

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ
ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ "ВЕКТОР"

На правах рукописи

Серёгин Сергей Викторович

**Оптимизация конструкций рекомбинантных ДНК для
получения иммунобиологических препаратов**

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук
Бажан Сергей Иванович

Кольцово – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	8
2 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	10
2.1 Актуальность исследования	10
2.2 Цели и задачи исследования	12
2.3 Научная новизна и практическая ценность работы	13
2.4 Положения, выносимые на защиту	15
2.5 Апробация работы	16
2.6 Вклад автора	18
2.7 Структура и объем диссертации	19
2.8 Благодарности	19
3 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
3.1 Методы генетической инженерии в получении рекомбинантных белков, предназначенных для создания новых иммунобиологических препаратов	21
3.1.1 Краткая характеристика генетической инженерии. Исторический экскурс	21
3.1.2 Экспрессионные системы	22
3.1.3 Методы получения целевых генов для их клонирования и экспрессии, конструирование рекомбинантных ДНК	28
3.1.4 Методы введения молекул рекомбинантных ДНК в клетки	41
3.1.5 Лабораторные штаммы <i>E. coli</i> , используемые в генетической инженерии	43
3.1.6 Клонирование векторных плазмид	49
3.1.7 Особенности экспрессионных векторных плазмид	55
3.2 Перспективы вакцинологии – применение ДНК-вакцин	71
3.2.1 Основные принципы конструирования ДНК-вакцин и механизм их действия	71
3.2.2 Проблемы создания эффективных вакцин против ВИЧ/СПИД	77
3.2.3 Конструирование искусственных ген-эквивалентов, кодирующих полиэпитопные ВИЧ-иммуногены, как основа создания эффективных ДНК-вакцин	85
3.2.4 Методы оптимизации полиэпитопных иммуногенов с целью повышения стимуляции СТЛ	98
3.2.5 Современные достижения в области разработки и применения ДНК-вакцин	105

4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	108
4.1 Материалы	108
4.1.1 Реактивы	108
4.1.2 Наборы реактивов	109
4.1.3 Ферменты	109
4.1.4 Антибиотики	110
4.1.5 Олигодезоксирибонуклеотиды	110
4.1.6 Буферные растворы	110
4.1.7 Растворы для трансформации клеток <i>E. coli</i>	111
4.1.8 Растворы для выделения плазмидной ДНК	111
4.1.9 Растворы для гибридизации ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах	112
4.1.10 Питательные среды	112
4.1.11 Плазмиды и векторы	113
4.1.12 Бактериальные штаммы	114
4.2 Методы	115
4.2.1 Общие методы исследования	115
4.2.1.1 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	115
4.2.1.2 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	115
4.2.1.3 Выделение плазмидной ДНК	116
4.2.1.4 Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции	117
4.2.1.5 Введение радиоактивной метки ^{32}P по «липким» концам молекул ДНК	117
4.2.1.6 Фосфорилирование фрагментов ДНК. Введение радиоактивной метки ^{32}P с помощью T4-полинуклеотидкиназы	118
4.2.1.7 Лигирование	118
4.2.1.8 Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот в ПААГ и агарозном геле	119
4.2.1.9 Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля	119
4.2.1.10 Элюция фрагментов ДНК из ПААГ	119
4.2.1.11 Гибридизация ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах	120
4.2.1.12 Иммуноблоттинг	121
4.2.1.13 Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК	122
4.2.1.14 Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей	122

4.2.2 Частные методики исследования	123
4.2.2.1 Получение рекомбинантной плазмиды pIL2m	123
4.2.2.2 Получение рекомбинантной плазмиды pIL4s	123
4.2.2.3 Конструирование рекомбинантной плазмиды pFHAs10, кодирующей А-субъединицу токсина шигеллы	124
4.2.2.4 Реконструкция плазмиды pIL2 с получением целевой плазмиды pIL2d	125
4.2.2.5 Получение плазмиды pRIL3	125
4.2.2.6 Получение плазмид pRIL2m и pRIL2s	125
4.2.2.7 Получение плазмид pRILA4 и pRAIL3, направляющих синтез химерных белков ILA и AIL	126
4.2.2.8 Реконструкция плазмид pRIL3, pRIL18, pRILA4, pRAIL3 и сравнительный анализ уровней синтеза целевых рекомбинантных белков	127
4.2.2.9 Получение экспрессионной плазмиды pRTU1	127
4.2.2.10 Получение рекомбинантных плазмид pRIRinT и pRIRgT	128
4.2.2.11 Синтез и экспрессия гена аналога человеческого анафилатоксина C5a	128
4.2.2.12 Экспрессия гена ангиогенина	130
4.2.2.13 Синтез искусственного гена TCI	130
4.2.2.14 Конструирование рекомбинантной плазмиды pFH-TCI	134
4.2.2.15 Получение плазмид pET-TCI и pGEX-TCI	135
4.2.2.16 Получение плазмид pBK-RSV-TCI и pcDNA-TCI	136
4.2.2.17 Конструирование экспрессионных векторных плазмид pV1, pV2 и pV3	137
4.2.2.18 Сборка генетических конструкций C1, C2, C3 и их клонирование в векторах pV1, pV2 и pV3	138
4.2.2.19 Получение рекомбинантных плазмид, направляющих синтез белков вируса ККГЛ	139
4.2.2.20 Методика индикации генетического материала вируса ККГЛ в образцах методом ОТ-ПЦР	139
5 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	142
5.1 Конструирование рекомбинантных плазмид, обеспечивающих экспрессию гена интерлейкина-2 (IL-2) человека и его мутантных аналогов в клетках <i>Escherichia coli</i>	142
5.1.1 Краткая характеристика IL-2 человека	142
5.1.2 Получение мутантных генов IL-2 человека	143
5.1.3 Экспрессия гена IL-2 человека и его мутантных аналогов в клетках <i>E. coli</i>	148

5.2 Конструирование рекомбинантных плазмид, обеспечивающих синтез в клетках <i>Escherichia coli</i> химерных белков, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы	156
5.2.1 Краткая характеристика химеротоксинов, содержащих IL-2	156
5.2.2 Реконструкция генов IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы с целью получения генов химеротоксинов ILA и AIL	158
5.2.3 Конструирование и экспрессия генов ILA и AIL, кодирующих химерные белки, состоящие из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы	161
5.3 Синтез, клонирование и экспрессия в клетках <i>Escherichia coli</i> гена аналога анафилатоксина C5a человека	169
5.3.1 Краткая характеристика человеческого анафилатоксина C5a	169
5.3.2 Химико-ферментативный синтез и клонирование гена аналога человеческого анафилатоксина C5a	170
5.3.3 Экспрессия гена аналога человеческого анафилатоксина C5a	170
5.4 Конструирование и проверка экспрессионной векторной плазмиды pRTU1	174
5.4.1 Получение экспрессионной векторной плазмиды pRTU1	174
5.4.2 Проверка экспрессионной векторной плазмиды pRTU1	175
5.5 Получение белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору γ-интерферона человека, в клетках <i>Escherichia coli</i>	177
5.5.1 Краткая характеристика белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору γ -интерферона человека	177
5.5.2 Получение белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору γ -интерферона человека, в клетках <i>E. coli</i> с помощью экспрессионной плазмиды pRTU1	178
5.6 Экспрессия синтетического гена ангиогенина человека в клетках <i>Escherichia coli</i> с использованием векторной плазмиды pRTU1	182
5.6.1 Краткая характеристика ангиогенина	182
5.6.2 Эффективная экспрессия гена ангиогенина человека в клетках <i>E. coli</i>	182
5.7 Конструирование рекомбинантных плазмид pBK-RSV-TCl и pсDNA-TCl, содержащих искусственный ген TCl, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, как кандидатных ДНК-вакцин	186
5.7.1 Общая характеристика искусственного иммуногена TCl	186

5.7.2	Получение искусственного гена TCI, кодирующего множественные СТЛ-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1	187
5.7.3	Получение белка TCI в рекомбинантном виде и доказательство его иммунохимической, иммуногенной и антигенной специфичности	195
5.7.4	Клонирование гена TCI в векторных плаزمидах, обеспечивающих его экспрессию в эукариотических клетках: получение плазмид pBK-RSV-TCI и pcDNA-TCI	197
5.8	Создание генетических конструкций с оптимизированной структурой генов полиэпитопных иммуногенов для высокоэффективной индукции СТЛ-ответов	201
5.8.1	Общий дизайн полиэпитопных иммуногенов. Краткая характеристика	201
5.8.2	Общий дизайн, стратегия клонирования и кодирования рекомбинантных плазмид, направляющих синтез полиэпитопных СТЛ-иммуногенов	203
5.8.3	Схемы конструирования экспрессионных векторных плазмид pV1, pV2 и pV3, предназначенных для клонирования полиэпитопных СТЛ-иммуногенов	208
5.8.4	Синтез и клонирование генов полиэпитопных СТЛ-иммуногенов в экспрессионных векторных плаزمидах pV1, pV2 и pV3	212
5.9	Разработка различных методов диагностики и подходов к вакцинопрофилактике Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ)	219
5.9.1	Краткая характеристика ККГЛ	219
5.9.2	Методы и проблемы диагностики ККГЛ	221
5.9.3	Получение белков вируса ККГЛ в рекомбинантном виде и исследование их антигенных свойств	222
5.9.4	Разработка диагностической тест-системы для выявления РНК вируса ККГЛ в биологических образцах методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)	229
5.9.5	Дифференциация геновариантов вируса ККГЛ путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), полученных в результате ОТ-ПЦР	233
5.9.6	Разработка подходов к вакцинопрофилактике ККГЛ: конструирование рекомбинантных плазмид в качестве кандидатных ДНК-вакцин против ККГЛ	238
6	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	248
7	ВЫВОДЫ	251

8 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	253
8.1 Работы, опубликованные в научных журналах, рекомендованных ВАК	253
8.2 Патенты	258
8.3 Работы, опубликованные в сборниках научных трудов, материалах конференций и других изданиях	259
9 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	266

1 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а/к – аминокислота (аминокислотный остаток)
- АПК – антиген-презентирующие клетки
- БАВ – биологически активные вещества
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека 1 типа
- ВИЧ-2 – вирус иммунодефицита человека 2 типа
- ВНО – вирус натуральной оспы
- ВОВ – вирус осповакцины
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГМО – генетически модифицированный организм
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактозид
- ИФА – иммуноферментный анализ
- кДа – килодальтон
- ККГЛ – Крымская-Конго геморрагическая лихорадка
- МЕ – международные единицы
- МКА – моноклональные антитела
- ОРТ – открытая рамка трансляции
- ОТ – обратная транскрипция
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- п.н. – пар нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
- РСК – реакция связывания комплемента
- СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
- т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- АИ – химерный белок, состоящий из цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы и интерлейкина-2 человека
- сАМР – цикло-аденозинмонофосфат
- САР – катаболитный белок-активатор

CMV – цитомегаловирус
CTL – цитотоксические Т-лимфоциты
dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
ER – эндоплазматический ретикулум (сеть)
GST – глутатион-S-трансфераза
HA – гемагглютинин
HLA – человеческие лейкоцитарные антигены (Human Leucocyte Antigens)
 α -IFN – альфа-интерферон (лейкоцитарный)
 β -IFN – бета-интерферон (фибробластный)
 γ -IFN – гамма-интерферон (иммунный)
IL-1 – интерлейкин-1
IL-2 – интерлейкин-2
IL-6 – интерлейкин-6
IL-12 – интерлейкин-12
ILA – химерный белок, состоящий из интерлейкина-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы
LTR – длинные концевые повторы
MCS – участок с множественными сайтами для клонирования (multiple cloning sites)
MHC-I – главный комплекс гистосовместимости I класса
MHC-II – главный комплекс гистосовместимости II класса
MVA – модифицированный вирус осповакцины Анкара
NTP – рибонуклеотидтрифосфаты
RSV – вирус саркомы Рауса
SIV – вирус иммунодефицита обезьян
TAP – транспортные белки, ассоциированные с процессингом антигенов (transporter associated with antigen processing)
TBI – иммуноген, содержащий Т- и В-клеточные эпитопы (T and B cell epitopes containing Immunogen)
TCI – Т-клеточный иммуноген (T Cell Immunogen)
 α -TNF – фактор некроза опухолей альфа (tumor necrosis factor alpha)
Ub – убиквитин

2 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

2.1 Актуальность исследования

Бурное развитие новых направлений биологической и химической науки, сформировавшихся в середине XX века, таких как молекулярная биология, молекулярная генетика и биохимия, в частности энзимология, стали залогом формирования новых, совершенно уникальных, технологий создания рекомбинантных молекул ДНК. Именно эти технологии и привели к формированию нового направления современной биологии, без которого сейчас невозможно представить дальнейшее развитие биологических наук в целом, – генетической инженерии. Суть данной технологии состоит в получении искусственных молекул ДНК путем их химико-ферментативного синтеза и/или соединения (рекомбинации) уже существующих фрагментов ДНК из различных источников *in vitro* с последующим введением полученных рекомбинантных молекул в живые клетки с целью выражения (экспрессии) генетического материала в виде белковых молекул.

Совершенствование методов генетической инженерии открыло поистине безграничные горизонты развития современной биологии. Наиболее яркими примерами успехов и достижений этого направления, помимо создания целенаправленно генетически модифицированных различных живых организмов, можно считать получение ряда биологически активных веществ (БАВ) в рекомбинантном виде. Это, прежде всего, гормоны и цитокины, такие как инсулин, гормон роста, интерлейкины и интерфероны, которые обеспечивают согласованность действия различных систем организма человека – иммунной, эндокринной, нервной, лимфатической, сердечно-сосудистой, пищеварительной, репродуктивной – как в нормальных, так и в патологических условиях. Поскольку выделение таких веществ из природных источников сопряжено с рядом объективных трудностей и рисков и зачастую совершенно неэффективно, их получение в рекомбинантном виде является единственно возможным способом создания на их основе новых диагностических и профилактических препаратов, а также лекарственных средств (Goeddel *et al.*, 1979a,b, 1980; Derynck *et al.*, 1980;

Devos *et al.*, 1982; Gray *et al.*, 1982; Rossi *et al.*, 1982; Pestka, 1983; Колосов и др., 1984; Sodoyer, 2004; Sorensen and Mortensen, 2005; Щелкунов, 2010; Cohen, 2013).

Получение различных БАВ в рекомбинантном виде напрямую связано с разработкой новых и усовершенствованием существующих систем клонирования и экспрессии генетического материала, разработкой эффективных методов выделения целевых белковых продуктов из клеток штаммов-продуцентов.

Таким образом, в данной работе решалась задача создания надежных экспрессионных векторных плазмид и их использования для получения ряда бактериальных штаммов-продуцентов белков-иммуномодуляторов различного происхождения, перспективных для нужд современной медицины.

Отсутствие эффективных противовирусных препаратов оставляет вакцинопрофилактику единственным специфическим средством сдерживания некоторых опасных вирусных инфекционных заболеваний, к которым можно отнести синдром приобретенного иммунодефицита, вызываемого вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ/СПИД), и Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), вызываемой одноименным вирусом. В то же время, эффективные и безопасные вакцинные препараты против этих опаснейших инфекций до сих пор не разработаны, что предопределяет огромную актуальность научных исследований, проводимых в этом направлении.

Перспективным решением поставленной задачи следует признать использование ДНК-вакцин – новейшего подхода к иммунопрофилактике вирусных инфекционных заболеваний, базирующегося на достижениях генетической инженерии. При полной безопасности они способны индуцировать полноценный иммунный ответ против конкретного инфекционного агента (Tang *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Webster *et al.*, 1994, 1997; Hooper *et al.*, 1999, 2004; Riemenschneider *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2009; Ferraro *et al.*, 2011). Определяющую роль в создании подобных препаратов вакцин нового поколения играет усовершенствование существующих и разработка новых генетических конструкций, на основе которых возможно провести получение рекомбинантных молекул ДНК, обладающих необходимыми свойствами, обеспечивающими надежную защиту от определенных вирусных инфекций.

Для разработки эффективных вакцин нового поколения совершенно необходимо обладать знаниями относительно генетического разнообразия того или иного инфекционного агента. Для этого целесообразно применять современные надежные методы его детекции и генотипирования. Если для ВИЧ такие методы уже разработаны и успешно применяются, то в случае ККГЛ на момент начала настоящей работы ощущалась острая нехватка надежных экспресс-методов обнаружения вируса (его компонентов или антител к нему) в биологических образцах, а работы по изучению генетического разнообразия только начинались.

Таким образом, настоящая работа была ориентирована на разработку подходов к созданию новых методов экспресс-диагностики и генотипирования вируса ККГЛ, а также на конструирование серии экспрессионных векторных плазмид с использованием широкого арсенала современных методов генетической инженерии и создание на их основе ряда рекомбинантных плазмидных ДНК, перспективных для разработки новых кандидатных ДНК-вакцин против ВИЧ/СПИД и ККГЛ.

2.2 Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось конструирование рекомбинантных векторных плазмид, обеспечивающих эффективность клонирования и экспрессии различных генов, получение на их основе оригинальных рекомбинантных плазмид, направляющих в бактериальных клетках эффективный синтез ряда природных, мутантных и химерных иммуномодуляторов; создание и оптимизация серии генетических конструкций, предназначенных для получения перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ, а также разработка современных методов экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Сконструировать рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие экспрессию генов интерлейкина-2 (IL-2) и его мутантных аналогов в клетках *Escherichia coli*.

2. На основе полученных плазмид сконструировать плазмидный вектор pRTU1, содержащий промотор гена *recA* *Proteus mirabilis*, *trpA*-терминатор *E. coli* и протяженный полилинкер, чтобы обеспечить удобство клонирования и высокий уровень экспрессии различных генов в клетках *E. coli*.
3. С использованием векторной плазмиды pRTU1 создать оригинальные рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие в бактериальных клетках эффективный синтез ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: IL-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы; анафилатоксина C5a человека; ангиогенина человека; белка двух штаммов (высоковирулентного и слабовирулентного) вируса натуральной оспы, гомологичного рецептору γ -IFN человека.
4. Получить рекомбинантные плазмидные ДНК pBK-RSV-TCI и pcDNA-TCI, содержащие под контролем RSV- и CMV-промоторов искусственный ген TCI, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1.
5. Создать серию векторных плазмид (pV1, pV2, pV3) на основе плазмиды pcDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ*, обеспечивающих эффективное получение набора кандидатных ДНК-вакцин с целью сравнительного изучения некоторых аспектов их иммуногенного потенциала.
6. Сконструировать набор рекомбинантных плазмидных ДНК на основе векторов pV1, pV2, pV3, предназначенных для создания кандидатных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ.
7. Разработать современные методы экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах.

2.3 Научная новизна и практическая ценность работы

В данной работе сконструированы оригинальные рекомбинантные векторные плазмиды, в том числе pRTU1, содержащие эффективные транскрипционные элементы и обеспечивающие клонирование и высокий уровень экспрессии

различных генов в клетках *E. coli*. В вышеназванной плазмиде этот эффект достигается за счет наличия сильного индуцибельного промотора гена *recA* *Proteus mirabilis*, *trpA*-терминатора *E. coli* и расположенного между ними протяженного полилинкерного участка с большим набором уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз рестрикции.

С использованием векторной плазмиды pRTU1 созданы эффективные бактериальные штаммы-продуценты ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: IL-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы; анафилатоксина С5а человека; ангиогенина человека; белка вируса натуральной оспы (ВНО), гомологичного рецептору γ -IFN человека, двух штаммов – высоковирулентного и слабовирулентного. Причем химеротоксины ILA и AIL, а также вышеназванные белки ВНО получены и изучены впервые.

Сконструированная рекомбинантная плаزمида pcDNA-TCl, содержащая под контролем CMV-промотора искусственный ген TCl, кодирующий множественные СТL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, является перспективным кандидатом для создания на ее основе ДНК-вакцинных препаратов. Данная генетическая конструкция в настоящее время активно и успешно используется в ГНЦ ВБ «Вектор» для разработки новых современных вакцин. Сама конструкция и созданные на ее основе вакцинопрофилактические препараты защищены тремя патентами РФ на изобретения.

Разработана и сконструирована серия оригинальных векторных плазмид (pV1, pV2, pV3), обеспечивающая эффективное получение набора кандидатных ДНК-вакцин с целью сравнительного изучения различных аспектов их иммуногенного потенциала.

Получен набор рекомбинантных плазмидных ДНК на основе векторов pV1, pV2, pV3, который предназначен для создания перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ. На основе этих генетических конструкций в настоящее время в ГНЦ ВБ «Вектор» разрабатывается ДНК-вакцина против ККГЛ.

Разработаны современные методы экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах, основанные на ОТ-ПЦР и ПДРФ. Получен рекомбинантный нуклеокапсидный белок N различных штаммов вируса ККГЛ, который может быть успешно использован в диагностических тест-системах по обнаружению антигена вируса ККГЛ в клинических образцах методом ИФА и методом флуоресцирующих антител. Результаты работы в части ККГЛ защищены пятью патентами РФ на изобретения, тест-система по выявлению РНК вируса ККГЛ была запущена в производство в ЗАО «Вектор-Бест» (п. Кольцово, Новосибирская область).

Таким образом, в диссертационной работе изложены новые научно обоснованные генно-инженерные и биотехнологические решения, внедрение которых может внести значительный вклад в развитие страны, в частности, в области здравоохранения.

2.4 Положения, выносимые на защиту:

1. Плазмидная ДНК pRTU1, содержащая кассету «промотор гена *recA* *P. mirabilis* – полилинкер – терминатор транскрипции *t_{trpA}* *E. coli*», обеспечивает клонирование и высокий уровень экспрессии различных генов в клетках *E. coli*.
2. Рекомбинантные плазмиды, полученные с использованием вектора pRTU1, направляют в бактериальных клетках эффективный синтез ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: IL-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической A-субъединицы токсина шигеллы; белка вируса натуральной оспы, гомологичного рецептору γ -IFN человека, двух штаммов – высоковирулентного и слабовирулентного; анафилатоксина C5a человека; ангиогенина человека.
3. Рекомбинантная плазмидная ДНК pcDNA-TCI, содержащая искусственный ген TCI, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, является перспективным кандидатом для создания на ее основе ДНК-вакцинных препаратов.

