведена черным кругом);

А) Культивирование в ZYM-5052 при температуре 37°C

1) 2ч, H; 2) 3ч, H; 3) 4ч, H; 4) Standards dual xtra; 5) 4ч, P; 6) 5ч, H; 7) 5ч, P; 8) 6ч, H; 9) 6ч, P; 10) 7ч, H; 11) 7ч, P; 12) 8ч, H; 13) 8ч, P; 14) pGex4T1 (отрицательный контроль – 8 часов).

Б) Культивирование в ZYM-5052 при температуре 20°C

1) 2ч, H; 2) 3ч, H; 3) 5ч, H; 4) Standards dual xtra; 5) 6ч, H; 6) 7ч, H; 7) 8ч, H; 8) 9ч, H; 9) 10ч, H; 10) 10ч, P; 11) 11ч, H; 12) 12ч, H; 13) 12ч, P.

В) Культивирование в 2xYT при температуре 20 °C, при добавлении IPTG до 0,5 mM

1) 4ч, H; 2) 5ч, H; 3) 6ч, H; 4) 7ч, H; 5) Standards dual xtra; 6) 7ч, H; 7) 7ч, P; 8) 9ч, H; 9) 9ч, H; 10) 9ч, P; 11) 10ч, H; 12) 11ч, H; 13) pGex4T1 (отрицательный контроль – 12 часов).

Г) Культивирование в 2xYT при температуре 20 °C, при добавлении IPTG до 0,1 mM

1) 3ч, H; 2) 4ч, H; 3) Standards dual xtra; 4) 5ч, H; 5) 6ч, H; 6) 6ч, P; 7) 7ч, H; 8) 8ч, H; 9) 8ч, P; 10) 10ч, H; 11) 11ч, H; 12) 12ч, H; 13) 12ч, P.