4. Серия векторных плазмид (pV1, pV2, pV3) обеспечивает эффективное получение набора кандидатных ДНК-вакцин с целью сравнительного изучения влияния на их иммуногенность убиквитинзависимого процессинга целевых иммуногенов и презентации генерируемых эпитопов CD8+ Т-лимфоцитам по пути МНС-I класса.
5. Набор рекомбинантных плазмид, полученных на основе векторов pV1, pV2, pV3, состоящий из девяти плазмид, кодирующих структурные варианты полиэпитопных СТЛ-иммуногенов, обеспечивающих различные стратегии процессинга и презентации эпитопов ВИЧ-1, и трех плазмид, кодирующих структурные белки вируса ККГЛ (нуклеокапсидный белок N и зрелые поверхностные гликопротеины Gn и Gc), может быть использован для создания перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ-1 и ККГЛ.
6. Разработанные методы экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах, основанные на ОТ-ПЦР и ПДРФ, обеспечивают надежное обнаружение вирусной РНК и позволяют проводить первичное генотипирование различных биовариантов вируса ККГЛ.
7. Рекомбинантный нуклеокапсидный белок N может быть компонентом диагностических тест-систем по обнаружению антигена вируса ККГЛ в клинических образцах.

2.5 Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих российских и международных конференциях и других научных мероприятиях: 2-я отраслевая конференция молодых ученых "Актуальные проблемы биотехнологии", Кольцово, 25-27 апреля 1990 г.; Международная конференция "Оценка спонсируемых биологических исследований в России в новом тысячелетии", Новосибирск, ГНЦ ВБ "Вектор", 2-4 сентября 1999 г.; 7-я Международная Конференция "СПИД, РАК И РОДСТВЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ", Санкт Петербург, 24-28 мая 1998 г.; 8-я Международная Конференция "СПИД, РАК И РОДСТВЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ", Санкт-Петербург, 19-24 мая 2000 г.; European Meeting on Viral Zoonoses, Сант-Рафаэль, Франция, 13-16 октября 2001 г.; XII Международный конгресс по

вирусологии, Париж, Франция, 27 июля – 1 августа 2002 г.; 10-я Международная Конференция "СПИД, РАК И РОДСТВЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ", Санкт-Петербург, 26-31 мая 2002 г.; 4-я Всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных заболеваний», Москва, 2002 г.; Международный междисциплинарный конгресс «Прогресс в фундаментальных и прикладных науках для здоровья человека», Судак, Крым, Украина, 10-21 июня 2004 г.; Международная конференция "Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний", "Сосновка", Новосибирская обл., 8-10 сентября 2004 г.; Российская научно-практическая конференция "Генодиагностика инфекционных болезней", «Сосновка», Новосибирская обл., 25-27 октября 2005 г.; 15-й Европейский Конгресс по клинической микробиологии и инфекционным болезням, Копенгаген, Дания, январь 2005 г.; Международная конференция, посвященная 80-летию академика Д. Г. Кнорре, Новосибирск, 30 июля – 3 августа 2006 г.; III Российская научная конференция с международным участием, Новосибирск, 27-29 сентября 2006 г.; Научно-практическая конференция "Арбовирусы и арбовирусные инфекции", Астрахань, 17-20 октября 2006 г.; Международное рабочее совещание "Статус исследования вакцин против ВИЧ/СПИД: перспективы и потенциал развития ВИЧ-вакцины", Санкт-Петербург, 1-2 июня 2007 г.; Международный симпозиум "HIV Vaccines: Progress and Prospects", Банфф, Канада, 27 марта - 1 апреля 2008 г.; Вторая международная конференция по вопросам ВИЧ/СПИД в Восточной Европе и Центральной Азии (ЕЕСААС 2008), Москва, 3-5 мая 2008 г.; Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию НИИ проблем биологической безопасности, Алматы, 19-21 мая 2008 г.; Международная конференция "AIDS Vaccine 2008", Кейптаун, ЮАР, 13-16 октября, 2008 г.; Рабочее совещание по рассмотрению хода выполнения распоряжения Правительства РФ от 25 декабря 2007 г. № 1905-р, Новосибирск, 20-21 февраля 2009 г.; XVIII Международная конференция по СПИД "AIDS 2010", Вена, Австрия, 18-23 июля, 2010 г.; 5-й Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням, Москва, 25-27 марта 2013 г.; XII International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Веймар, Германия, 21–23 марта 2013 г.; 23-й Европейский конгресс по клинической микробиологии и инфекционным болезням, Берлин, Германия, 26 апреля – 2 мая 2013 г.; 15-й

Международный конгресс по иммунологии (ICI), Милан, Италия, 22-27 августа 2013 г.; а также некоторых других.

По результатам работы опубликовано 35 научных статей в зарубежных и отечественных реферируемых и переводных журналах, рекомендованных ВАК, получено 8 патентов Российской Федерации на изобретения.

2.6 Вклад автора

Основная часть описанных в настоящей работе исследований проведена автором лично либо в соавторстве с коллегами. Рекомбинантная плазида pRIL18, содержащая ген П-2 под контролем *recA*-промотора *Proteus mirabilis*, которая послужила основой для создания целевого экспрессионного вектора pRTU1, была любезно предоставлена нашим соавтором Камыниной Т.П.

Некоторые эксперименты по конструированию рекомбинантных плазмид, предназначенных для получения бактериальных штаммов-продуцентов иммуномодуляторов, проводились совместно с Бабкиной И.Н., Данилюк Н.К., Синяковым А.Н.

Генетические конструкции для создания кандидатных ДНК-вакцин получены совместно с Бабкиной И.Н., Белавиным П.А., Данилюк Н.К. в части вакцин против ВИЧ/СПИД и совместно с Бабкиной И.Н., Носаревой О.В., Пановой Т.А., Сафроновым П.Ф., Серegiной Е.В. в части вакцины против ККГЛ.

В работах по изучению генетического разнообразия вируса ККГЛ, на которых базируется разработка методов диагностики ККГЛ и генотипирования вируса, принимало участие большое количество сотрудников из разных стран и организаций - они перечислены в разделе 8 как соавторы научных публикаций. Непосредственно в разработке вышеназванных методов активное участие принимали Вышемирский О.И., Петрова И.Д., Серегин С.С., Яшина Л.Н., Meissner J.D. Работы по получению рекомбинантных белков вируса ККГЛ выполнены автором лично, часть из них - совместно с Серегиним С.С.

В разное время общее руководство отдельными этапами работы осуществляли: Бажан С.И., Петров В.С., Сандахчиев Л.С., Синяков А.Н., Щелкунов С.Н.

2.7 Структура и объем диссертации

Диссертация написана по классическому принципу и состоит из следующих разделов: список сокращений, общая характеристика работы, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список работ, опубликованных по теме диссертации, и список литературы (включает 532 источника, из которых 74 опубликованы в отечественных изданиях). Работа изложена на 311 страницах формата А4 (межстрочный интервал – 1,5; кегль шрифта – 13), содержит 65 рисунков и 11 таблиц, оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ 7.32-2001 и ГОСТ 8.417-2002.

2.8 Благодарности

Работа выполнена в 1988-2014 годах в ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора в рамках научных тем организации и по грантам Государственных научно-технических программ: "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники, подраздел Защита от патогенов"; по Федеральной Государственной программе "Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего"; в рамках Федеральной научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники гражданского назначения», подпрограмма ГНЦ РФ; по Федеральной Целевой программе "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации" (2009-2014 гг.); по проекту МНТЦ №2153р "Дизайн, конструирование и биологическое тестирование ДНК-вакцины против ВИЧ-1, кодирующей множественные СТЛ-эпитопы ВИЧ-1."

На разных этапах выполнения работы в ней приняли участие многие сотрудники ГНЦ ВБ «Вектор» и других научных организаций России, а также коллабораторы из других стран, которым автор выражает свою признательность. Все они являются соавторами научных публикаций автора и перечислены в главе 8.

Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам бывших структурных подразделений ГНЦ ВБ «Вектор»: отдел молекулярной биологии геномов (зав. отд. Щелкунов С.Н.), особенно сотрудникам лаборатории тонкого химического синтеза (зав. лаб. Сияков А.Н.), отдел биохимии вирусов (зав. отд.

Малыгин Э.Г., Нетесова Н.А.), особенно сотрудникам лаборатории буньявирусов (зав. лаб. Петров В. С.), а также сотрудникам ЗАО «Вектор-Бест» Гришаеву М.П., Смердовой М.А., Гришаевой О.Н., Распопину В.В. за большую помощь в работе по тестированию образцов и внедрению в производство ОТ-ПЦР-тест-системы по выявлению РНК вируса ККГЛ.

Особую благодарность автор выражает:

Дымшицу Г.М. за безусловный преподавательский талант, предопределивший сферу научных интересов автора – молекулярная биология;

Сандахчиеву Л.С. за большую моральную поддержку в начале научного пути;

Синякову А.Н. за грамотное руководство в аспирантский период;

Щелкунову С.Н. и **Малыгину Э.Г.** за поддержку различных направлений исследований, общее руководство отдельными этапами работы и ценные советы;

Петрову В.С. за предоставленную возможность активно участвовать в научных проектах по изучению генетического разнообразия вирусов ККГЛ и краснухи;

Ильичеву А.А. и **Карпенко Л.И.** за огромную работу по организации комплекса мероприятий и научных исследований, направленных на доклинические и клинические испытания вакцин СалВИЧД и КомбиВИЧвак, в состав которых вошли рекомбинантные плазмидные ДНК, описанные в настоящей работе;

Бабкиной И.Н., Белавину П.А. и **Данилюк Н.К.** за многолетнее плодотворное и очень приятное сотрудничество и неоценимую помощь в проведении многих представленных в этой работе экспериментов по конструированию различных рекомбинантных ДНК.

Глубочайшую признательность автор выражает своему научному консультанту **Бажану С. И.**, являющемуся организатором, вдохновителем и руководителем такого важного направления исследований и разработок, как создание кандидатных ДНК-вакцин, кодирующих полиэпитопные иммуногены, против ВИЧ/СПИД, в рамках которого была выполнена существенная часть представленной работы.

Автор также благодарен коллегам, высказавшим замечания и предложения по оформлению диссертации: **Белявской В.А., Гилевой И.П., Дейнеко Е.В., Ильичеву А.А., Колосовой И.В., Локтеву В.Б., Серegiной Е.В., Щелкунову С.Н.**

3 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1 Методы генетической инженерии в получении рекомбинантных белков, предназначенных для создания новых иммунобиологических препаратов

3.1.1 Краткая характеристика генетической инженерии. Исторический экскурс

Генетическая инженерия представляет собой совокупность методов и технологий получения рекомбинантных ДНК (РНК), способных наделить организм реципиента новыми, заранее рассчитанными свойствами. По сути, генетическая инженерия – это способ получения генетически модифицированных организмов (ГМО), которые иногда называют рекомбинантными или трансгенными. В то же время следует отметить, что многие методы генетической инженерии широко применяются для решения других важных научных и прикладных задач, например, для генотипирования различных организмов и создания диагностических препаратов и систем (ПЦР и ОТ-ПЦР, рестрикционный анализ и ПДРФ).

Часто в литературе используется термин «генная инженерия», который является частным случаем генетической инженерии, поскольку он ограничивает объект исследования генами, тогда как второй термин намного шире, так как он подчеркивает, что объектом исследования может являться любой генетический материал. Именно поэтому автор предлагает придерживаться термина «генетическая инженерия», хотя и понимает, что в большинстве случаев речь идет именно о генах.

Рассмотрим вкратце основные этапы получения ГМО. Для достижения поставленной цели необходимо осуществить следующие операции:

- получение целевого гена;
- встройка гена в состав векторной молекулы;
- введение рекомбинантной векторной молекулы в организм-реципиент;
- отбор рекомбинантных организмов (клеток, клонов);
- изучение биологических свойств ГМО и разработка технологий их использования.

Следует отметить, что данная проблематика очень широко освещена в современной литературе, как отечественной, так и зарубежной, поэтому автор

здесь попытается выделить те основные аспекты, которые непосредственно относятся к представленной работе. А заинтересованному читателю рекомендует серьезные монографии, учебные и методические пособия (Маниатис и др., 1984; Уотсон и др., 1986; Льюин, 1987; Альбертс и др., 1994; Патрушев, 2000, 2004; Жимулев, 2003; Sorensen and Mortensen, 2005; Щелкунов, 2010; Cohen, 2013).

Началом эпохи генетической инженерии принято считать 1972 год, когда Джексон, Симонс и Берг сообщили об успешном объединении прокариотических сигналов транскрипции и трансляции с гетерологичной ДНК в одном плазмидном репликоне (Jackson, Symons and Berg, 1972). Новое направление возникло как результат многолетних работ по изучению молекулярно-биологических, генетических и биохимических процессов, протекающих в живой клетке, на примере бактерии *Escherichia coli*. Пожалуй, главным пусковым механизмом бурного развития генетической инженерии следует признать открытие и выделение в начале 70-х годов прошлого столетия таких важных ферментов нуклеинового обмена как ДНК-лигазы и эндонуклеазы рестрикции II типа (Smith and Wilcox, 1970; Danna and Nathans, 1971; Cohen *et al.*, 1973; Cohen, 2013). Эти ферменты прочно вошли в инструментарий генных инженеров и являются основными инструментами генетической инженерии по сей день. А весь набор методов на сегодняшний день является базисом современной биотехнологии.

3.1.2 Экспрессионные системы

Поскольку настоящий раздел обзора посвящен получению рекомбинантных белков с целью создания на их основе новых иммунобиологических препаратов, следует вкратце описать используемые для этого основные экспрессионные системы. Прежде всего, необходимо отметить, что все системы экспрессии принципиально различаются по цитологическому признаку реципиентных клеток (клеток-хозяев): прокариотические и эукариотические. Первые в основном представлены различными штаммами отлично изученной бактерии *E. coli*, хотя используются и клетки других бактерий, например, *Bacillus species*, *Lactococcus lactis* (Stellwag and Brenchley, 1986; Hannig and Makrides, 1998). Среди эукариотических систем наиболее востребованы некоторые виды одноклеточных грибов – дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*,

Pichia methanolica (Borsig *et al.*, 1995; Hermann *et al.*, 1995; Marugg *et al.*, 1995), а также клеточные культуры насекомых, например, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, и млекопитающих (Kost *et al.*, 2005; Condreay and Kost, 2007).

Разработаны также и бесклеточные системы синтеза белков *in vitro*, представленные лизатами клеток *E. coli*, ретикулоцитов кролика, зародышей пшеницы (Spirin *et al.*, 1988; Spirin, 2004). Получены многие трансгенные растения и животные, представляющие собой своеобразные биореакторы и обладающие, несомненно, огромным потенциалом (Houdebine, 2002; Щелкунов, 2010), однако их широкое применение связано с определенным риском вследствие невозможности оценить отдаленные последствия их использования.

Далее кратко будут рассмотрены основные характеристики различных экспрессионных систем. Для более детальной информации можно обратиться к обзору Р. Содойера, который здесь взят за основу (Sodoyer, 2004).

Escherichia coli

Достоинства:

- всесторонне изученный объект;
- большое количество коммерчески доступных лабораторных штаммов с различными свойствами и экспрессионных векторов для них;
- отличные ростовые характеристики, что позволяет проводить крупномасштабные наработки в промышленных установках;
- относительная дешевизна компонентов питательных сред;
- отработанные схемы очистки целевых рекомбинантных белков, которые обладают некоторой универсальностью;
- высокий уровень синтеза целевых белков (до 500 мг/л бактериальной культуры);
- отсутствие контаминации продукта другими биологическими объектами, например, вирусами.

Недостатки:

- присутствие метионина в качестве N-концевой а/к;

- возможная контаминация рекомбинантных белков бактериальными эндотоксинами в процессе выделения, что требует особых подходов при выделении;

- необходимость тщательного контроля конечного целевого продукта;

- отсутствие посттрансляционных модификаций синтезированных рекомбинантных белков, в первую очередь гликозилирования и алкилирования;

- необходимость, в ряде случаев, ренатурации полученных белковых продуктов.

Bacillus subtilis

Достоинства:

- секреция рекомбинантных белков;

- низкий уровень протеаз в клетках-продуцентах;

- относительная дешевизна компонентов питательных сред;

- хорошие ростовые характеристики.

Недостатки:

- отсутствие посттрансляционных модификаций;

- культивирование штаммов-продуцентов находится в стадии разработки;

- нет широкого выхода на промышленный уровень.

Lactococcus lactis

Достоинства:

- секреция рекомбинантных белков;

- относительная дешевизна компонентов питательных сред;

- хорошие ростовые характеристики.

Недостатки:

- отсутствие посттрансляционных модификаций;

- разработки не вышли на промышленный уровень (лабораторные разработки).

Дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*

Достоинства:

- всесторонне изученные объекты;
- наличие посттрансляционной модификации целевых рекомбинантных белков;
- секреция целевого продукта в культуральную среду;
- отсутствие контаминации эндотоксинами;
- низкая контаминация конечного препарата белками и ДНК клетки-хозяина
- относительная дешевизна компонентов питательных сред;
- хорошие ростовые характеристики.
- высокий уровень синтеза целевых белков (до 1 г/л бактериальной культуры);
- выход на промышленный уровень культивирования.

Недостатки:

- система гликозилирования отличается от таковой в клетках млекопитающих;
- гипергликозилирование иногда отрицательно сказывается на биологической активности рекомбинантного белка;
- возможен протеолиз целевых белков.

Клетки насекомых

Достоинства:

- коммерчески доступные клеточные линии и векторы для экспрессии;
- возможность крупномасштабного суспензионного культивирования с выходом на промышленный уровень;
- протеолиз и N-, O-гликозилирование, ацилирование, карбоксиметилирование и фосфорилирование целевых белков;
- возможность синтеза токсических продуктов;
- секреция целевых рекомбинантных белков в нативной форме;
- высокий выход целевого продукта (до 500 мг/л культуральной среды);
- безвредность для человека (уровень биобезопасности BL-1).

Недостатки:

- проблема стабильности линий клеток насекомых;
- возможная контаминация целевого продукта иммуногенными белками хозяйских клеток вследствие бакуловирусной инфекции;
- различия систем гликозилирования в клетках насекомых и млекопитающих;
- невозможность правильного процессинга белков-предшественников;
- низкая скорость роста;
- дорогостоящие компоненты питательных сред.

Клетки растений

Достоинства:

- коммерчески доступные векторы для экспрессии;
- секреция и правильный процессинг рекомбинантных белков;
- безвредность для человека (уровень биобезопасности BL-1);
- низкая себестоимость целевых белков;
- возможность легкого масштабирования производства рекомбинантных белков.

Недостатки:

- различия систем гликозилирования в растительных и животных клетках;
- нет разработок с выходом на промышленный уровень (лабораторные разработки).

Клетки млекопитающих

Достоинства:

- коммерчески доступные векторы для экспрессии;
- синтез целевых рекомбинантных белков в нативной форме;
- возможность секреции посттрансляционно-модифицированных белков;
- возможность крупномасштабного культивирования на промышленном уровне.

Недостатки:

- очень низкие ростовые характеристики (продолжительное время ферментации);
- низкий выход целевого рекомбинантного белка (не более 10 мг/л культуры);
- дорогостоящие компоненты культуральных сред;
- дорогостоящее специальное оборудование;
- возможная контаминация целевого продукта вирусами, опасными для человека;
- использование линий трансформированных клеток ограничено ввиду онкологической опасности.

Трансгенные животные

Достоинства:

- правильный процессинг целевых рекомбинантных белков;
- низкая себестоимость;
- высокий выход целевого белка (до 50 г/л).

Недостатки:

- недостаточно изучены механизмы регуляции;
- риск заражения опасными вирусами и прионами;
- относительно долгое время требуется от создания генетической конструкции до получения продукта экспрессии целевого гена.

Бесклеточные системы экспрессии позволяют синтезировать токсичные для клеток рекомбинантные белки и использовать для синтеза неприродные а/к, а также получать меченые белковые молекулы. Вместе с тем понятно, что бактериальные экстракты, как и сами прокариотические клетки, не обладают способностью осуществлять посттрансляционные модификации синтезируемых белков. Использование таких систем экспрессии ограничивается лабораторными разработками.

В данной главе обзора внимание будет сконцентрировано на самой распространенной, исторически первой, системе экспрессии, основанной на использовании бактериальных клеток *E. coli*.

3.1.3 Методы получения целевых генов для их клонирования и экспрессии, конструирование рекомбинантных ДНК

Для того чтобы добиться экспрессии интересующего нас гена в гетерологичной системе, необходимо, прежде всего, этот ген получить.

Понятно, что для получения гена любым способом совершенно необходимо обладать хотя бы минимальными данными о его структуре, то есть должна быть известна его частичная последовательность нуклеотидов, либо она должна быть реконструирована, пусть и в вырожденном виде, из известного а/к фрагмента кодируемого этим геном белка. Лишь в этом случае можно применить специфические зонды для извлечения целевого гена.

Одним из главных инструментов для получения генов на первых этапах развития генетической инженерии являлся метод обратной транскрипции. То есть получение кДНК на матрице информационной (матричной) РНК – мРНК – при помощи недавно открытого фермента РНК-зависимой-ДНК-полимеразы (часто именуют фермент сокращенно: ревертаза), поэтому такой метод принято называть ферментативным. Этим методом было получено множество генов, в том числе такие важные как гены лейкоцитарного, фибробластного и иммунного интерферонов - α -IFN, β -IFN, γ -IFN (Derynck *et al.*, 1980; Goeddel *et al.*, 1980; Devos *et al.*, 1982; Gray *et al.*, 1982; Pestka, 1983).

Не менее популярным методом было прямое выделение индивидуальных целевых генов из генома, для чего была разработана и долгое время успешно применялась технология «шотган» (англ.: *shotgun experiment* – метод дробовика), суть которой состоит в клонировании расщепленного на фрагменты полного генома в составе, как правило, фаговых векторов с получением большого набора клонированных фрагментов, который назвали библиотекой генома. Такая библиотека может храниться длительное время, и из нее можно извлекать те или иные гены при появлении надежных зондов для их идентификации (Taya *et al.*, 1982; Skalińska *et al.*, 1983; Plater and Robinson, 1992; Ingham *et al.*, 1993).

Каким же способом получали рекомбинантные молекулы ДНК для их клонирования на заре развития генетической инженерии, то есть до того, как современные технологии прочно вошли в арсенал исследователей? Было предложено три основных метода конструирования рекомбинантов: коннекторный (рисунок 3.1), рестриктазно-лигазный и линкерный (рисунок 3.2). Коннекторный метод основан на образовании олиго(dT)-последовательностей с 3'-концов одного фрагмента ДНК и олиго(dA) – у другого фрагмента (возможно использование и второй пары нуклеотидов: олиго(dC) и олиго(dG)) с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы. После отжига полученных фрагментов одноцепочечные участки достраивают ДНК-полимеразой и сшивают ДНК-лигазой. Именно таким способом в 1972 г. была получена первая рекомбинантная молекула ДНК, состоящая из ДНК вируса SV40 и ДНК фага λ , несущая галактозный оперон *E. coli* (Jackson, Symons and Berg, 1972).

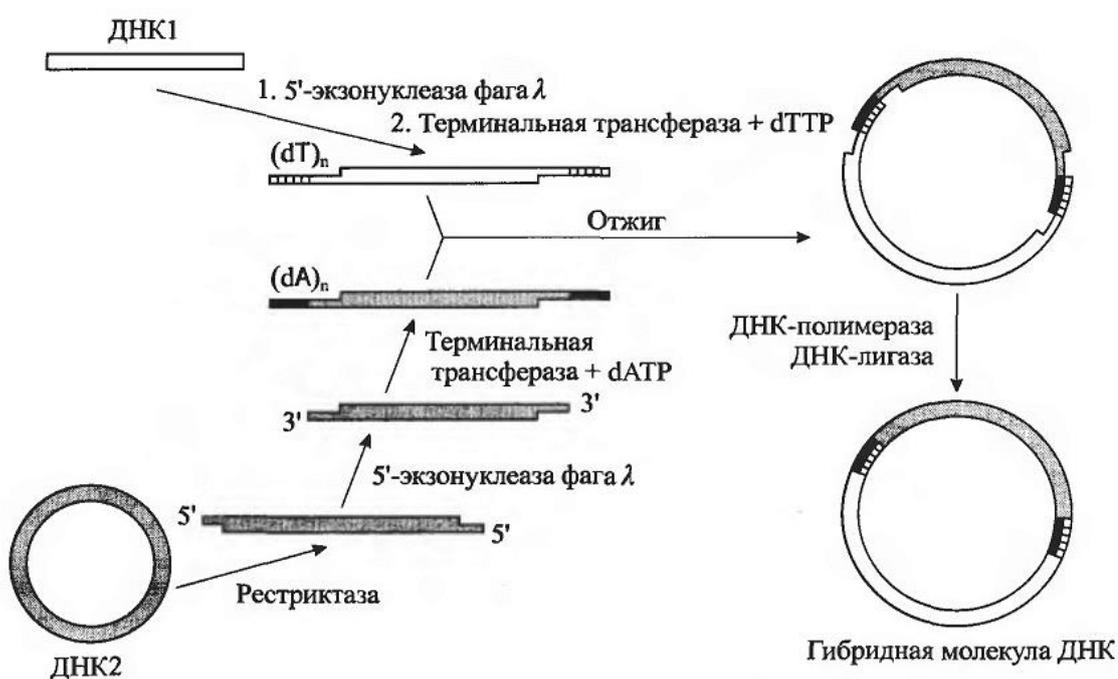


Рисунок 3.1 – Принципиальная схема коннекторного метода получения рекомбинантных молекул ДНК (из (Щелкунов, 2010))

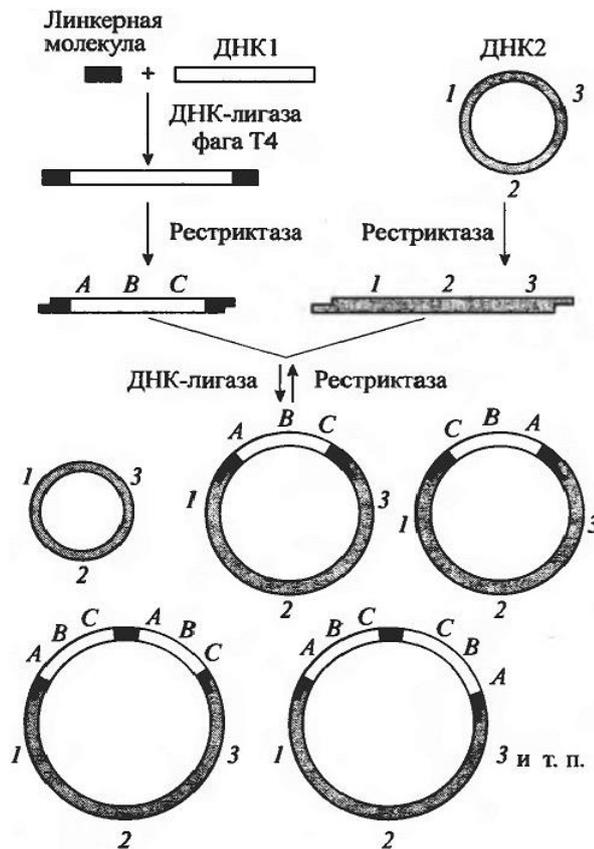


Рисунок 3.2 – Схема линкерного способа получения гибридных молекул ДНК
(из (Щелкунов, 2010))

Расшифровка последовательности нуклеотидов некоторых генов сделала возможной разработку методов их получения химическим либо химико-ферментативным путем. Здесь следует оговориться: по сути оба метода являются химико-ферментативными, поскольку без использования ферментов нуклеинового обмена они не обходятся. Хотя, теоретически, можно получать гены и чисто химическим путем. Но в 70-х годах прошлого столетия олигонуклеотиды синтезировали в лаборатории вручную, и длина цепи обычно составляла не более 8-10 звеньев, поэтому химический синтез даже небольших генов представлялся крайне сложной, трудоемкой задачей.

Впервые эта задача была решена группой исследователей, которую возглавлял Хар Хобинд Корана. В 1971 г. ученые сообщили об удачном химическом синтезе гена аланиновой тРНК дрожжей (Khorana, 1971; Khorana *et al.*, 1972). И, хотя этот ген не был функционально активным, поскольку он лишен регуляторных

элементов, это был несомненный прорыв в области генетической инженерии. Метод назвали химическим потому, что для наращивания цепей ДНК не применялась ДНК-полимераза, а весь ген состоял из двух комплементарных цепей ДНК длиной 77 нуклеотидов каждая, которые собирались из трех блоков, полученных с использованием 15 химически синтезированных олигонуклеотидов длиной по 8-12 звеньев каждый. Для сшивки олигонуклеотидов между собой, равно как и блоков друг с другом, использовали полинуклеотидлигазу.

Позже эта же группа авторов синтезировала и первый функционально активный ген тРНК - ген супрессорной тирозиновой тРНК *E. coli* длиной около 200 п. н. (Brown *et al.*, 1979).

Первым синтетическим геном, который удалось успешно экспрессировать в клетках *E. coli*, был ген соматостатина млекопитающих, состоящий из 14 а/к (Itakura *et al.*, 1977). А затем эта же группа ученых решила крайне важную задачу здравоохранения – добились экспрессии синтетического гена инсулина человека в бактериальной системе, причем авторы разработали при этом технологию получения целевого рекомбинантного белка, абсолютно идентичного природному (Goeddel *et al.*, 1979b). Вместе с тем Геддел и соавторы получили ген человеческого гормона роста комбинированием химического синтеза с ферментативным синтезом кДНК и успешно экспрессировали такой гибридный ген в клетках *E. coli* под контролем *lac*-промотора (Goeddel *et al.*, 1979a).

В 80-х годах прошлого века работы по химическому и химико-ферментативному синтезу различных генов активно продолжались и разрабатывались новые подходы, позволяющие повысить эффективность получения целевых искусственных генов. Так, например, в нашей стране был успешно реализован проект по синтезу искусственного гена $\alpha 2$ -IFN человека (155 а/к) и получению продукта его экспрессии микробиологическим способом (Колосов и др., 1984). Большой коллектив ученых из нескольких научно-исследовательских институтов страны на протяжении ряда лет выполнял синтез целевого гена, осуществленный по схеме, предложенной Кораной (Khorana, 1971; Khorana *et al.*, 1972). Ген был разбит на три фрагмента, которые собирались независимо, а затем сшивались в целевую структуру ДНК-лигазой, при этом использовали 68 олигонуклеотидов. Общая схема сборки приведена на рисунке 3.3.

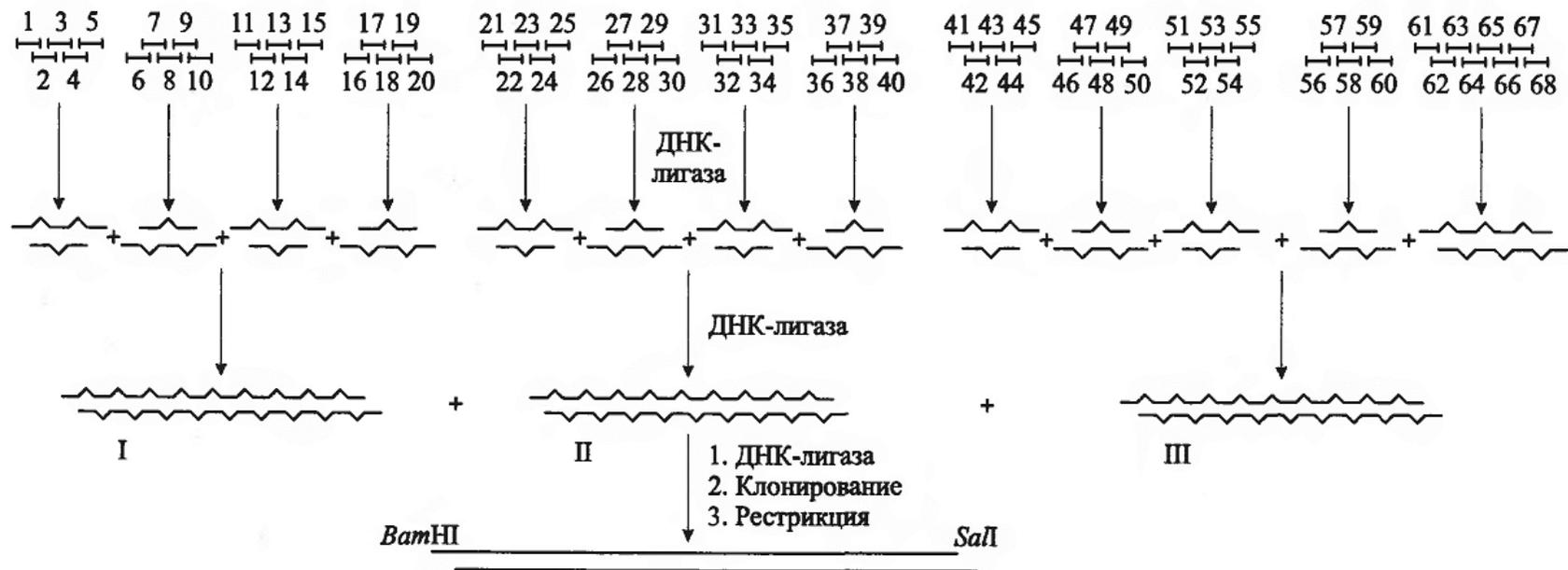


Рисунок 3.3 – Схема конструирования искусственного гена $\alpha 2$ -IFN человека (Колосов и др., 1984).

Места сшивки олигонуклеотидов показаны изломами линий (из (Щелкунов, 2010))

Первые успехи, связанные с химическим и ферментативным способами получения генов, послужили платформой для развития нового, более экономичного по сравнению с химическим и более гибкого в сравнении с ферментативным, метода синтеза – химико-ферментативного. Его суть состоит в достройке частично комплементарных ДНК-дуплексов, составленных из синтетических полинуклеотидов, с помощью ДНК-полимеразы и сшивке таких дуплексов между собой с образованием целевой структуры, которую затем можно клонировать в составе подходящего вектора в бактериальных клетках. В литературе принято называть этот способ по имени Итакуры, под чьим руководством была разработана и впервые реализована подобная схема получения генов (Rossi *et al.*, 1982). Авторы продемонстрировали ее эффективность на примере синтеза фрагмента гена $\alpha 2$ -IFN человека. Понятно, что подобная схема могла появиться только тогда, когда был достигнут существенный прогресс в области химического синтеза олигонуклеотидов, и стало возможным получать фрагменты одноцепочечной ДНК размером в 35-40 и более звеньев. Именно в этом случае очевидна экономичность подобного способа получения целевых генов.

При всех своих явных преимуществах в сравнении с трудоемкой схемой Кораны и этот метод не лишен ряда недостатков, которые различные группы исследователей пытались устранить.

К недостаткам схемы сборки генов, предложенной Итакурой с соавторами, в первую очередь следует отнести необходимость сшивки по тупым концам полученных дуплексов, что для большого количества таких фрагментов ДНК весьма затруднено, то есть эффективность ее ограничена малыми генами (фрагментами ДНК). Введение в структуру полинуклеотидов фланкирующих сайтов рестрикции не всегда позволяет сохранить аутентичную последовательность а/к целевого белка, что зачастую недопустимо. Использование различных линкеров и адаптеров, в том числе и отщепляемых (так называемые «возвращающие» адаптеры (Narang *et al.*, 1980)) также не могло в полной мере устранить вышеозначенную проблему.

Таким образом, назрела потребность в разработке способа получения фрагментов ДНК, составляющих целевой ген (их иногда называют субфрагментами), по методу Итакуры, но с заранее запланированными «липкими»

концами, сшивка по которым приводила бы к точному восстановлению целевой последовательности гена.

Для преодоления вышеуказанных недостатков в ряде лабораторий были предложены различные подходы, и самым оптимальным выглядит подход, разработанный нашими коллегами из ВНИИ молекулярной биологии (ныне ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Новосибирской области). Авторы сконструировали векторные плазмиды pMB123 и pMB124, позволяющие получать субфрагменты ДНК с произвольными, заранее запланированными, «липкими» концами за счет вырезания клонированного фрагмента эндонуклеазой рестрикции *FokI* (или *HgaI*). Наиболее коммерчески доступная в то время рестриктаза *FokI* гидролизует полинуклеотидную цепь на некотором расстоянии от места узнавания (это свойство и обеспечивает образование запланированных «липких» концов), а именно 9 нуклеотидов от 3'-конца сайта узнавания (GGATG) и 13 нуклеотидов от 5'-конца комплементарной последовательности (CCTAC).

Авторы продемонстрировали простоту получения подобных субфрагментов на примере фрагментов синтетического гена IL-2 человека (Синяков и др., 1989; Данилюк и др., 1990). Затем исследователи модифицировали эти векторные плазмиды и получили серию векторов pFH из 5 плазмид: pFH123 – pFH127. На рисунке 3.4 приведена полилинкерная область одной из них, а на рисунке 3.5 показана схема получения синтетического гена IL-2 человека с их использованием.

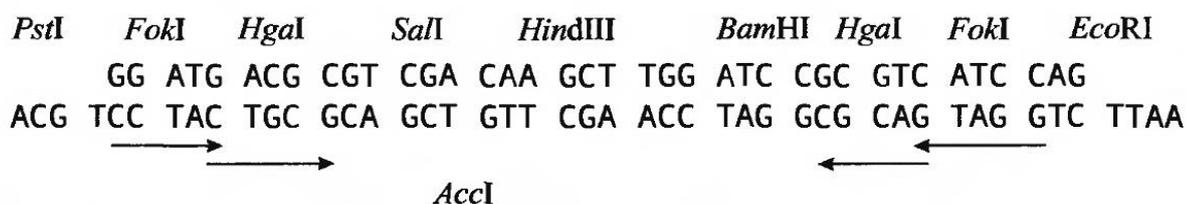


Рисунок 3. 4 – Строение полилинкерной области векторной плазмиды pFH123.

Стрелки указывают направление действия рестриктаз *FokI* и *HgaI*

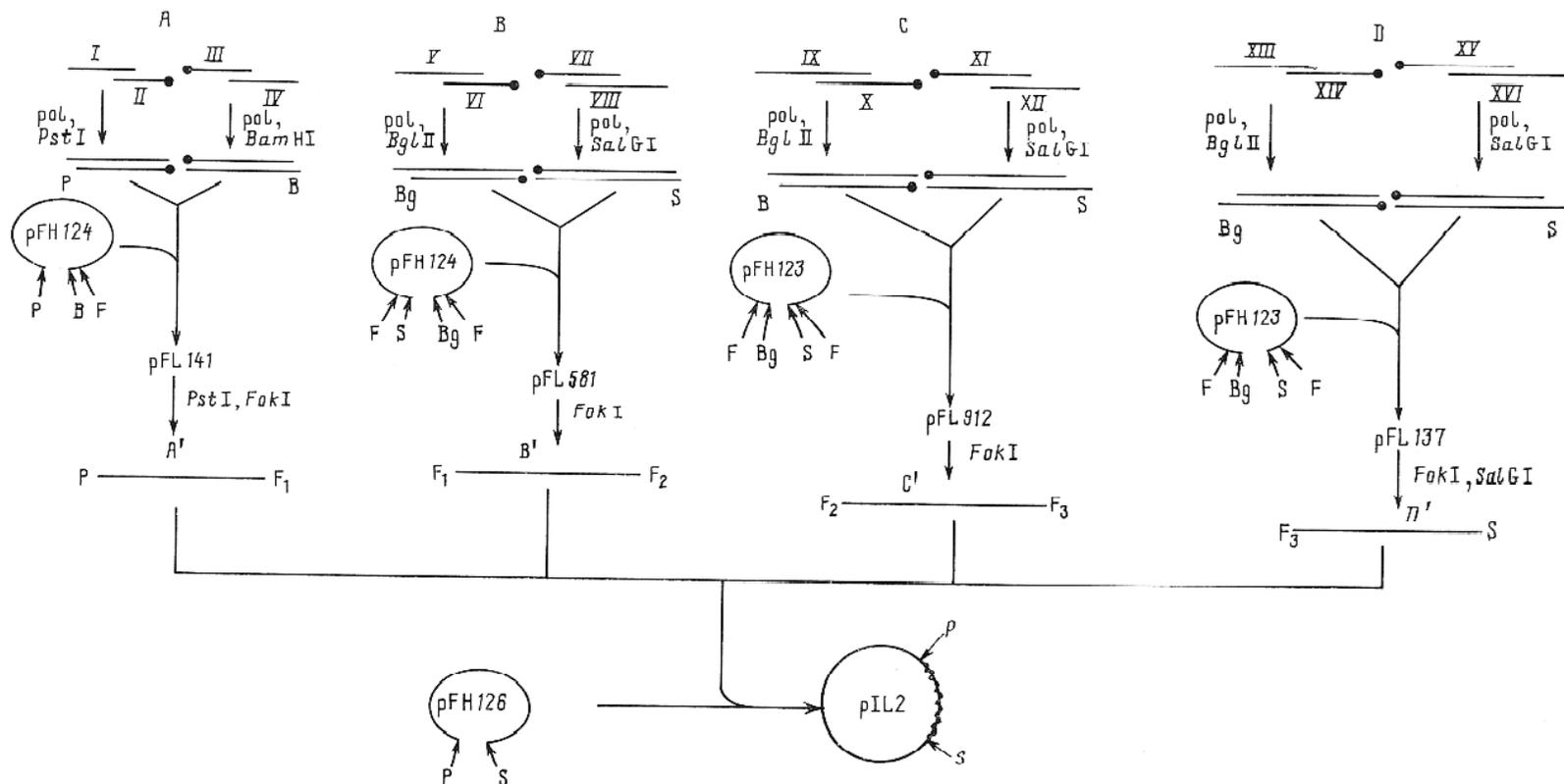
(Данилюк и др, 1991б)

Принцип получения запланированных «липких» концов у клонированных в них фрагментов ДНК остался таким же, тогда как вариантов клонирования стало больше, и как показали авторы, стабильность плазмид этой серии намного выше, чем у векторов серии рМВ (Синяков и др., 1988а,б; Данилюк и др., 1991б).

С использованием полученных плазмид в качестве векторов, была произведена инвариантная сборка синтетического гена человеческого IL-2 из 4-х субфрагментов, синтезированных по схеме, предложенной Итакурой с соавторами (Rossi *et al.*, 1982), что подчеркивает неоспоримые преимущества разработанной схемы синтеза генов перед традиционными (Данилюк и др., 1987, 1990, 1991а). Более подробно с разработанной схемой можно ознакомиться, обратившись к рисунку 3.5.

Вместе с тем необходимо отметить, что сборку искусственных генов можно осуществлять химико-ферментативным методом не только *in vitro*, но и в комбинации: *in vitro/in vivo*. То есть в пробирке осуществляется лишь синтез полинуклеотидов – составных частей целевого гена, тогда как ферментативная составляющая синтеза происходит уже в реципиентной клетке. Рассмотрим этот способ чуть подробнее.

В 1985 г. Мандеки с соавторами предложил свой метод сборки искусственных генов из полинуклеотидов большой длины (80-90 звеньев), который, в сущности, является модификацией метода, предложенного Итакурой с соавторами. Суть его состоит в том, что достройка полного дуплекса осуществляется *in vivo*, а не *in vitro* (Mandecki *et al.*, 1985, 1986; Mandecki, 1986). Авторы использовали этот метод для сборки и экспрессии гена человеческого анафилатоксина C5a, а также предложили применять его для сайт-направленного мутагенеза.



Показаны места расщепления рестриктазами (P – *Pst*I, B – *Bam*HI, Bg – *Bgl*II, S – *Sal*I, F – *Fok*I; F₁, F₂, F₃ – 5'-выступающие заранее рассчитанные взаимокomплементарные концы выделенных из рекомбинантных плазмид субфрагментов гена, образованные действием рестриктазы *Fok*I. Линии с точкой - 5'-фосфорилированные полинуклеотиды.

Рисунок 3. 5 – Общая схема сборки искусственного гена IL-2 из 4-х субфрагментов, один из способов (Данилюк и др., 1991а)

К достоинствам предложенного метода можно отнести экономичность при синтезе полинуклеотидов, поскольку фактически химическим способом необходимо получить лишь одну цепь ДНК, тогда как вторая достраивается непосредственно в бактериальной клетке хозяйской ДНК-полимеразой и замыкается лигазой. Однако недостатком такого подхода можно считать большой объем работы по клонированию генетического материала, поскольку на каждой стадии в состав рекомбинантной плазмиды включается лишь фрагмент целевого гена, ограниченный длиной синтезированного полинуклеотида (за вычетом комплементарной уже клонированному фрагменту области). На рисунке 3.6 схематично приведен один из этапов сборки целевого гена. Следует отметить, что разбиение гена на фрагменты (полинуклеотиды) строго ограничено необходимостью восстанавливать сайт клонирования (у авторов использовалась эндонуклеаза рестрикции *BsmI* (класс IIS)) на каждой стадии.

Получение полного гена происходит в результате серии последовательных клонирований, что приводит к удлинению ранее клонированного фрагмента. В такой ситуации понятно, что метод удобен для синтеза относительно небольших генов; на примере одного из них (С5а) авторы и продемонстрировали работоспособность предложенного подхода (Mandecki *et al.*, 1985, 1986).

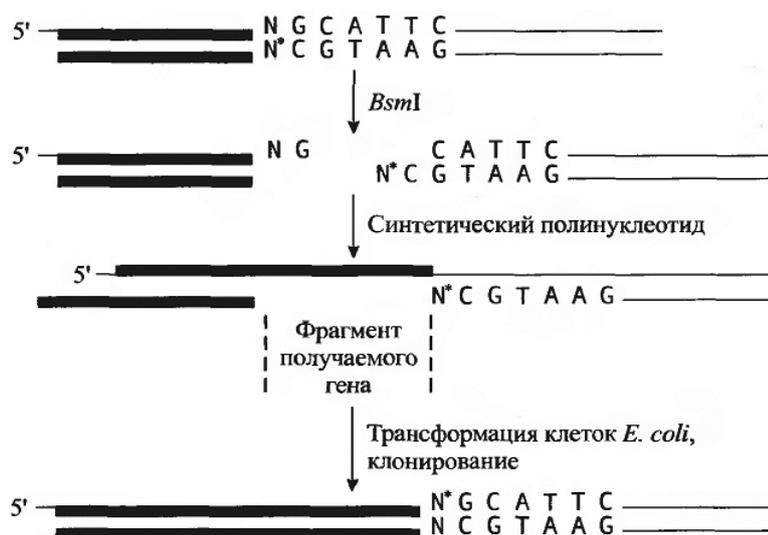


Рисунок 3.6 – Конструирование искусственных генов по методу Мандеки с соавторами (Mandecki *et al.*, 1985). Показана одна стадия удлинения целевой последовательности.

Жирная линия – последовательность синтезируемого гена, тонкая – вектора

(из (Щелкунов, 2010))

В 1985 г. Кэрри Мюллис с соавторами опубликовали принципиально новый метод получения целевых фрагментов ДНК, позволяющий амплифицировать генетический материал до требуемых количеств, например, достаточных для его надежной визуализации, клонирования или секвенирования (Saiki *et al.*, 1985, 1986, 1992; Mullis *et al.*, 1986). Метод получил название: полимеразная цепная реакция (ПЦР) от английского *polymerase chain reaction* (PCR). Метод основан на циклической полимеразной амплификации целевого фрагмента ДНК с помощью пары комплементарных 3'-концам антипараллельных цепей этого фрагмента олигонуклеотидов, которые играют роль праймеров (затравок) для синтеза новой цепи на матричной ДНК. Цикл состоит из следующих стадий:

1. Денатурация ДНК-матрицы.
2. Отжиг праймеров на комплементарных цепях ДНК.
3. Синтез (элонгация) цепей ДНК-полимеразой в присутствии всех 4-х dNTP.

Далее этот цикл повторяется необходимое количество раз, достаточное для получения целевого фрагмента ДНК в требуемом количестве (обычно проводят 15-40 циклов, что зависит, прежде всего, от начальной концентрации матрицы в реакционной смеси). На рисунке 3.7 представлена принципиальная схема амплификации фрагмента ДНК методом ПЦР. Как видно из представленного рисунка, с каждым циклом количество целевого фрагмента ДНК удваивается, то есть конечное количество целевых молекул в реакции ПЦР приближается к значению 2^n , где n – количество циклов реакции.

Первоначально в ПЦР использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, что было крайне неудобно по нескольким причинам. Основными являются: необходимость вносить в реакционную смесь фермент после каждого отжига, поскольку он денатурировал; и большое количество неспецифических продуктов реакции вследствие низкой оптимальной для фермента температуры элонгации цепей ДНК, при которой образуются альтернативные места посадки праймеров.

Таким образом, специфичность ПЦР в таком варианте постановки была недостаточной. Использование ДНК-полимераз, выделенных из термофильных бактерий, помогло устранить указанные выше недостатки, поскольку такие ферменты обладают большой термостабильностью и высокой оптимальной температурой для проявления максимума активности (70-75 °C). Самым известным

термофильным ферментом и исторически первым, используемым в ПЦР, является *Taq*-ДНК-полимераза *Thermus aquaticus*. (Saiki *et al.*, 1988). Этот фермент впервые был описан в 1976 г., но так и не был востребован вплоть до наступления эпохи ПЦР (Chien *et al.*, 1976).

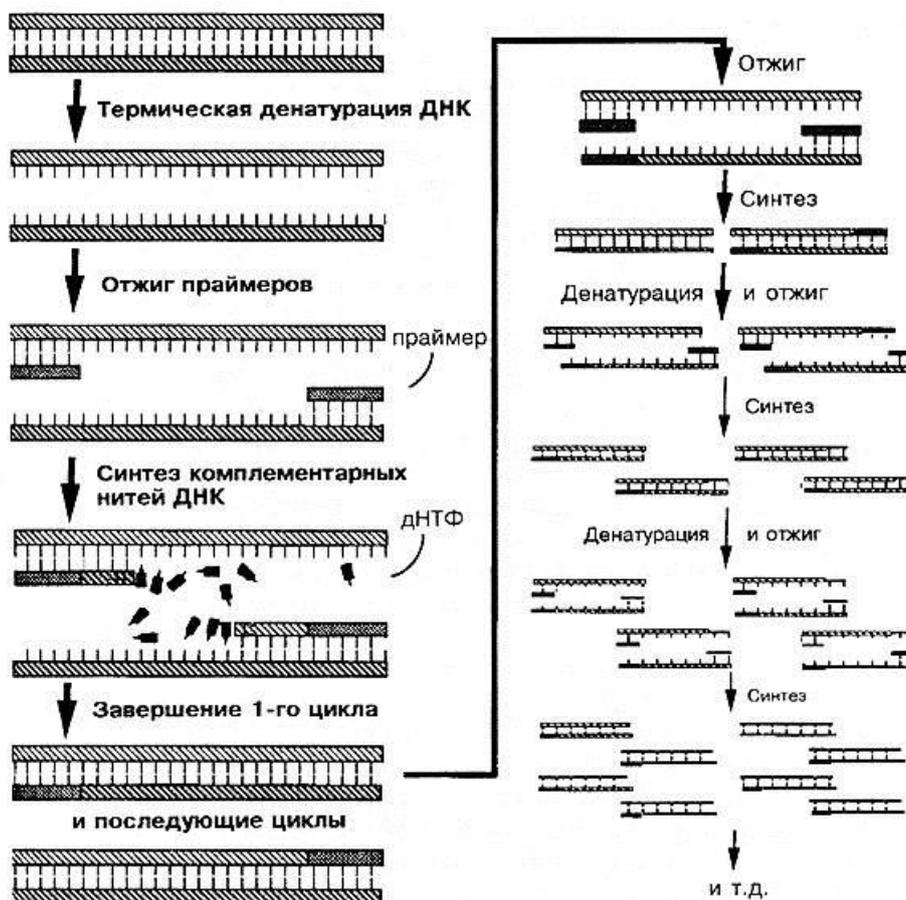


Рисунок 3.7 - Принципиальная схема амплификации фрагмента ДНК методом ПЦР (из <http://mirznakomstv.net/prognosis/102/942/fr>)

В настоящее время в арсенале генетической инженерии имеется целый спектр термофильных полимераз, в том числе и рекомбинантных, обладающих различными дополнительными активностями, скоростью синтеза цепей ДНК, точностью копирования матричной ДНК и т.д.

Особо важным этапом в развитии и внедрении ПЦР в различные области науки и медицины следует признать выделение термостабильных ДНК-полимераз

(например, *Pfu*-ДНК-полимераза *Pyrococcus furiosus*, *Tth*-ДНК-полимераза *Thermus thermophilus*), обладающих высокой корректирующей активностью (3'→5' экзонуклеазная активность), которой лишена *Taq*-ДНК-полимераза (Lundberg *et al.*, 1991; Auer *et al.*, 1995).

На сегодняшний день ПЦР является, пожалуй, основным инструментом не только генетической инженерии в ее классическом понимании, но и активно используется в генотипировании различных организмов, в том числе в криминалистике и установлении отцовства, в средствах и наборах диагностики заболеваний различной этиологии, выявлении онкомаркеров и других генетических аномалий до начала заболевания.

Для научных исследований значение ПЦР трудно переоценить. Благодаря развитию этого метода появились новые высокоэффективные инструменты в арсенале молекулярных биологов, вирусологов, биотехнологов, иммунологов и ученых других научных направлений. Достаточно назвать такие новые методики, как ОТ-ПЦР (проведение ПЦР после получения кДНК на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы), мультиплексный ПЦР-анализ (исследование сразу нескольких генетических локусов в одной реакционной смеси), ПЦР в режиме реального времени (позволяет дать количественную оценку содержащейся в пробе матрицы и накоплению продукта ПЦР в каждом цикле).

С применением ПЦР стал возможен новый способ химико-ферментативного синтеза генов, не требующий синтеза больших количеств олигомеров для многостадийной сборки целевого гена. Частично перекрывающиеся полинуклеотиды могут быть эффективно построены методом ПЦР, причем количество перекрываний, а, следовательно, и удлинений ПЦР-продукта может быть теоретически любым. На последней стадии обычно конечный целевой фрагмент ДНК (ген) получают тем же методом с использованием концевых праймеров. Впервые метод ПЦР для химико-ферментативного синтеза гена применили П. Диллон и К. Розен (Dillon and Rosen, 1993). Авторы перекрыли ген *rev* ВИЧ-2 четырьмя полинуклеотидами длиной 105 звеньев каждый, причем сами полинуклеотиды также имели попарное перекрытие, образуя дуплексы в 20-25 п.н., которые играли роль праймеров в ПЦР. Общая схема синтеза гена представлена на рисунке 3.8.

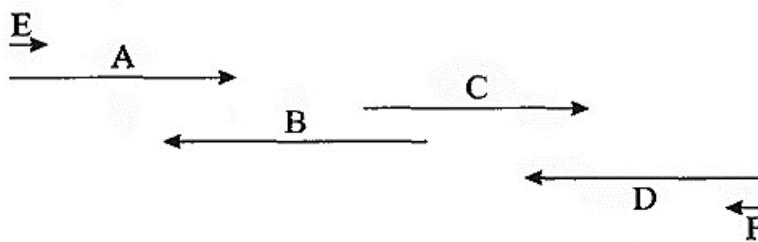


Рисунок 3.8 – Схема синтеза искусственного гена *rev* ВИЧ-2 с помощью ПЦР из синтетических полинуклеотидов (Dillon and Rosen, 1993)

На первой стадии использовали полинуклеотиды А, В, С, D, на второй – короткие концевые праймеры Е и F. Таким образом был получен и клонирован целевой ген длиной 300 п.н. Этот же подход авторы успешно применили для синтеза и мутагенеза других генов.

Впоследствии многие исследователи использовали различные подходы для химико-ферментативного синтеза с помощью ПЦР, которые можно назвать безматричным синтезом генов, имея в виду, что в реакции отсутствует традиционная ДНК-матрица, а ее роль играют сами химически синтезированные полинуклеотиды. Автор не будет перегружать эту главу громоздкими схемами – их достаточно много в настоящей работе в разделе 5 «Результаты и обсуждение».

3.1.4 Методы введения молекул рекомбинантных ДНК в клетки

Процесс введения экзогенной ДНК в реципиентную клетку, сообщая ей новые наследуемые свойства или признаки, называется *трансформацией*. В случае введения вирусной ДНК с последующим образованием вирусного потомства этот процесс принято называть *трансфекцией*.

Важно отметить, что трансформацию клеток могут вызывать как автономно реплицирующиеся молекулы ДНК, так и интегрирующиеся в геном клетки хозяина. В любом случае подобные клетки обычно именуют трансформантами, а полученные клоны трансформантов называют рекомбинантными или гибридными. Эффективность (или уровень) трансформации – очень важный показатель в любом генноинженерном эксперименте, связанном с клонированием ДНК. Его принято выражать в количестве рекомбинантных колоний (клонов, бляшек), полученных от

одной трансформированной реципиентной клетки, отнесенном к единице (количество, масса) трансформирующей ДНК. Для повышения эффективности этого процесса разработаны специальные способы подготовки клеток, подлежащих трансформации. Клетки, способные эффективно поглощать экзогенную ДНК, называют компетентными.

Каким же образом можно ввести чужеродную ДНК, например, в бактериальную клетку, обладающую мощной клеточной стенкой и совершенно некомпетентную?

Во-первых, можно разрушить клеточную стенку полностью либо частично с получением протопластов либо сферопластов. Однако ферментативное разрушение клеточной стенки – процесс очень тонкий и жизнеспособность полученных компетентных клеток весьма низкая, а сами методики не отличаются стабильной воспроизводимостью. Использование различных солей для получения бактериальных компетентных клеток позволило разработать серию надежных легко воспроизводимых методик. Наиболее популярны методики быстрого приготовления компетентных клеток *E. coli* для немедленного использования с применением хлористого кальция, которые восходят к эпохе зарождения генетической инженерии. Первыми такую возможность продемонстрировали М. Мандел и А. Хига еще в 1970 г., добившись эффективного проникновения ДНК фага λ в клетки *E. coli* (Mandel and Higa, 1970, 1992), а чуть позже С. Коэн с соавторами прекрасно адаптировали эту методику для трансформации клеток *E. coli* плазмидной ДНК (Cohen *et al.*, 1972).

Однако в последние десятилетия подобные простые методики вытесняются их усложненными модификациями и новыми методиками, позволяющими получать компетентные клетки с более высоким уровнем эффективности трансформации и подлежащие длительному хранению в условиях глубокой заморозки без существенного снижения своей компетентности, что чрезвычайно удобно в случае большого объема работ по клонированию генетического материала. В последнем случае используются сложные растворы, содержащие соли кальция, калия, рубидия, марганца (Гловер, 1988). В данной работе в следующем разделе можно подробно ознакомиться с одной из таких методик (главы 4.1.7 и 4.2.1.1).

Процесс трансформации уже приготовленных компетентных клеток выглядит крайне просто: к клеткам добавляют раствор ДНК, инкубируют, как правило, во льду в течение 30-60 мин, после чего клетки подвергают тепловому шоку при 37 °С в течение нескольких минут либо 42 °С 30-120 с, в зависимости от штамма *E. coli*. После шока клетки охлаждают и высевают на селективную агаризованную среду для получения и отбора трансформантов.

Описанные выше методы по вполне понятным причинам можно отнести к физико-химическим. Однако существует и чисто физический метод трансформации клеток, причем, не только бактериальных, но и любых других. Этот метод получил название *электропорация*. Впервые он был применен в 1982 г., когда Т. Уонг и Е. Нейманн успешно трансформировали культивируемые мышинные клетки (Wong and Neumann, 1982). Впоследствии метод электропорации был успешно адаптирован к различным типам клеток, как эукариотических, так и прокариотических, в том числе и к лабораторным штаммам *E. coli*. Суть предложенного метода достаточно проста. Клетки помещаются в электрическое поле высокой напряженности на несколько десятков мс, что вызывает кратковременный электрический пробой мембраны с образованием небольших пор, через которые молекулы ДНК, увлекаемые осмотической силой, моментально проникают внутрь клетки. Эффективность трансформации при этом на порядки превышает самые лучшие традиционные методики, основанные на физико-химическом процессе.

Существуют и другие способы введения чужеродной ДНК в реципиентную клетку, например, ранее был популярен метод упаковки в капсиды рекомбинантной ДНК фага λ *in vitro*, позволяющий впоследствии инфицировать бактериальные клетки и получать рекомбинантное фаговое потомство. Однако здесь автор ограничится рассмотрением лишь классических современных методов, которые описаны выше.

3.1.5 Лабораторные штаммы *E. coli*, используемые в генетической инженерии

В настоящее время количество лабораторных штаммов *E. coli* достаточно велико, однако, многие из них мало отличаются от прототипов или же вообще имеют один и тот же генотип. Это обусловлено, прежде всего, тем, что во многих

лабораториях исследователи пытаются выделить некие новые штаммы и используют их в работе в качестве авторских, хотя последние могут ничем не отличаться от обычных коммерчески доступных вариантов. Все лабораторные штаммы *E. coli* являются производными диких штаммов *E. coli* K12 либо *E. coli* B, имеются также и межштаммовые гибриды.

Ниже рассмотрены наиболее часто используемые лабораторные штаммы *E. coli* и приведены их некоторые характеристики и особенности, а также даны необходимые ссылки. Иногда в литературе проводят разделение штаммов на две категории: штаммы для клонирования и штаммы для экспрессии чужеродных генов, однако автор не будет этого делать, поскольку многие лабораторные штаммы прекрасно справляются как с той, так и с другой задачей. Вероятно, что такое разделение носит искусственный характер и в большей степени отражает субъективный взгляд (опыт) исследователей.

XL1-blue

(endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 (Tet^R) proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15]hsdR17(rк⁻ мк⁺)).

Хороший и удобный штамм для повседневного клонирования. Возможен отбор по Lac-фенотипу, частично инактивирована система рестрикции, несет ген устойчивости к тетрациклину. Удобен для наработки плазмид и фагмид. Не рекомендуется злоупотреблять тетрациклиновой селекцией, особенно добавлять тетрациклин в жидкую культуру для выделения плазмиды - он вызывает слипание клеточных стенок бактерий при осаждении центрифугированием.

Источник штамма: Stratagene.

XL2-blue

(endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 (Tet^R) proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15]hsdR17(rк⁻ мк⁺) Amy Cam^R).

По своим характеристикам практически не отличается от штамма XL1-blue, однако обладает устойчивостью не только к тетрациклину, но и к хлорамфениколу. В остальном отличий не наблюдается, хотя считается, что

компетентные клетки этого штамма обладают несколько большей эффективностью при трансформации.

Источник штамма: Stratagene.

JM103

(*endA1 glnV44 sbcBC rpsL thi-1 Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*).

Штамм обладает хорошими ростовыми характеристиками. Возможен отбор по Lac-фенотипу, несет ген устойчивости к стрептомицину. Может использоваться в качестве штамма-реципиента экспрессирующих плазмид.

Источник штамма: NEB, Sigma.

Ссылка: Yanisch-Perron *et al.*, 1985.

JM109

(*endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15] hsdR17(гк⁻mk⁺)*).

Штамм для выращивания плазмид и одноцепочечных f1 бактериофагов. Супрессирует многие амбер-мутации, если доступен глутамин. Возможен отбор по Lac-фенотипу, обладает устойчивостью к налидиксовой кислоте, хорошо растет на минимальной среде M9 с добавлением тиамина. Компетентные клетки этого штамма обладают достаточно высокой эффективностью при трансформации, что делает его удобным для рутинных процедур клонирования.

Источник штамма: NEB, Sigma.

Ссылка: Yanisch-Perron *et al.*, 1985.

TOP10F'

(F' [*lacI^q Tn10(Tet^R) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 deoRrecA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*]).

Штамм для выращивания плазмид и одноцепочечных f1-бактериофагов. Возможен отбор по Lac-фенотипу, обладает устойчивостью к тетрациклину и стрептомицину. Отсутствие эндонуклеазы улучшает качество полученных препаратов ДНК. Обладает хорошей эффективностью при трансформации.

Источник штамма: Invitrogen.

C600

(F⁻ *tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ*⁻).

Очень стабильный лабораторный штамм, который на протяжении десятилетий успешно использовался в качестве хозяйского штамма для различных плазмид. Пригоден для масштабной наработки рекомбинантных плазмид.

Ссылки: Appleyard, 1954; Hanahan, 1983.

HB101

(F⁻ *mcrB mrr hsdS20(rB⁻ mB⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44 λ*⁻).

Гибрид *E.coli* K12 и *E.coli* B (локусы *hsd*, *mcrB*, *mrr*). Пригоден для наработки плазмид, но нельзя использовать для одноцепочечных f1-бактериофагов. Невозможен отбор по Lac-фенотипу. Несет устойчивость к стрептомицину.

Источник штамма: GIBCO BRL, Sigma, Promega.

Примечание: штамм имеет почти полувековую историю, и поэтому его генотип у разных производителей может иметь некоторые отличия от приведенного здесь.

Ссылка: Boyer and Roulland-Dussoix, 1969.

RR1

(HB101 *recA*⁺).

Штамм представляет собой тот же HB101, но с функционирующей системой рекомбинации. Часто используется для экспрессии генов рекомбинантных белков. Обладает отличными ростовыми характеристиками. Для наработки плазмид, особенно содержащих протяженные повторы, не следует использовать.

Источник штамма: Promega.

Ссылка: Volivar *et al.*, 1977a.

BL21

(F⁻ *dcm ompT hsdS*(гв⁻ мв⁻) *gal [malB⁺]_{K-12}(λ^S)*).

Штамм представляет собой производную *E. coli* В с внедренным локусом *malB⁺* из *E. coli* K12. Обладает пониженной способностью к внутриклеточному протеолизу вследствие отсутствия протеаз, кодируемых генами *lon* и *ompT*. Это может благоприятно сказываться на уровне синтеза рекомбинантного белка, особенно если он находится в клетке в растворимом виде. В случае Т7-экспрессирующих систем для индукции приходится использовать инфекцию фагом λСЕ6.

Источник штамма: Stratagene.

Ссылка: Studier *et al.*, 2009.

BL21(DE3)

(F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B*(гв⁻ мв⁻) λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*])).

Штамм является производной BL21, полученной специально для экспрессии генов под контролем промотора фага Т7. Штамм лизогенен по λ DE3, который содержит ген Т7-РНК-полимеразы под контролем *lacUV5*-промотора (индукторы - ИПТГ, галактоза; репрессор - глюкоза).

Источник штамма: Stratagene.

Ссылка: Studier *et al.*, 2009.

BL21(DE3)pLysS

(F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B- m_B-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])) [pLysS Cam^R].*

Штамм представляет собой BL21(DE3), содержащий плазмиду pLysS, которая кодирует T7-лизоцим - естественный ингибитор T7-РНК-полимеразы. Штамм позволяет более строго контролировать экспрессию встроенных генов. При индукции ИПТГ сильный *lacUV5*-промотор преодолевает репрессию. Эта же плазида сообщает клеткам устойчивость к хлорамфениколу (до 40 мкг/мл).

Источник штамма: Stratagene.

BL21(DE3)pLysE

(F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B- m_B-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])) [pLysE Cam^R].*

Штамм представляет собой BL21(DE3), содержащий плазмиду pLysE, которая кодирует T7-лизоцим - естественный ингибитор T7-РНК-полимеразы. Штамм позволяет более строго, чем BL21(DE3)pLysS контролировать экспрессию целевых генов благодаря повышенному уровню синтеза лизоцима. Эта плазида также сообщает клеткам устойчивость к хлорамфениколу (до 40 мкг/мл).

Источник штамма: Stratagene.

BRL

(F⁻ *ompT hsdSB(r_B- m_B-) gal dcm Δ(srl-recA)306::Tn10(Tet^R)*).

Штамм представляет собой гесА⁻ производную штамма BL21. Уменьшается вероятность перестроек в клонируемой ДНК. В остальном подобен BL21.

Источник штамма: Novagen.

VL1201

(*htpR_{am^r}* *supC* *strA*).

Штамм предназначен для успешной экспрессии различных генов в составе рекомбинантных плазмид. Обладает пониженной способностью к протеолизу рекомбинантных белков. Индукцию синтеза целевых белков предпочтительнее проводить при пониженной температуре – 30-32 °С.

Источник штамма: ФГУП «ГосНИИгенетика» (Москва).

VL1222

(*htpR_{am^r}* *supC* *lon*).

Штамм сходен с VL1201, но дополнительно несет мутацию по гену *lon*. Таким образом, этот штамм еще лучше подходит для синтеза растворимых рекомбинантных белков, особенно если последние предрасположены к протеолитическому внутриклеточному расщеплению. Индукцию синтеза целевых белков также предпочтительнее проводить при пониженной температуре – 30-32 °С.

Источник штамма: ФГУП «ГосНИИгенетика» (Москва).

3.1.6 Клонирование векторных плазмид

Следует сразу оговориться, что в качестве векторов для клонирования генетического материала могут выступать не только плазмиды, но и другие генетические конструкции, построенные на основе геномов бактериофагов, либо гибридные структуры, состоящие из фрагментов геномов плазмид и определенных фагов – так называемые космиды, фазмиды и фагмиды. Здесь автор попытается сформулировать лишь общие принципы строения векторных молекул на примере некоторых наиболее известных и распространенных векторных плазмид.

Итак, какими же свойствами должна обладать плазмидная ДНК, чтобы служить вектором для переноса генов в бактериальную клетку в условиях лабораторного эксперимента?

Во-первых, она в обязательном порядке должна нести некий селективный маркер, чтобы можно было легко отличать плазмидсодержащие клетки от

нетрансформированных. Обычно таким маркером служит ген (гены) устойчивости к антибиотикам. Вследствие этого на селективной среде выживают лишь трансформанты.

Во-вторых, необходимо наличие уникальных мест расщепления хотя бы для одной рестриктазы, причем, в районе, который не является жизненно важным для репликации самой плазмиды и не нарушающем целостность маркерного гена, о котором шла речь выше.

В-третьих, плазида должна надежно реплицироваться в хозяйской клетке и обладать достаточной структурной стабильностью, чтобы поддерживаться в поколениях бактериальных клеток в неизменном виде. Причем, желательно, чтобы контроль репликации векторной плазмиды был ослаблен для увеличения эффекта дозы клонированного гена. Или правильнее сказать: для продуктивной наработки целевых рекомбинантных плазмид, содержащих клонированный ген, поскольку речь в этой главе идет лишь о клонирующих векторах. Тем не менее, все изложенные основные требования к векторным плазидам целиком и полностью относятся и к векторам, предназначенным для экспрессии клонированных генов, о которых речь пойдет ниже.

Первые плазмидные векторы для клонирования ДНК были весьма примитивны и неудобны во всех отношениях: они представляли собой плазмиды большого размера со строгим контролем репликации, вследствие чего их копияемость в трансформированных бактериальных клетках не превышала десятка копий на клетку. Выбор участков, по которым можно клонировать целевые последовательности ДНК, практически отсутствовал, отбор рекомбинантов был крайне затруднен.

Настоящим прорывом в этом направлении можно считать конструирование векторной плазмиды pBR322 и серии ее производных (pBR327, pBR325, pBR328 и др.). Плазида была получена в 1977 г. Ф. Боливаром с соавторами и моментально стала основным вектором клонирования практически во всех лабораториях мира (Bolivar *et al.*, 1977b). Вскоре Г. Сатклифф определил и опубликовал полную нуклеотидную последовательность этой векторной плазмиды, что позволило существенно расширить возможности ее использования в качестве вектора для клонирования (Sutcliffe, 1979).

Преимущество новых векторов, в частности pBR322, было неоспоримо. Уменьшился размер векторных плазмид, появилось несколько вариантов клонирования целевых молекул ДНК благодаря наличию ряда уникальных сайтов рестрикции, пригодных для этой цели, отбор рекомбинантных клонов стал простым и удобным, поскольку при успешном клонировании инактивировался один из генов, отвечающих за устойчивость к определенному антибиотику. И немаловажно, что копияемость этих плазмид была существенно выше прототипов ввиду ослабленного контроля репликации. На рисунке 3.9 приведена физическая карта плазмиды pBR322 и указаны положения уникальных сайтов рестрикции наиболее используемых в те годы рестриктаз.

В настоящее время известно более 40 рестриктаз, имеющих по одному сайту узнавания в последовательности pBR322, причем 11 из них расположены в гене (либо его промоторе) устойчивости к тетрациклину, а 6 – в гене *bla*, обеспечивающим устойчивость к ампициллину.

Вместе с тем арсенал векторных молекул стремительно расширялся, и одним из значимых событий стало появление векторных плазмид pUC-серии, наиболее популярными из которых следует признать пару плазмид pUC18 и pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), которые отличаются лишь ориентацией участка с набором сайтов для клонирования (MCS - multiple cloning sites).

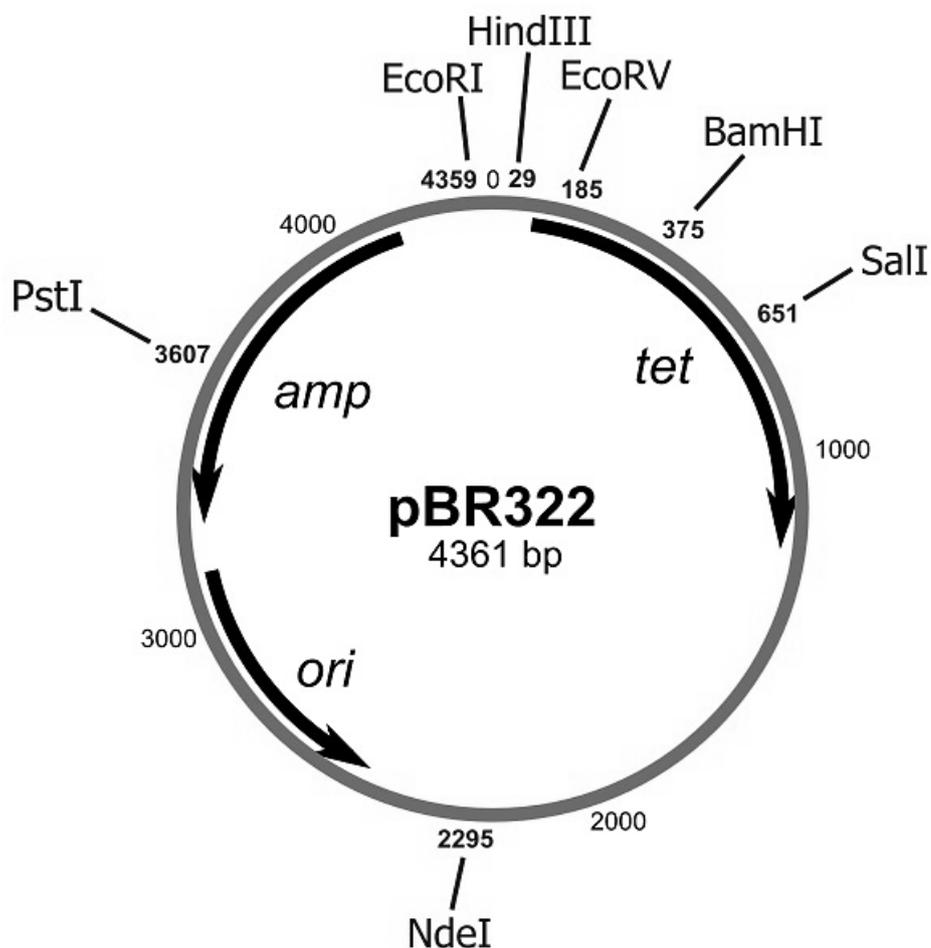


Рисунок 3.9 – Физическая карта плазмиды pBR322 с указанием некоторых уникальных сайтов рестрикции

(<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PBR322.svg> с изменениями)

Плазмиды pUC-серии (рисунок 3.10) не просто компактнее, чем, например, pBR322 и ее производные, но и обладают существенно большей копийностью в трансформированных бактериальных клетках. Однако главным их достоинством стало наличие возможности нового фенотипического отбора - по Lac-фенотипу. Это обусловлено экспрессией α -пептида β -галактозидазы, который способен комплементировать с дефектной β -галактозидазой ряда штаммов *E. coli* с образованием биологически активного фермента, что сообщает трансформированным клеткам Lac⁺-фенотип (синие или голубые колонии на индикаторной среде). В результате встройки ДНК-фрагмента в область MCS, как правило, нарушается синтез α -пептида, что приводит к появлению на

индикаторной среде неокрашенных колоний с Lac⁻-фенотипом. Таким образом, отбор рекомбинантных клонов существенно упрощается.

На рисунке 3.10 приведена физическая и рестриктная карта плазмид этой серии. MCS показан для плазмиды pUC19 (для pUC18 - обратная ориентация).

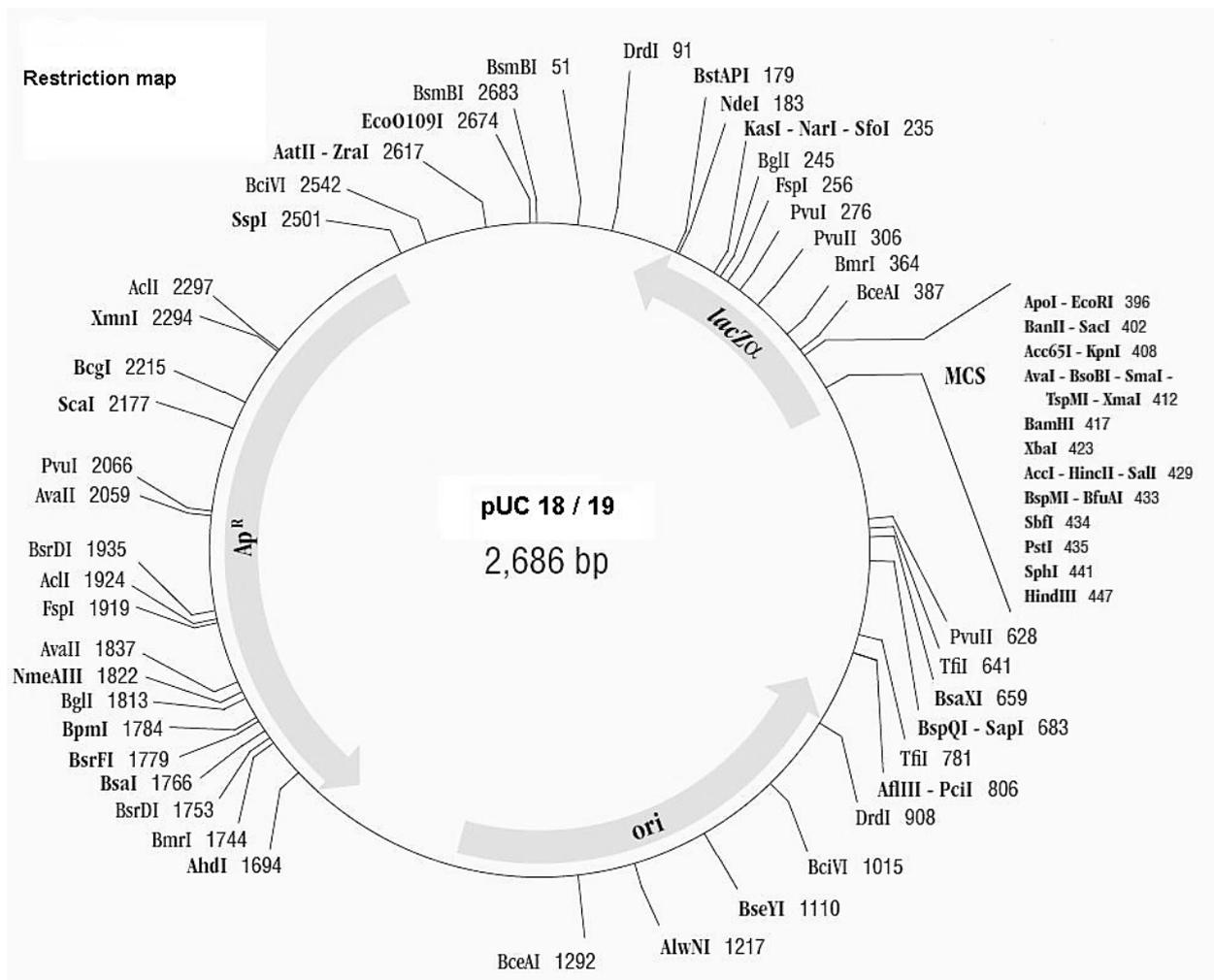


Рисунок 3.10 – Физическая и рестриктная карта плазмид pUC18 и pUC19 (http://www.geneon.net/puc18-2F19-dna-_484.html с изменениями)

Следует вспомнить еще об одном, принципиально ином типе клонирующих векторов: о векторных плаزمидах, позволяющих извлекать из них после клонирования фрагменты ДНК с заранее запланированными «липкими» концами. Это существенно облегчает инвариантную сборку целевых нуклеотидных последовательностей (генов) из нескольких субфрагментов. Однако автор здесь не будет подробно останавливаться на этой группе векторов, поскольку они

достаточно подробно были рассмотрены выше в главе 3.1.3, где речь шла о химико-ферментативном синтезе искусственных генов.

Нельзя не упомянуть и весьма специфические вектора, предназначенные для высокоэффективного клонирования фрагментов ДНК с тупыми концами либо ПЦР-фрагментов с избыточным дезоксиаденозином (dA) на 3'-конце, что обычно происходит с большой вероятностью при использовании в ПЦР *Taq*-ДНК-полимеразы, которая обладает такой трансферазной активностью.

В первом случае одним из лучших векторов следует признать плазмиду *Zero Blunt*[®] (Invitrogen), несущую в районе MCS летальный ген *ccdB*, продукт которого ингибирует активность клеточной топоизомеразы II (ДНК-гираза), вызывая деградацию хозяйской ДНК и, как следствие, гибель клеток. Таким образом, в условиях индукции *lac*-промотора способны выживать лишь те клетки, которые несут встройки в этой области, приводящие к инактивации летального гена, тогда как все клетки, содержащие исходную плазмиду без вставки, погибают (Bernard *et al.*, 1994).

Для клонирования вышеупомянутых ПЦР-фрагментов идеально подходят вектора *pGEM-T* (рисунок 3.11) и *pGEM-T Easy* (Promega), несущие неспаренные dT на 3'-конце, что обеспечивает их сшивку с ПЦР-фрагментом. В результате трансформации бактериальных клеток лигазной смесью большинство колоний несет рекомбинантную плазмиду, содержащую вставку целевого фрагмента ДНК (Holton and Graham, 1991).

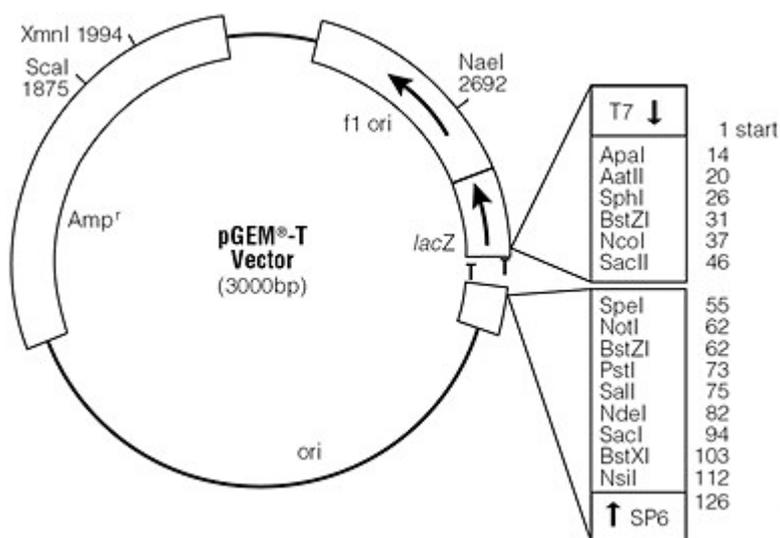


Рисунок 3.11 – Физическая и рестриктная карта вектора *pGEM-T*

В настоящее время количество векторов для клонирования ДНК очень велико. Коммерчески доступны сотни разнообразных плазмидных и прочих векторов, а выбор зачастую диктуется не столько реальными преимуществами какого-либо вектора перед аналогичными, сколько личными предпочтениями исследователя и/или их доступностью. Ведущими поставщиками подобного рода продукции являются следующие фирмы: Promega, Invitrogene, Stratagene, Novagen, Qiagen, NEB, Clontech.

3.1.7 Особенности экспрессионных векторных плазмид

Как отмечалось в предыдущей главе, любая векторная плазида, предназначенная как для клонирования, так и для экспрессии чужеродного генетического материала, должна в обязательном порядке обладать рядом общих свойств, о которых подробно говорилось выше. Однако очевидно, что экспрессионные вектора дополнительно обязаны нести определенные функциональные элементы, обеспечивающие эффективную экспрессию клонированных генов в бактериальной клетке, для чего они призваны оптимизировать этот процесс как на уровне транскрипции целевой информационной РНК, так и на уровне ее трансляции на полисомах.

Для того, чтобы лучше понимать механизмы подобной регуляции в клетках прокариот, имеет смысл вкратце рассмотреть организацию транскрипции генов, включенных в оперон. Наиболее изученными в этом отношении являются лактозный, арабинозный и триптофановый опероны *E. coli*, в которых реализуются различные способы регуляции транскрипции.

Оперон – это способ организации генетического материала у прокариот, при котором цистроны (гены), кодирующие белки, работающие в тесном взаимодействии (совместно или последовательно), объединяются под одним (или несколькими) промоторами. Подобная функциональная организация позволяет эффективно регулировать экспрессию этих генов на уровне транскрипции.

На рисунке 3.12 представлена схема организации *lac*-оперона и варианты его функционирования в различных условиях в зависимости от концентрации глюкозы и лактозы в культуральной среде.

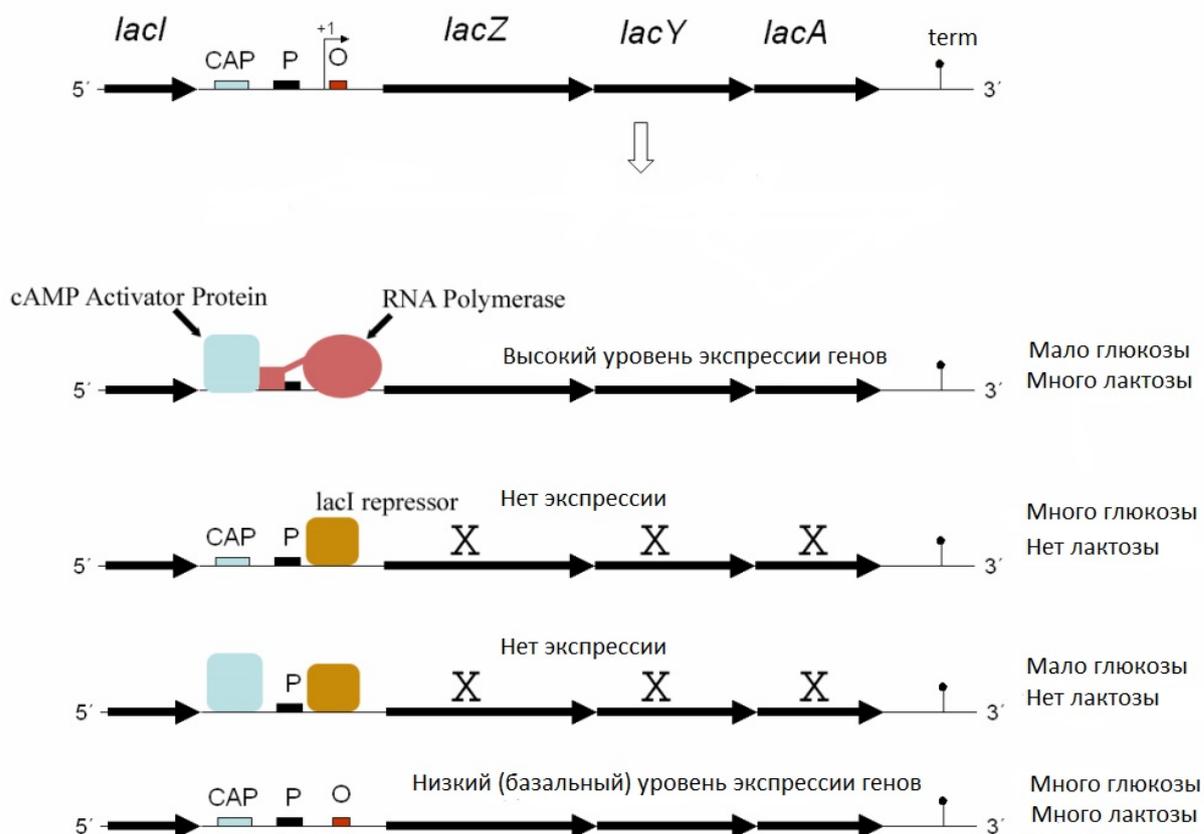


Рисунок 3.12 – Схема строения лактозного оперона *E. coli* и возможные варианты его функционирования в зависимости от активности регуляторных белков:

катаболитного активатора CAP и репрессора

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/42/Lac_operon.png с изменениями)

Концепция прокариотического оперона была сформулирована в 1961 г. французскими учеными Ф. Жакобом и Ж. Моно (Jacob and Monod, 1961) после успешного изучения регуляции экспрессии генов лактозного оперона *E. coli*, приведенного на рисунке 3.12.

Изменение сродства белка-репрессора к оператору происходит в результате связывания эффекторных молекул лактозы. Как видно из рисунка 3.12, в отсутствие лактозы репрессор прочно связан с операторной последовательностью, и транскрипция генов оперона блокирована (репрессирована). Связывание с лактозой меняет конфигурацию белка-репрессора, и он теряет сродство к оператору,

открывая путь РНК-полимеразе для осуществления синтеза мРНК генов *lac*-оперона. Такой тип регуляции получил наименование *негативной индукции*.

Однако для обеспечения высокого уровня транскрипции необходимо связывание катаболитного белка-активатора (CAP) со специфическим сайтом в промоторе, расположенным непосредственно перед участком связывания РНК-полимеразы. Этот процесс контролируется глюкозой: при высокой концентрации этого легкоусваиваемого сахара блокируется синтез сАМР, который способен активировать CAP, и связывания белка-активатора с промотором не происходит.

Арабинозный оперон *E. coli* имеет сходную с вышеописаным структурную организацию, однако он работает по принципу *позитивной индукции*. Разница в регуляции состоит в том, что добавленная в среду арабиноза взаимодействует с белком-репрессором и, освобождая операторный участок, одновременно превращает его в белок-активатор, способствующий связыванию РНК-полимеразы с промотором и эффективной транскрипции генов всего оперона. Как только концентрация арабинозы в культуральной среде становится чрезвычайно низкой, синтезирующийся белок-репрессор вновь связывается с оператором, выключая транскрипцию (Ogden *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1981).

Кроме индукции известны такие же два типа регуляции по принципу репрессии. Если при негативной индукции эффектор (индуктор) препятствует связыванию белка-репрессора с оператором, то при *негативной репрессии*, наоборот, эффектор придает регуляторному белку способность присоединяться к оператору. Примером негативной репрессии может служить хорошо изученный триптофановый оперон *E. coli* (Platt, 1981; Yanofsky, 1981; Yanofsky *et al.*, 1981), относящийся к группе полицистронных оперонов (в отличие от моно- или олигоцистронных). В его состав входят пять генов, продукты экспрессии которых обеспечивают синтез триптофана (Trp). Пока клетка активно расходует весь синтезирующийся Trp, оперон работает. Если в клетке наблюдается избыток Trp, то он образует комплекс с регуляторным белком, вследствие чего последний приобретает сродство к оператору, связывается с ним и блокирует транскрипцию генов *trp*-оперона. При *позитивной репрессии* эффектор лишает регуляторный

белок способности связываться с оператором, обуславливая, таким образом, транскрипцию структурных генов.

Следует отметить, что регуляторные участки, особенно промоторно-операторные, именно вышеописанных оперонов стали первым надежным инструментарием генетической инженерии в плане решения задач по достижению эффективной экспрессии целевых генов в клетках *E. coli*. Получено множество мутантных вариантов этих регуляторных элементов, особенно *lac*- и *trp*-промоторов, включая и гибридные промоторно-операторные функциональные единицы (de Boer *et al.*, 1983; Brosius *et al.*, 1985; Smith and Johnson, 1988). Изучение молекулярных механизмов вирусной инфекции на примере различных бактериофагов, сопряженное с секвенированием их геномов, позволило выявить ряд сильных промоторов в фаговом геноме, перспективных для использования в генно-инженерных экспериментах и биотехнологии.

Накопление большого массива данных секвенирования геномных фрагментов различных бактерий и бактериофагов позволило выявить ряд закономерностей в строении промоторно-операторной области для подавляющего большинства оперонов. Так были установлены две консервативные области: область -35 (по координате от точки старта транскрипции) и область -10, именуемая боксом Прибнова. Первый регион служит местом первичного связывания РНК-полимеразы с промотором, второй – местом прочного связывания, с которого и может начаться процесс транскрипции.

В дальнейшем были картированы места взаимодействия различных субъединиц РНК-полимеразы с ДНК и установлена решающая роль субъединицы сигма в распознавании точек взаимодействия с промотором и инициации трансляции.

На рисунке 3.13 схематично показано выведение консенсусных последовательностей указанных выше промоторных областей и принцип взаимодействия РНК-полимеразы с промоторным участком в положении на старте транскрипции.

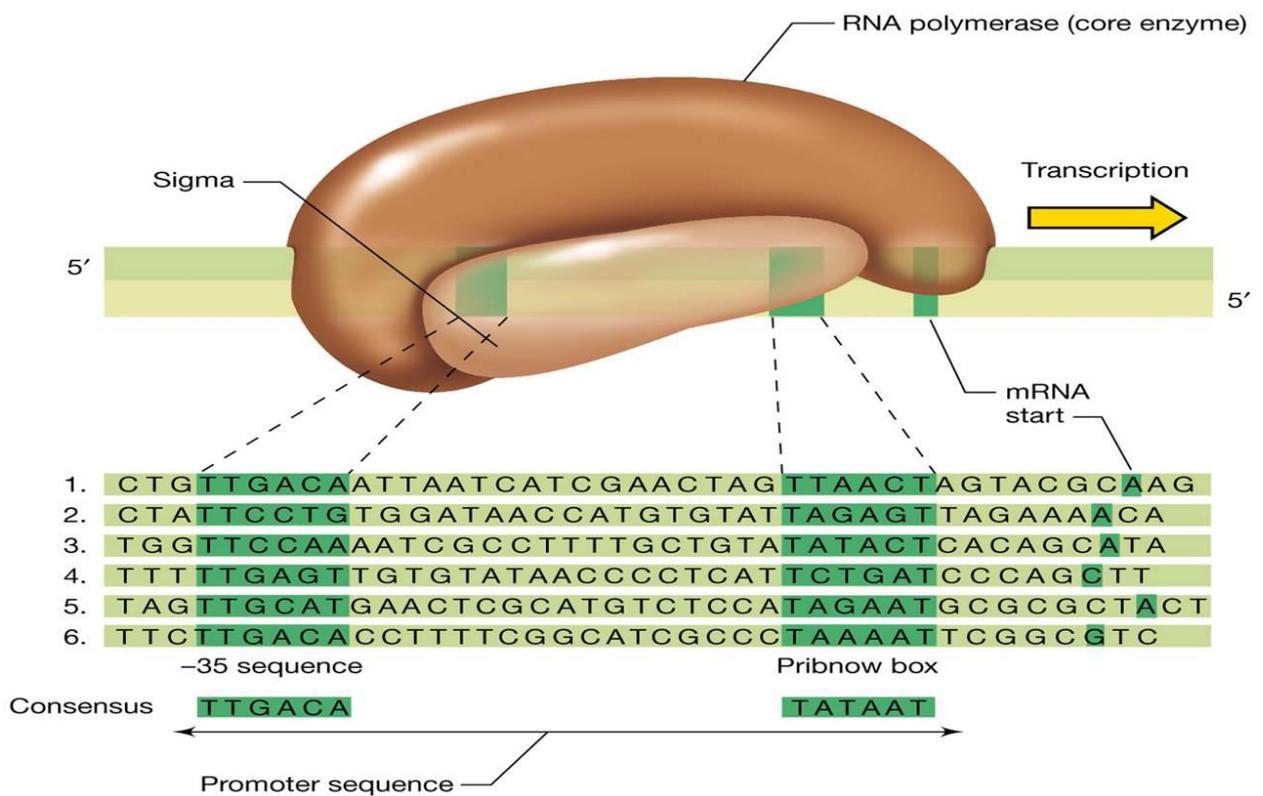


Рисунок 3.13 – Схема выведения консенсусных последовательностей областей -35 и -10 (бокс Прибнова) и механизм взаимодействия РНК-полимеразы с ДНК в области промотора (<http://202.204.115.67/jpkch/jpkch/2008/wswx/chapter%207/48.jpg>)

Ниже приведена краткая характеристика бактериальных и фаговых промоторов, наиболее часто используемых при конструировании прокариотических экспрессионных векторов.

- Бактериальные промоторы:

P_{trp} *E. coli*

Сильный промотор, позволяющий осуществлять как конститутивную, так и индуцибельную экспрессию клонированных чужеродных генов. Используемый индуктор – индолилуксусная кислота (Tacon *et al.*, 1980; Yansura and Bass, 1997).

P_{lac}, **P_{lacUV5}** *E. coli*

Не очень сильный промотор, но отлично подходит для получения химерных (слитых) белков, несущих целевую а/к последовательность вслед за а/к

последовательностью β -галактозидазы *E. coli*. Используется, например, в серии экспрессионных плазмид pUR. Мутантный вариант обеспечивает транскрипцию и в отсутствие активаторного белка CAP на промоторе. Используемый индуктор – ИПТГ (Maquat *et al.*, 1980).

P_{tac}, P_{trc} *E. coli*

Сильные гибридные промоторы, содержащие области -35 от промотора P_{trp} и -10 от промотора P_{tac}. Очень широко используются; из коммерческих векторных плазмид следует выделить серию pGEX (Pharmacia), pMAL (NEB) и pTrcHis (Invitrogene). Используемый индуктор – ИПТГ (de Boer *et al.*, 1983; Brosius *et al.*, 1985; Smith and Johnson, 1988).

P_{ara} (P_{BAD}) *E. coli*

Промотор арабинозного оперона. Его особенность состоит в возможности тонко регулировать эффективность транскрипции, поскольку она прямо пропорциональна концентрации индуктора в питательной среде. Базальный уровень транскрипции легко репрессируется по катаболитному механизму (CAP) добавлением глюкозы в ростовую среду. Используется в серии векторных экспрессионных плазмид pBAD (Invitrogen). Применяемый индуктор – L-арабиноза (Horwitz *et al.*, 1984; Miyada *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1987; Guzman *et al.*, 1992).

P_{phoA} *E. coli*

Промотор интересен тем, что способен обеспечить секрецию целевых рекомбинантных белков в периплазматическое пространство клеток-продуцентов, что зачастую помогает получить токсичный для клеток продукт экспрессии, который, накапливаясь в цитоплазме, быстро приводит к гибели клеток. Транспорт рекомбинантного белка в периплазму клетки происходит благодаря лидерному пептиду щелочной фосфатазы (PhoA), вслед за кодирующей последовательностью которой встраивается целевой ген (Kikuchi *et al.*, 1981; Sambrook and Russell, 2006).

P_{recA} *E. coli*, P_{recA} *Proteus mirabilis*

Оба гомолога представляют собой очень сильные индуцибельные бактериальные промоторы, позволяющие достичь высоких уровней синтеза

целевых рекомбинантных белков. Применяемые индукторы – митомицин С, налидиксовая кислота (Shirakawa *et al.*, 1984; Данилюк и др., 1987; Серегин и др., 1993а,б; Eroshkin *et al.*, 1995).

- Промоторы бактериофагов:

P_{T5}

Этот фаговый промотор узнается РНК-полимеразой *E. coli*; в плаزمидях серии pQE (Qiagen) промотор находится под контролем lac-репрессора, следовательно, индуцируется ИПТГ (Bujard *et al.*, 1987).

P_{T7}

Промотор фага T7 эффективно направляет транскрипцию генов в комплексе со своей РНК-полимеразой, которая, в свою очередь, не способна связываться с бактериальными промоторами. Требуется специальный штамм *E. coli*, содержащий ген T7-РНК-полимеразы под контролем lacUV5-промотора *E. coli*, о чем упоминалось выше в главе 3.1.5. Используется в плазмидях серии pET (Novagen); Для индукции применяется ИПТГ (Studier and Moffart, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987; Dubendorff and Studier, 1991a,b).

P_R фага λ

Сильный термоиндуцибельный промотор, находящийся под контролем термолабильного фагового белка-репрессора CI857. Используется в большом количестве вектров, например, в экспрессионных плазмидях pEX, pUEX, pUBEX. Условия индукции – сдвиг температуры культивирования от 32 °С до 42 °С (Кравченко и др., 1985; Bressan and Stanley, 1987; Mottl and Keck, 1991; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

P_L фага λ

Промотор подобен вышеназванному промотору фага λ. Часто находится в экспрессионных плазмидях под контролем термолабильного репрессора CI857. В этом случае индуцируется аналогично вышеописанному. Известна оригинальная экспрессионная система со строгим контролем транскрипции, которая позволяет успешно экспрессировать гены, продукты которых токсичны для клеток-продуцентов (Invitrogene). Целевой ген клонируется в одну из плазмид серии

pLEX, в которой фаговый промотор находится под контролем репрессора CI. Ген последнего интегрирован в бактериальную хромосому под контроль промотора триптофанового оперона *E. coli* P_{trp}. В отсутствие триптофана в культуральной среде ген репрессора экспрессируется, что приводит к строгой репрессии фагового промотора. Индукция осуществляется внесением триптофана в среду культивирования (Bernard *et al.*, 1979; Benito *et al.*, 1993; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Поскольку в настоящей работе представлены результаты по получению эффективных штаммов-продуцентов различных рекомбинантных белков, основанные на использовании *recA*-промотора *Proteus mirabilis*, имеет смысл подробнее описать работу оперона *recA* и рассмотреть экспрессионные системы, в которых используется этот промотор.

Белок RecA – ключевой фактор рекомбинации. Он участвует в обмене цепей ДНК при рекомбинации и рекомбинационной репарации, а также является индуктором SOS-путей репарации ДНК (Gottesman, 1981; Little and Mount, 1982; Льюин, 1987).

Естественным репрессором гена *recA* в бактериальной клетке является продукт гена *lexA*. Ген *recA* в обычном состоянии репрессирован белком-репрессором LexA, однако имеет место базальный уровень синтеза белка RecA. Белок LexA кроме гена *recA* репрессировывает и другие гены, продукты экспрессии которых принимают участие в репарационных процессах (так называемые *din*-гены, от англ. *damage inducible*).

Активатором функциональной активности белка RecA является сильное воздействие на бактериальную клетку, приводящее к повреждению ДНК (митогены, УФ-облучение), вследствие чего белок приобретает специфическую протеазную активность (расщепляет мишени по Ala-Glu-последовательности, находящейся в середине полипептидной цепи) и разрезает репрессор, что снимает репрессию с *din*-генов. В результате происходит быстрый синтез необходимых белковых факторов для осуществления SOS-репарации, при этом синтез репрессора не прекращается, но в активированном состоянии белок RecA успешно справляется с расщеплением вновь синтезированных молекул белка LexA. По завершении процесса репарации (устранении повреждающего воздействия) белок RecA переходит в неактивное состояние и теряет способность гидролизовать

репрессор, последний вновь репрессирует все *din*-гены, включая и ген *recA* (Gottesman, 1981; Little and Mount, 1982; Льюин, 1987).

Совершенно очевидно, что функционировать подобным образом белок RecA может только в случае высокоэффективной транскрипции гена, направляемой сильным промотором. Поэтому использование этого промотора в генетической инженерии для получения перспективных рекомбинантных белков в плане создания на их основе иммунобиологических препаратов является вполне оправданным.

С использованием *recA*-промотора *P. mirabilis*, помимо описанных в настоящей работе генетических конструкций и полученных на их основе штаммов-продуцентов ряда рекомбинантных белков, были созданы рекомбинантные плазмиды, эффективно экспрессирующие как природные, так и искусственные гены и ген-эквиваленты, которые послужили основой перспективных штаммов-продуцентов нескольких белков.

В первую очередь следует отметить достижение эффективной экспрессии искусственного гена интерлейкина-2 (IL-2) человека (Данилюк и др., 1987). Целевая плазида pIL-2/21 содержит ген под контролем вышеназванного промотора и фрагмент генома фага λ с ρ -независимым терминатором транскрипции t_0 и обеспечивает в бактериальных клетках очень высокий уровень синтеза целевого белка – 45-50 мг/л бактериальной культуры. В дальнейшем А. Б. Беклемишев и И. Д. Иванов на основе этой плазмиды получили рекомбинантные плазмиды, направляющие синтез фрагментов двух антигеннозначимых белков *Borrelia garinii* (FlaB и OspC), слитых с сигнальной а/к последовательностью α -токсина *Staphylococcus aureus* (Беклемишев и Иванов, 2003; Беклемишев, 2004). Авторы заменили фрагмент с геном IL-2 на один из целевых фрагментов ДНК (предварительно интегрировав олигонуклеотидные дуплексы, организующие в плазмиде кодоны для 6xHis и сигнальной последовательности α -токсина *S. aureus*), поэтому ниже на рис.3.14 приведена для примера физическая и рестриктная карта лишь одной из описанных выше плазмид.

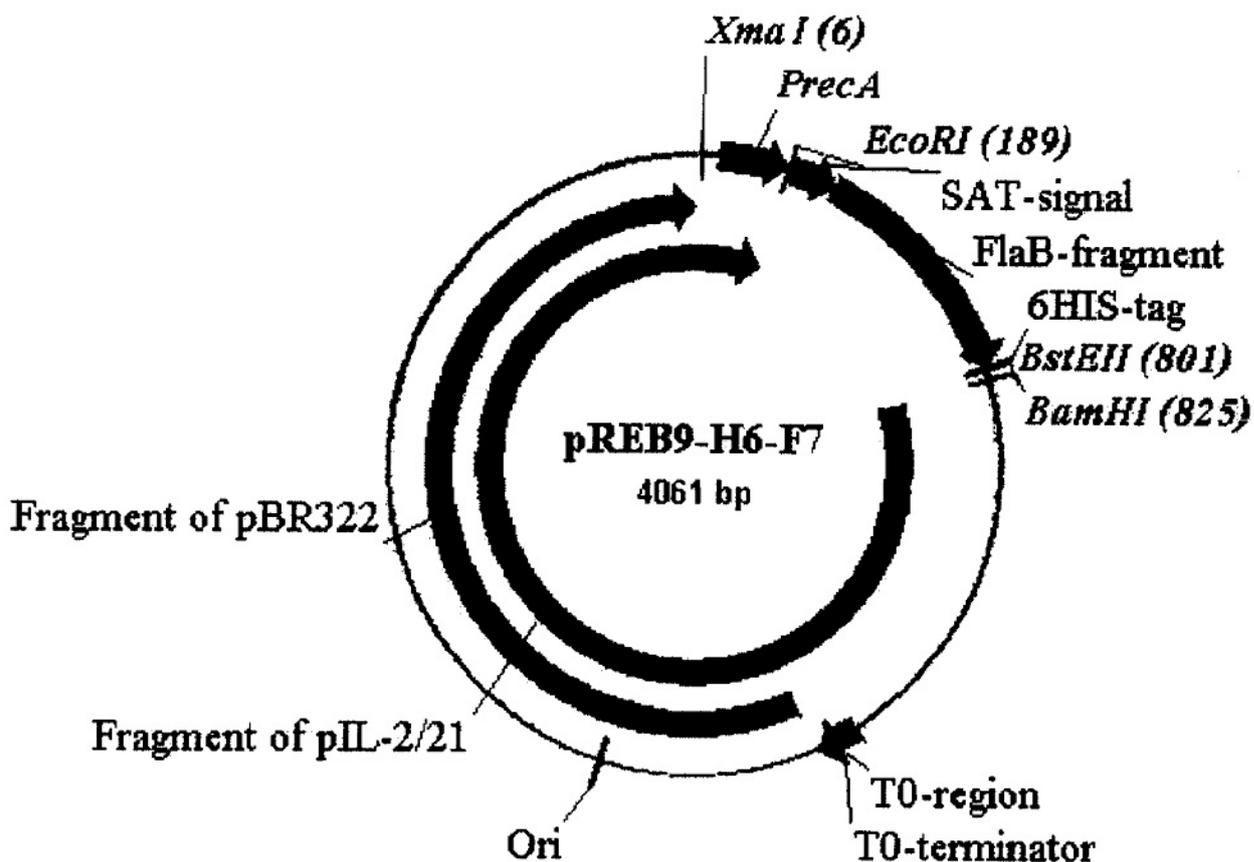


Рисунок 3.14 – Физическая и рестриктная карта плазмиды pREB9-H6-F7, направляющая синтез фрагмента белка FlaB *B. garinii* под контролем *recA*-промотора *P. mirabilis* (Беклемишев и Иванов, 2003)

А. М. Ерошкин с соавторами (Eroshkin *et al.*, 1995) под контролем *recA*-промотора *P. mirabilis* добились высокого уровня экспрессии искусственного ген-эквивалента, кодирующего ТВ1-иммуноген ВИЧ-1 – иммуноген, содержащий Т- и В-клеточные эпитопы (Т and В cell epitopes containing Immunogen). Подробное описание этого рекомбинантного белка и способ его применения для создания перспективных вакцинных препаратов нового поколения даны в подразделе 3.2 данного раздела.

Несомненно, стоит отметить еще одну оригинальную разработку с использованием *recA*-промотора *P. mirabilis*. Авторы сконструировали рекомбинантные плазмидные ДНК, обеспечивающие синтез мутантного флуоресцирующего белка GFP из *Aequorea victoria* в Rec⁺ штаммах *E. coli* под

контролем этой регуляторной области. Они предложили использовать полученные плазмиды для обнаружения повреждающих клеточную ДНК агентов, как физических, так и химических (Рябченко и др., 2005; Лавриненко и др., 2006; Lavrinenko *et al.*, 2006). Принцип работы основан на включении *recA*-промотора при запуске генетическим аппаратом клетки механизма SOS-репарации, который подробно был обсужден выше. Авторы продемонстрировали высокую чувствительность предложенного метода при обнаружении ряда повреждающих ДНК факторов химической природы, а также повреждающих физических воздействий (УФ-облучение).

На рисунке 3.15 представлена физическая и рестриктная карта плазмиды pRTGFP2, предназначенной для обнаружения повреждающих клеточную ДНК агентов. Для увеличения чувствительности предложенного метода авторы модифицировали первоначально полученную плазмидную ДНК pRTGFP, сконструированную на основе вышеупомянутой плазмиды pIL-2/21, внедрив в ее структуру дополнительные элементы, повышающие эффективность трансляции целевой мРНК: энхансер трансляции гена 10 фага T7 (Cheng and Patterson, 1992) и последовательность Шайн-Дальгарно (de Voer *et al.*, 1983).

Другим важным регуляторным элементом экспрессии генов является *терминатор транскрипции*, обеспечивающий прекращение элонгации мРНК целевого гена (оперона) после считывания полной кодирующей последовательности. Известно, что избыточный 3'-концевой нетранслируемый район может негативно влиять на уровень синтеза целевого рекомбинантного белка, что может быть связано с образованием сложной третичной структуры, препятствующей эффективной трансляции мРНК (Sato *et al.*, 1987; Sorensen and Mortensen, 2005). Кроме того было установлено, что при отсутствии надежной терминации вслед за стоп-кодом трансляции при инициации транскрипции с сильного промотора снижается копияность рекомбинантной плазмиды, приводя к уменьшению уровня синтеза целевого белка (Stueber and Bujard, 1982; Deuschle *et al.*, 1986).

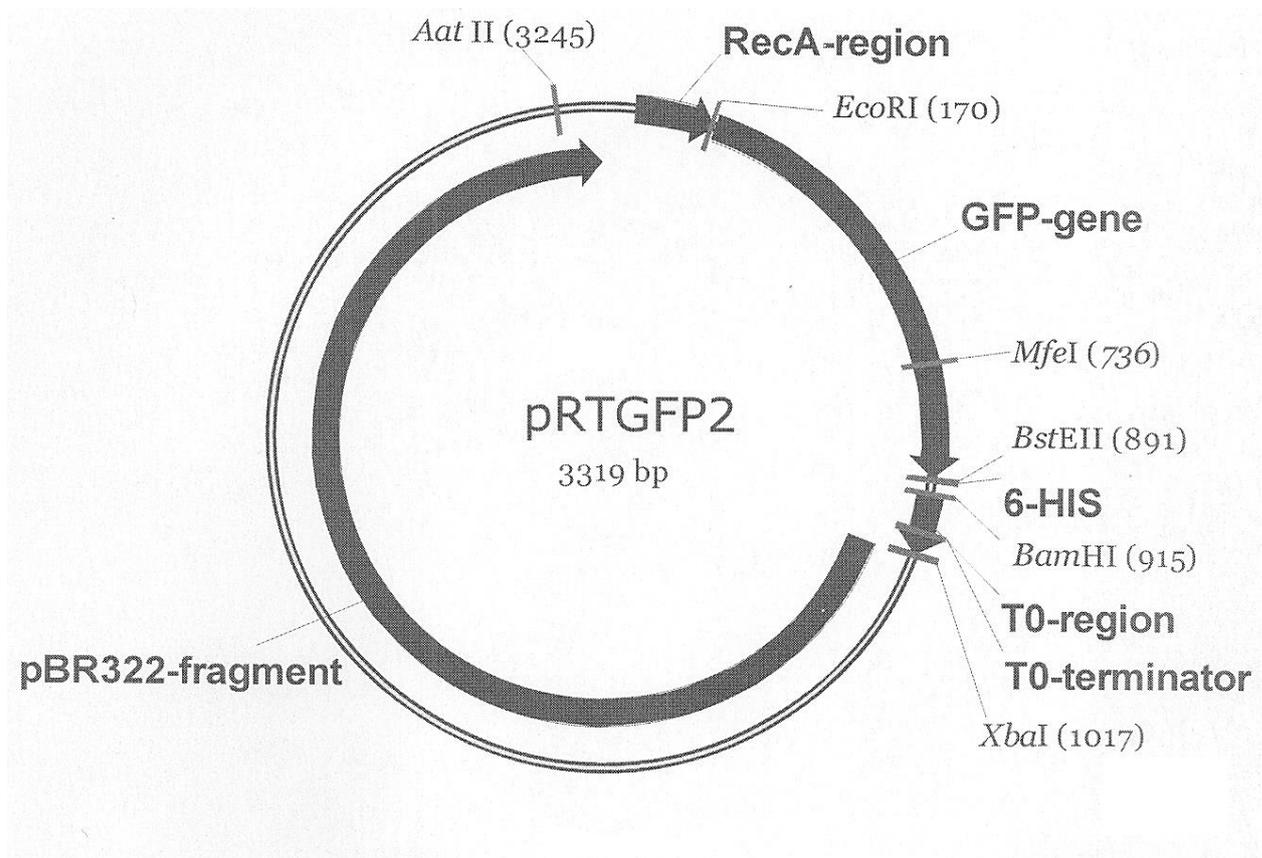


Рисунок 3.15 – Физическая и рестриктная карта плазмиды pRTGFP2, предназначенной для обнаружения повреждающих клеточную ДНК агентов (Рябченко и др., 2005)

Терминаторы транскрипции обычно разделяют на два вида: зависимые от ρ -фактора и не зависимые от него. На рисунке 3.16 приведено типичное строение двух видов терминаторов транскрипции на языке РНК. Как видно из рисунка, основное отличие состоит в том, что ρ -независимые терминаторы после шпилечного участка, богатого G-C-парами, несут олиго-U-мотив, тогда как у терминаторов, зависимых от ρ -фактора, преобладание G-C-пар в шпилечной структуре не так выражено, и вышеназванный мотив отсутствует (Льюин, 1987).

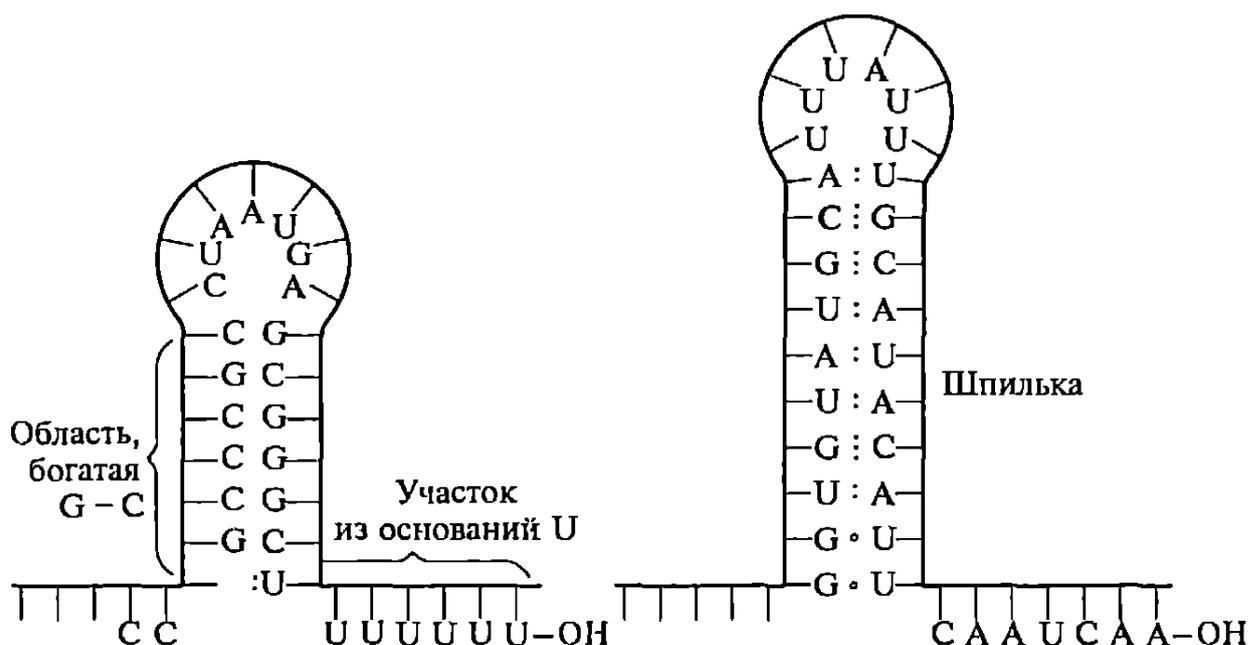


Рисунок 3.16 – Строение двух видов терминаторов транскрипции: ρ -независимый терминатор (слева) и ρ -зависимый (из (Льюин, 1987))

При конструировании различных плазмидных векторов в настоящее время принято использовать хорошо изученные сильные ρ -независимые терминаторы транскрипции, такие как, например, t_0 , t_1 и t_{xn} фага λ (Stueber and Bujard, 1982; Weighous and Tarpley, 1987), t_1 и t_2 оперона *rrnB* *E. coli* (Sarmientos *et al.*, 1983; Sorensen and Mortensen, 2005), t_{trpA} триптофанового оперона *E. coli* (Nilsson and Abrahmsén, 1990).

Таким образом, здесь рассмотрены основные способы регуляции транскрипции в прокариотических клетках и отмечены принципиальные моменты, на которые следует обратить внимание при выборе или конструировании экспрессионных векторов. Однако эффективный синтез мРНК не является достаточным условием эффективной экспрессии гена, иными словами, процесс трансляции, особенно его инициация, является важнейшим моментом и неотъемлемым условием успешного синтеза целевого белка.

В настоящее время основные механизмы инициации трансляции и взаимодействие различных элементов, в том числе макромолекул, в процессе

белкового синтеза изучены в достаточной мере с использованием разнообразных физико-химических методов, например, кристаллографии и электронной микроскопии (Allen *et al.*, 2005; Laursen *et al.*, 2005; Simonetti *et al.*, 2008), однако подробное рассмотрение этого вопроса выходит за рамки настоящего обзора.

Здесь автор попытается обсудить лишь структуру мРНК с точки зрения оптимальной трансляции. Принято выделять в районе иницирующего кодона трансляции *рибосом-связывающий участок* (RBS), который первоначально был определен как участок мРНК (около 15 нуклеотидов), защищенный рибосомой от нуклеазного расщепления (Steitz, 1969; Kozak, 2005).

Доминирующим кодоном инициации трансляции в клетках прокариот является AUG, однако не так уж редко встречаются и альтернативные стартовые кодоны трансляции – GUG или UUG (Blattner *et al.*, 1997). Поскольку связывание fMet-tРНК с такими кодонами менее эффективно, чем с AUG, уровень синтеза белка в этом случае намного ниже (Allen *et al.*, 2005). Таким образом, использование бактериальной клеткой кодонов с различной эффективностью инициации трансляции является одним из важнейших механизмов регуляции экспрессии генов на уровне трансляции. Очевидно, что при конструировании экспрессионных векторов и рекомбинантных плазмид, призванных обеспечить в бактериальных клетках эффективный синтез рекомбинантных белков, всегда выбирается доминирующий кодон инициации трансляции – AUG.

Для надежной инициации трансляции необходимо связывание мРНК с 3'-концом 16S-РНК 30S-субъединицы рибосомы (3'-AUUCCUCCAG.....-5'). Это обеспечивает так называемая *последовательность Шайн-Дальгарно* (SD), которая состоит из 4-5 нуклеотидов перед стартовым кодоном и отстает от него, как правило, на 5-9 нуклеотидов, что определяется тем, какие именно нуклеотиды мРНК вступают во взаимодействие с 3'-концевым участком 16S-РНК (Shine and Dalgarno, 1975; Chen *et al.*, 1994). Важно отметить, что 4-5 нуклеотидов вполне достаточно для оптимального взаимодействия и инициации трансляции, поскольку увеличение участка на мРНК, комплементарного 3'-концевому фрагменту 16S-РНК, практически не влияет на уровень синтеза белка, порой даже снижая его (Munson *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1994; Komarova *et al.*, 2002).

Спейсерный участок между SD и AUG может варьировать от 3 до 10 (чаще всего 5-8) нуклеотидов, и его влияние на эффективность инициации трансляции, несомненно, присутствует (Kozak, 2005), однако выявить некие общие закономерности не удалось. По-видимому, такое влияние сопряжено с рядом других факторов, влияющих на эффективность трансляции. Одним из таких факторов может быть 5'-концевой район гена. Было установлено, что A/U-богатые последовательности мРНК в этой области существенно облегчают инициацию трансляции, видимо, благодаря тому, что они не способны формировать стабильные вторичные структуры, которые могли бы препятствовать этому процессу (Chen *et al.*, 1994; Qing *et al.*, 2003).

В ряде работ отмечалось влияние на эффективность инициации трансляции пиридинового тракта, который взаимодействует с рибосомальным белком S1 (Boni *et al.*, 1991; Sengupta *et al.*, 2001). Были описаны также энхансерные элементы трансляции, которые могут быть расположены по обе стороны от иницирующего кодона (Zhang *et al.*, 1992; Sprengart *et al.*, 1996; O'Connor *et al.*, 1999).

Эффективная инициация трансляции не единственный фактор, влияющий на успешную экспрессию генов на уровне синтеза белка. Немаловажным моментом является стабильность молекул мРНК. Известно, что среднее время полураспада мРНК в клетках *E. coli* в оптимальных условиях составляет 20 мин (Regnier and Arraiano, 2000) и определяется активностью экзонуклеаз и эндонуклеазы РНКазы E (Carpousis, 2007). Понятно, что инициация трансляции защищает 5'-концевую область мРНК от действия нуклеаз благодаря взаимодействию последней с рибосомами, в то же время свободная 3'-концевая часть может быть защищена путем образования стабильных шпилечных структур, что было экспериментально показано Аречагой с соавторами при стабилизации мРНК субъединицы F₀ АТФазы *E. coli* фрагментом мРНК гена *gfp*, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (Arechaga *et al.*, 2003).

Еще одним интересным моментом является регуляция трансляции мРНК полицистронных оперонов. В самом деле, как отмечалось выше, оперонная организация является характерной для прокариот, следовательно, должны быть некие механизмы регуляции экспрессии различных цистронов (генов), входящих в их состав. Такая регуляция получила название *трансляционное сопряжение*. Ее

суть состоит в том, что трансляция дистальных генов оперона зависит от трансляции проксимальных. Смысл такого механизма состоит, по-видимому, в том, чтобы уровни экспрессии генов одного оперона могли быть строго согласованы.

Явление трансляционного сопряжения было обнаружено при изучении экспрессии генов триптофанового оперона *E. coli* (Oppenheim and Yanofsky, 1980; Das and Yanofsky, 1984). Затем этот механизм был выявлен для многих оперонов, в основном рибосомальных и метаболических (Sprengel *et al.*, 1985; McGraw *et al.*, 1986; Blumer *et al.*, 1987).

Поскольку в настоящее время в плазмидных векторах полицистронная экспрессия генов используется редко, автор не будет подробно касаться различных аспектов регуляции трансляции мРНК полицистронных оперонов, а заинтересованному читателю рекомендует ознакомиться с работой И. П. Гилевой (Гилева, 2011), в которой все подобные аспекты рассмотрены в полной мере.

Таким образом, в заключении следует констатировать, что в настоящее время существует большое количество способов получения генов и методов их клонирования. В арсенале генного инженера сегодня огромный набор клонирующих и экспрессионных векторов, великолепная ферментная база. Все это позволяет решать многие задачи, как научные, так и прикладные. Тем не менее, зачастую возникает потребность осуществить реконструкцию имеющихся векторных ДНК. Это диктуется порой особенностями конкретной задачи, стоящей перед исследователем, ведь не секрет, что универсальных экспрессионных систем не бывает, и порой гораздо грамотнее провести рациональную реконструкцию определенной векторной молекулы, чем просто перебирать коммерческие вектора в надежде на успех. И в этом смысле понимание тех аспектов генетической инженерии, которые кратко рассмотрены в настоящем обзоре, совершенно необходимо.

3.2 Перспективы вакцинологии – применение ДНК-вакцин

3.2.1 Основные принципы конструирования ДНК-вакцин и механизм их действия

В середине прошлого столетия появилась идея использовать определенные ДНК для вакцинации. Началом развития этого направления можно считать установление факта транскрипции и трансляции генетической информации после переноса ДНК в другую клетку (Atanasiu *et al.*, 1950; Ito, 1961). Чуть позже было установлено, что введение животным генома полиомавируса вызывает у последних выработку антител (Atanasiu *et al.*, 1962; Orth *et al.*, 1964).

Тем не менее, активная фаза исследований иммуностимулирующих свойств ДНК берет свое начало с 90-х годов прошлого столетия. В 1992 г. Д. Танг с соавторами показал, что ген гормона роста человека в составе плазмидного вектора стабильно экспрессируется в организме мыши, а синтезированный рекомбинантный гормон распознается иммунной системой как антиген и индуцирует наработку специфических антител (Tang *et al.*, 1992). Танг предложил термин «генетическая иммунизация», под которым он понимал введение плазмидной ДНК для стимуляции гуморального иммунитета.

Однако вскоре было установлено, что введение плазмиды, экспрессирующей гены вируса гриппа, вызывает не только гуморальный, но и клеточный ответ (Ulmer *et al.*, 1993). Такой же эффект был описан и для плазмидных конструкций, содержащих гены ВИЧ-1 (Wang *et al.*, 1993). Вскоре было показано, что ДНК-вакцины способны к активации иммунной системы против некоторых раковых заболеваний (Conry *et al.*, 1995; Chattergoon *et al.*, 1997).

Именно результаты вышеприведенных первых исследований по изучению последствий ДНК-вакцинации обеспечили возможность проведения доклинических, а затем и клинических испытаний ряда перспективных ДНК-вакцин, которые продемонстрировали безопасность нового метода. Результаты исследований оказались вполне обнадеживающими: ДНК-вакцины стабильно экспрессировали гены целевых иммуногенов инфекционных агентов, вызывая специфический иммунный ответ и при этом не демонстрируя серьезных побочных эффектов, что стало мощным стимулом для продолжения исследований

в направлении разработки новых ДНК-вакцин (Webster *et al.*, 1994; Hooper *et al.*, 1999; Riemenschneider *et al.*, 2003; Ferraro *et al.*, 2011).

При разработке ДНК-вакцины особое внимание следует обратить на конструкцию экспрессионного вектора. Прежде всего, необходимо использовать надежный сильный промотор, обеспечивающий стабильно высокий уровень экспрессии целевых генов, и снабдить конструкцию эффективным сигналом полиаденилирования целевой мРНК и терминации транскрипции (Doria-Rose and Haigwood, 2003). Кроме того, подобные экспрессионные вектора, как правило, содержат два селективных маркера (обычно это гены антибиотиков) и два сайта начала репликации, специфичные как для прокариотических, так и для эукариотических клеток.

В качестве сильных промоторов очень хорошо себя зарекомендовали: промотор из длинных концевых повторов (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV) и предранний промотор цитомегаловируса (CMV); а сигналы полиаденилирования и терминации транскрипции обычно используют от генов гормона роста крупного рогатого скота, кроличьего β -глобина или вируса SV40 (Chapman *et al.*, 1991; Ertl and Thomsen, 2003; Williams *et al.*, 2009). На рисунке 3.17 приведена структура типичной векторной плазмиды pcDNA3.1 (+/-) с двумя различными полилинкерными участками, содержащими большой набор уникальных сайтов рестрикции, обеспечивающих удобство клонирования целевых генов.

В ряде случаев уровень экспрессии целевых генов может быть существенно повышен благодаря оптимизации их кодонового состава, то есть выбору наиболее предпочтительных кодонов а/к для экспрессии генов в эукариотах (Wang *et al.*, 2006; Williams, 2013). И, наконец, следует обратить внимание на наличие оптимального окружения иницирующего кодона (ATG) в соответствии с правилом консенсусной последовательности Kozak, которая предопределяет эффективность трансляции мРНК в эукариотических клетках. Сама последовательность Kozak не является сайтом связывания с рибосомой, однако способна существенно модулировать уровень трансляции целевой информационной РНК (Kozak, 1984, 1987, 1997).

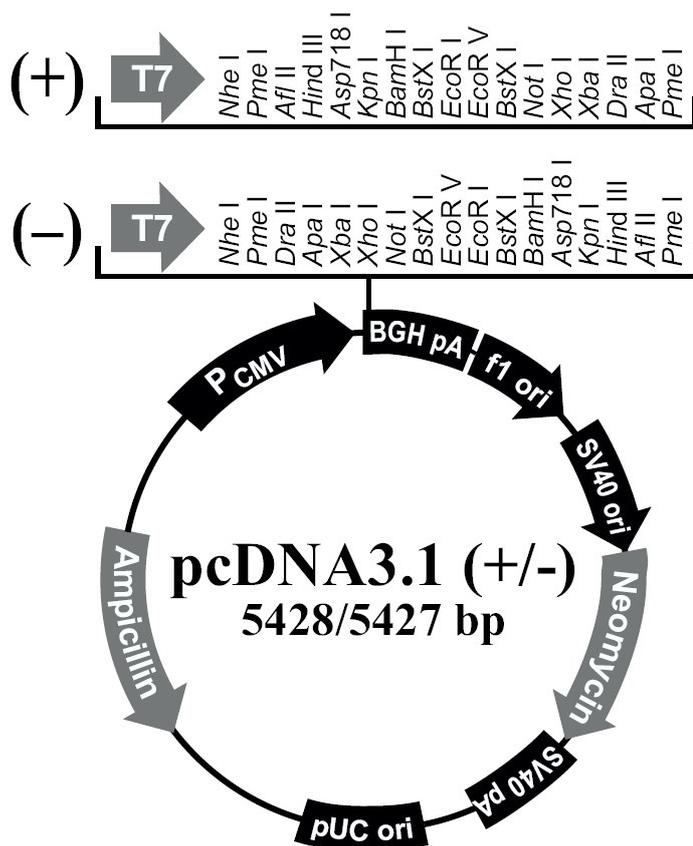


Рисунок 3.17 – Структура типичной векторной плазмиды pcDNA3.1 (+/-), используемой для конструирования ДНК-вакцин (Invitrogen, США)

Зачастую перестройки в непосредственной близости от промоторов и внедрение прокариотических последовательностей могут негативно влиять на уровень экспрессии целевых генов в эукариотических клетках, что может быть обусловлено неспецифическим связыванием эукариотических факторов транскрипции (Peterson *et al.*, 1987; Kushner *et al.*, 1994; Hartikka *et al.*, 1996).

Следует отметить, что на иммуногенность ДНК-вакцин сильное влияние оказывают неметилованные CpG-последовательности, которые могут содержаться в плазмидной векторной ДНК (Sato *et al.*, 1996). Дело в том, что в геномной ДНК млекопитающих CpG-последовательности встречаются в 10-20 раз реже и те, преимущественно, в метилированном состоянии (Williams *et al.*, 2009). Неметилованные CpG-кластеры вызывают неспецифический иммунный ответ посредством взаимодействия с рецепторами TLR9 по пути Т-хелперов 1-го типа,

усиливая презентацию молекул МНС-II класса на поверхности антиген-презентирующих клеток (Jacob *et al.*, 1998).

Во многих работах отмечалось, что плазмидная ДНК, содержащая CpG-последовательности, достоверно стимулирует пролиферацию лимфоцитов, натуральных киллеров и антиген-презентирующих клеток (АПК), что приводит к секреции таких иммуномодулирующих цитокинов, как γ -IFN, α -TNF, IL-1, IL-6, IL-12, а также ряда хемокинов и полиреактивных IgM (Krieg *et al.*, 1995; Klinman *et al.*, 1996; Lipford *et al.*, 1997; Sparwasser *et al.*, 1998; Takeshita *et al.*, 2000).

Однако, безусловно, определяющая роль в эффективности ДНК-вакцины принадлежит выбранному целевому гену, который призван обеспечить активацию иммунитета (в идеале как клеточного, так и гуморального). Именно в этом и состоит основная задача генных инженеров: провести грамотный дизайн предполагаемого иммуногена, синтезировать или выделить из природных источников его ген (гены) либо фрагменты генов и получить кандидатную ДНК-вакцину для проведения дальнейших исследований с целью определения всех аспектов ее вакцинного потенциала.

Таким образом, при разработке ДНК-вакцинных конструкций необходимо учитывать множество факторов, способных модулировать эффективность создаваемого ДНК-вакцинного препарата.

Как уже отмечалось выше, ДНК-вакцины могут активировать оба звена иммунного ответа – и клеточный, и гуморальный, – тем не менее, индукция клеточного иммунитета превалирует над гуморальным в большинстве случаев. Рассмотрим три основных пути, по которым чужеродный антиген, кодируемый ДНК-вакциной, может вызывать иммунный ответ.

Во-первых, возможна непосредственная доставка ДНК-вакцины в АПК костномозгового происхождения, которые способны презентировать антиген Т-лимфоцитам; во-вторых, не исключена непосредственная презентация антигена этим клеткам иммунной системы соматическими или другими МНС-II-негативными трансформированными клетками; в-третьих, зачастую наблюдается перекрестная презентация антигена, когда антиген, продуцируемый трансформированными соматическими клетками, захватывается АПК и презентуется Т-лимфоцитам (Gurunathan *et al.*, 2000). Неспецифический

иммунный ответ возможен, как отмечалось выше, благодаря наличию неметилованных CpG-последовательностей в плазмидной ДНК, которые благодаря взаимодействию с рецепторами TLR9, расположенными на мембране эндосом дендритных и других клеток иммунной системы, стимулируют его развитие по пути Т-хелперов 1-го типа. На рисунке 3.18 представлена общая схема механизма действия ДНК-вакцины.

А. Ивасаки с соавторами показал, что определяющую роль в индукции клеточного иммунного ответа при ДНК-вакцинации играют АПК костномозгового происхождения (Iwasaki *et al.*, 1997b). В дальнейшем в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было установлено, что именно дендритные клетки, а не В-лимфоциты или кератиноциты, непосредственно презентуют антиген Т-лимфоцитам, хотя их способность к трансформации очень низка (Casares *et al.*, 1997).

Эффективность ДНК-вакцины при внутримышечной иммунизации привела к мысли, что мышечные клетки играют важную роль в индукции иммунного ответа (Tang *et al.*, 1992). Однако это утверждение вступает в противоречие с тем фактом, что хотя мышечные клетки и экспрессируют молекулы МНС-I класса на своей поверхности, они не способны к экспрессии рецепторов CD80 и CD86, необходимых для активации Т-лимфоцитов (Ройт и др., 2000). Подтверждением этому может служить работа А. Ивасаки с соавторами, в которой продемонстрировано, что мышечные клетки способны к эффективной стимуляции Т-лимфоцитов при котрансформации их плазмидой, содержащей ген CD86 (Iwasaki *et al.*, 1997a). В дальнейшем С. А. Торрес и соавторы убедительно доказали несущественную роль миоцитов в индукции иммунного ответа при введении ДНК-вакцины (Torres *et al.*, 1997).

Хардинг и Сонг продемонстрировали перекрестную презентацию антигенов, когда секретлируемые белки, наравне с эндогенными, представляются в комплексе с антигенами МНС-I класса, праймируя CD8+ Т-лимфоциты, причем соматические клетки, трансформированные ДНК-вакциной, выступают в роли резервуара антигена для АПК (Harding and Song, 1994).

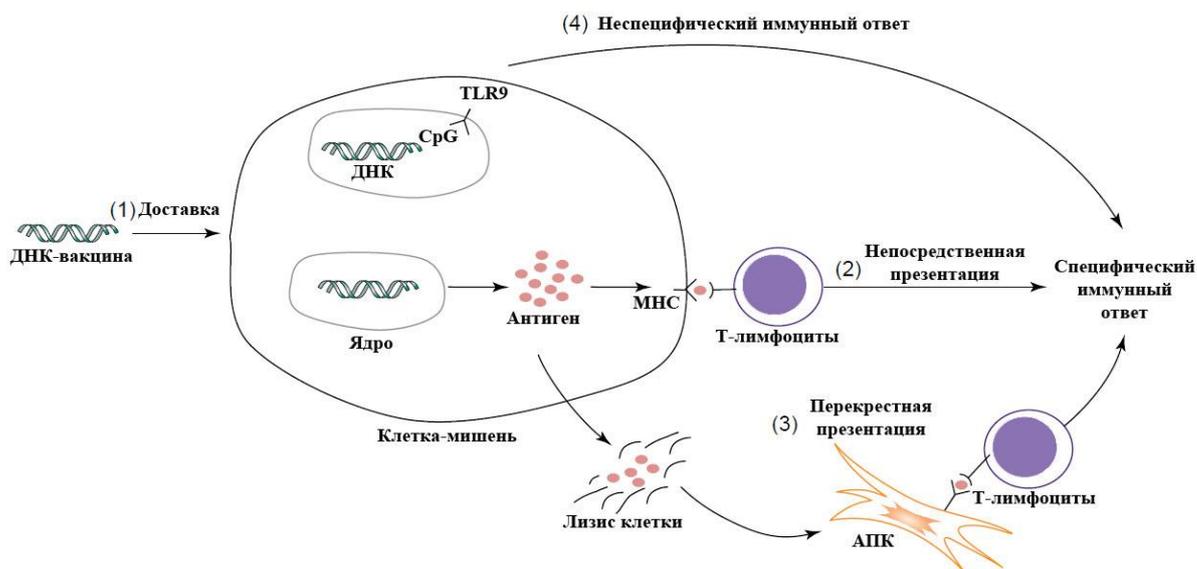


Рисунок 3.18 – Общая схема механизма действия ДНК-вакцины
 ((Ulmer *et al.*, 2006) с изменениями по (Максютов, 2010))

Необходимо подчеркнуть, что важным достоинством ДНК-вакцины является ее способность наравне с живыми аттенуированными вакцинами активировать CD8+ Т-лимфоциты посредством МНС-I-пути презентации антигена, что приводит к гибели инфицированных клеток. При этом ДНК-вакцина, безусловно, более безопасна, чем любая живая, пусть и аттенуированная, вакцина.

Вместе с тем секретируемый соматическими клетками антиген во взаимодействии с Т-хелперами 2-го типа индуцирует В-лимфоциты, что приводит к формированию гуморального иммунитета. При этом зачастую отмечается способность ДНК-вакцины активировать наработку вируснейтрализующих антител, что свидетельствует о нативной конформации синтезируемого трансформированными клетками белка-антигена (Sakhatskyu *et al.*, 2006).

Совершенно очевидно, что отличительной особенностью любой успешной вакцины является ее способность вызывать долговременную иммунологическую память у вакцинированного индивидуума. В отношении гуморального иммунитета показано, что ДНК-вакцины способны приводить к формированию иммунологической памяти, но в значительной мере это зависит как от выбранного антигена, так и от способа доставки самой ДНК-вакцины (Gurunathan *et al.*, 2000).

Относительно клеточного иммунитета было показано, что в течение 40 недель после иммунизации ДНК-вакциной сохранялся повышенный уровень антигенспецифичных CD4+ Т-лимфоцитов, а CD8+ Т-киллерная активность фиксировалась и через 68 недель после вакцинации (Raz *et al.*, 1994; Akbari *et al.*, 1999).

3.2.2 Проблемы создания эффективных вакцин против ВИЧ/СПИД

Стратегии создания вакцины против ВИЧ-1 весьма многообразны. Они основаны на использовании различных форм вирусного антигена, включая инактивированный вирус, модифицированный вирус, аттенуированный живой вирус, нативные белки, генноинженерные белки и их фрагменты, а также рекомбинантные бактерии, вирусы и плазмидные ДНК (Cease and Berzofsky, 1994). Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки, которые получили свою оценку, однако проблема создания надежной и эффективной анти-ВИЧ-1-вакцины до сих пор не решена.

В этой связи можно выделить несколько основных факторов, которые сдерживают прогресс в разработке подобных вакцин.

Во-первых, ВИЧ обладает высокой антигенной изменчивостью, в результате чего иммунная система просто не успевает переключаться на новые антигенные варианты. Во-вторых, не совсем понятно, какой иммунный ответ является более важным в предотвращении инфекции: гуморальный или клеточный, то есть индукция антител или активация цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). В-третьих, вирусные белки содержат районы, которые обладают патогенными свойствами вследствие молекулярной мимикрии с физиологически важными белками инфицированного организма, вызывая развитие аутоиммунных реакций. В-четвертых, для изучения ВИЧ-инфекции отсутствуют надежные экспериментальные модели. Как известно, только шимпанзе могут быть инфицированы ВИЧ-1, однако, эти животные вряд ли являются удобной моделью для изучения ВИЧ-инфекции и анти-ВИЧ-вакцин.

Несмотря на перечисленные проблемы, исследования по созданию вакцины против ВИЧ/СПИД не прекращаются, поскольку нет никакого другого пути, чтобы блокировать или, по крайней мере, ослабить быстрое распространение ВИЧ во всем

мире. Эта мысль уже давно овладела умами ученых, которые прилагают все усилия в этом направлении и считают, что создание эффективной и безопасной вакцины является вполне осуществимой задачей (McMichael and Hanke, 1999). И совершенно ясно, что для решения такой непростой задачи потребуются поиск новых подходов к разработке как самих вакцин, так и систем и способов их доставки.

В базе данных Международной инициативы по созданию вакцины против СПИДа (IAVI) по состоянию на апрель 2015 г. зарегистрировано 264 клинических испытания, которые были проведены (либо продолжаются) за всю историю разработки кандидатных вакцин против ВИЧ/СПИД (с 1988 г.). Подавляющее большинство исследований (217 вакцин) относились к I фазе клинических испытаний, в ходе которых определяли безопасность и иммуногенность кандидатных вакцин (IAVIReport: <http://www.iavireport.org/Trials-Database>).

Приведенные исследования включали в себя различные подходы с использованием как простых схем, так и прайм-буст-иммунизации в комбинации белков или пептидов, поксвирусных, аденовирусных, альфавирусных либо флавивирусных векторов, ДНК-вакцин в различных сочетаниях, вирусоподобных частиц либо рекомбинантных бактерий. Больше половины всех испытаний приходится на долю США, остальные проводились, либо проводятся, в основном, в странах Европы, Африки и Азии (Pitisuttithum *et al.*, 2006; 2010). До фазы II дошли 25 вакцин, из которых 10 представлены ДНК-вакцинами (в комбинации, как правило, с аденовирусными и поксвирусными векторами), но ни одна из ДНК-вакцин пока не завершила успешно II фазу клинических испытаний. И, наконец, лишь 3 вакцины были допущены и завершили III фазу клинических испытаний, что позволяло надеяться на скорое появление первых одобренных надежных вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД, однако, полученные результаты оставляли желать лучшего (McKinnon and Card, 2010; Saunders *et al.*, 2012; IAVIReport: <http://www.iavireport.org/Trials-Database>).

Условно можно все исследования по созданию вакцин против ВИЧ-1 в историческом аспекте разделить на три этапа, когда в основу были заложены разные подходы к конструированию вакцины (Esparza and Osmanov, 2003; Esparza *et al.*, 2006; Esparza, 2013). Рассмотрим ниже доминирующие концепции, на основе

которых разрабатывались вакцины против ВИЧ-1 в различные периоды (Esparza, 2013).

Первый этап: основная идеология состояла в получении иммуногена, индуцирующего вируснейтрализующие антитела (1988-2003 гг.).

Первая концепция, на основе которой создавались вакцины против ВИЧ-1, заключалась в получении вирусных антигенов, способных индуцировать гуморальный иммунитет. На этом этапе считалось, что вакцина, которая будет способна обеспечить наработку вируснейтрализующих антител, обеспечит эффективную защиту от ВИЧ-инфекции. Такая концепция основывалась на предшествующем опыте получения успешных вакцин против других вирусных инфекций, которые вызывают индукцию специфических антител и блокируют развитие инфекции (Plotkin, 2010).

Большинство разработок первых кандидатных вакцин против ВИЧ-1 в конце 1980-х и начале 1990-х гг. было основано на использовании в качестве антигенов поверхностных гликопротеинов вируса (в основном, gp120 или gp160), которые ответственны за связывание вируса с рецепторами на инфицируемых клетках и являются главной мишенью для нейтрализующих антител. Однако вскоре было установлено, что индуцированные такими вакцинами ВИЧ-специфичные антитела способны к нейтрализации лишь лабораторных штаммов ВИЧ-1, но никак не первичных клинических изолятов, выделяемых от инфицированных пациентов (Cohen, 1994).

Несмотря на вышесказанное, специалисты компании VaxGen приняли решение провести первые масштабные клинические испытания вакцин против ВИЧ-1 (AIDSVAX B/B и AIDSVAX B/E), которые были основаны на использовании рекомбинантного белка gp120 нескольких субтипов ВИЧ-1 и позиционировались как профилактические препараты (Adis International Ltd., 2003; Flynn *et al.*, 2005; Pitisuttithum *et al.*, 2006).

III фаза клинических испытаний AIDSVAX B/B проводилась в США и Канаде а также в Пуэрто-Рико и Голландии. В исследовании участвовало 5108 мужчин, имеющих гомосексуальные контакты, и 309 женщин из групп риска, причем все добровольцы являлись ВИЧ-негативными на момент начала испытаний. В 2003 г. компания VaxGen объявила о неэффективности вакцины AIDSVAX B/B, так как

она не способна защитить от ВИЧ-инфекции, поскольку не было выявлено статистически значимого снижения темпов распространения ВИЧ-инфекции в исследуемой группе вакцинированных в сравнении с контрольной группой, получавшей плацебо.

III фаза клинических испытаний вакцины AIDSVAX B/E проводилась в Таиланде, где испытуемые (2500 человек) были на момент старта исследования ВИЧ-негативными потребителями внутривенных наркотиков. Результат этих широкомасштабных испытаний оказался аналогичным предыдущему (Pitisuttithum, 2006).

Второй этап: акцент вакцинных дизайнеров сместился в сторону иммуногенов, индуцирующих цитотоксический иммунный ответ (1995-2007гг.).

Немаловажную роль в смене доминирующего подхода к созданию эффективных вакцин против ВИЧ-1 сыграли отрицательные результаты клинических испытаний вакцин компании VaxGen, направленных на формирование гуморального иммунитета. Однако определяющая роль принадлежит все-таки факту накопления новых данных относительно большой значимости Т-клеточного звена иммунитета, особенно CTL-ответа (Watkins, 2008).

В первые годы этого столетия было опубликовано множество работ, демонстрирующих важность CD8+ Т-клеточного ответа в борьбе с ВИЧ-инфекцией, в которых авторы излагали результаты исследований, позволяющие понять динамику Т-клеточных иммунных реакций при ВИЧ-инфекции на модельных животных (McMichael *et al.*, 2000, 2010; McMichael and Rowland-Jones, 2001; McMichael and Hanke, 2002; Yu *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2007; Walker, 2007; Mudd *et al.*, 2012). Была установлена обратная корреляция между количеством ВИЧ-специфических CTL и вирусной нагрузкой в фазе острой инфекции, что обусловлено способностью CD8+ CTL ингибировать репликацию вируса и принимать участие в элиминации инфицированных клеток (Walker *et al.*, 1986; Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1999; Saez-Cirion *et al.*, 2007). Кроме того, было выявлено, что CD8+ Т-клетки памяти в течение продолжительного времени могут выполнять непосредственный иммунный надзор, персистируя в периферийных лимфоидных тканях в активном состоянии (Masopust *et al.*, 2001), и это существенно повышает шансы на

эффективность вакцины против ВИЧ/СПИД, способной индуцировать CD8+ Т-лимфоциты (McMichael, 2003).

Известно довольно большое количество кандидатных вакцин, направленных на стимуляцию Т-клеточного иммунного ответа, основанных на использовании рекомбинантных вирусных векторов, в основном, поксвирусных и аденовирусных, а также некоторых ДНК-векторов, которые были подробно рассмотрены выше (Schoenly *et al.*, 2008; Barouch, 2010; Pantaleo *et al.*, 2010).

Что касается совершенно нового направления в дизайне вакцин – конструирования искусственных полиэпитопных иммуногенов – об этом подробно речь пойдет ниже. А здесь необходимо отметить несколько кандидатных вакцин, направленных на индукцию Т-клеточного иммунного ответа, которые прошли наиболее масштабные испытания.

В первую очередь следует отметить вакцину MRKAd5 HIV-1 *gag/pol/nef* субтипа В, в состав которой входили три рекомбинантных аденовируса (на основе аденовируса серотипа 5): MRKAd5*gag*, MRKAd5*pol*, и MRKAd5*nef*. Эта вакцина прошла серию клинических испытаний в фазе IIb. На первом этапе исследования приняло участие 259 ВИЧ-негативных добровольцев, преимущественно из групп риска, из 4-х регионов мира (Северная и Южная Америка, Австралия и острова Карибского моря). Было достоверно зафиксировано формирование ВИЧ-специфического Т-клеточного ответа у большинства вакцинированных. Второй этап состоял в масштабном испытании в 5 регионах Южной Африки, где участвовало уже 800 здоровых добровольцев. К сожалению, вакцина полностью провалилась, не продемонстрировав никакой протективности (Gray *et al.*, 2011).

Хотелось бы упомянуть еще одну вакцину - DNA/rAd5 - на основе рекомбинантного аденовируса Ad5 и ДНК-вакцины. Схема вакцинации включала три иммунизации ДНК-вакциной, кодирующей белки Gag, Pol, Nef ВИЧ-1 субтипа В, и белок Env субтипов А, В, и С с последующим бустированием вирусным компонентом вакцины, кодирующим белки Gag и Pol субтипа В и белок Env субтипов А, В, и С (Hammer *et al.*, 2013). В данном исследовании приняло участие 2504 добровольца из групп риска. Испытания были начаты в 2009 г. и досрочно остановлены в 2013 г., после того как промежуточное тестирование иммунитета добровольцев и определение среди них ВИЧ-инфицированных индивидуумов

показало абсолютное отсутствие протективности комбинированной вакцины DNA/rAd5, равно как и у вакцины MRKAd5 HIV-1 *gag/pol/nef* субтипа В (D'Souza and Frahm, 2010; Hammer *et al.*, 2013).

Третий этап: окончательно сформировалось убеждение, что необходимо направить усилия на создание иммуногена, индуцирующего как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ (с 2007 г.).

Самым известным испытанием такого рода препарата является начатое в 2009 г. крупномасштабное исследование комбинированной анти-ВИЧ-1 вакцины под названием ALVAC-HIV (vCP1521)/AIDSVAX gp120 В/Е. Эта вакцина, по сути, представляет комбинацию двух ранее созданных вакцин, оказавшихся неэффективными в плане защиты от ВИЧ-инфекции: ALVAC-HIV (vCP1521), разработанная в компании Aventis Pasteur на основе рекомбинантного поксвирусного вектора, несущего гены белков ВИЧ-1 (*env*, *gag* и *pol*), и предназначенная для стимуляции Т-клеточного ответа, тогда как второй компонент – это уже известная нам (подробно описана выше) белковая вакцина AIDSVAX gp120 В/Е, предназначенная для индукции гуморального иммунитета (разработка компании VaxGen). Для праймирующей иммунизации использовали вирусный компонент вакцины (ALVAC-HIV (vCP1521)), для бустирования использовали белковый компонент вакцины (AIDSVAX gp120 В/Е).

Следует отметить, что это были самые крупномасштабные клинические испытания III фазы с привлечением 16402 ВИЧ-негативных гетеросексуальных добровольцев, не относящихся к группам риска, в возрасте от 18 до 30 лет. Главную задачу исследователи видели в оценке двух параметров: профилактика ВИЧ-1-инфекции и влияние вакцинации на показатели вирусной нагрузки после заражения.

В целом эффективность вышеназванной комбинированной вакцины составила 31,2 %, хотя было установлено, что вакцинация не влияет на степень виремии или количество CD4+ Т-лимфоцитов у добровольцев, у которых в последующем была диагностирована ВИЧ-1-инфекция (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009).

Подробный сравнительный анализ результатов клинических испытаний комбинированной вакцины ALVAC-HIV (vCP1521)/AIDSVAX gp120 В/Е и ранее

полученных результатов по испытанию вакцины AIDSVAX gp120 B/E позволил сделать определенные важные выводы.

Во-первых, не было обнаружено корреляции между титром вируснейтрализующих антител и защитой от инфицирования ВИЧ-1. Во-вторых, была отмечена важная роль в протективной защите тех антител, которые не обладают нейтрализующей активностью, однако, принимают участие в процессе клеточно-опосредованной цитотоксичности, зависимой от антител (Wren and Kent, 2011; Alpert *et al.*, 2012; Yates *et al.*, 2014). В-третьих, было установлено, что в обоих клинических испытаниях вакцины индуцировали активную выработку антител, нацеленных против одного и того же участка оболочечного гликопротеина gp120 ВИЧ-1, причем белковая вакцина, исследованная ранее, вызывала более высокий уровень синтеза большинства антител, чем сочетание прайм-буст-иммунизации с вирусным вектором в более успешном последнем клиническом испытании. Но необходимо отметить, что именно последний комбинированный подход с использованием двухкомпонентной вакцины обеспечил более надежную индукцию ВИЧ-специфических антител IgG3 у иммунизированных добровольцев по сравнению с участниками более раннего испытания (Yates *et al.*, 2014).

Таким образом, несмотря на определенный прогресс в создании эффективной вакцины против ВИЧ/СПИД, в целом проблема получения профилактических либо лечебных препаратов против этого опаснейшего заболевания еще далека от разрешения.

Выше была дана краткая характеристика состояния основных мировых разработок в направлении конструирования и испытания различных вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД, и теперь уместно рассмотреть, как обстоят дела в этом направлении в Российской Федерации.

В России также активно ведутся работы по созданию вакцины против ВИЧ-инфекции. На начало 2015 г. три вакцины, сконструированные в научных учреждениях РФ, успешно завершили I фазу клинических испытаний.

ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России совместно с НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН (г. Москва) разработали вакцину «ВИЧРЕПОЛ» – первую российской вакцину, успешно прошедшую фазу I клинических испытаний (Гудима и др., 2007). Созданная кандидатная вакцина основана на рекомбинантном

белке *gag*(24-41), конъюгированном с мощным синтетическим иммуномодулятором полиоксидонием. Рекомбинантный антиген включает а/к последовательности белков, кодируемых генами *gag* и *env* (*p24 + gp41*), которые являются консервативными для различных субтипов ВИЧ-1. Вакцина «ВИЧРЕПОЛ» показала безопасность использования по результатам фазы I клинических испытаний и получила разрешение на проведение фазы II.

Санкт-Петербургский «Биомедицинский Центр», давно и активно ведущий исследования в области изучения ВИЧ, предложил оригинальную ДНК-вакцину на основе генома преобладающего в России ВИЧ-1 субтипа А – «ДНК-4» (Мурашев и др., 2007; Murashev *et al.*, 2007). Вакцина «ДНК-4» представляет собой раствор для внутримышечного введения смеси четырех плазмидных ДНК, экспрессирующих гены (или их фрагменты) ВИЧ-1: *gag*, *env*, *pol* и *nef*. Успешно проведены доклинические испытания и фаза I клинических испытаний, в результате чего эта ДНК-вакцина на данный момент готовится к фазе II клинических испытаний.

Как отмечалось выше, в последнее десятилетие пришло понимание того, что успешная вакцина против ВИЧ-1 должна эффективно стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет (Walker *et al.*, 2011). Именно в таком случае можно добиться двойной защиты от ВИЧ-инфекции: индукция гуморального ответа требуется для предотвращения заражения ВИЧ, тогда как СТЛ-ответ будет крайне необходим для контроля вирусной репликации у ВИЧ-инфицированных и элиминации зараженных клеток из организма (Barouch *et al.*, 2012; Esparza, 2012).

Именно по такому пути создания кандидатной вакцины против ВИЧ/СПИД пошли наши коллеги из ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (п. Кольцово Новосибирской обл.). В результате многолетних исследований была создана комбинированная вакцина «КомбиВИЧвак» на основе двух полиэпитопных иммуногенов для индукции как В-клеточного, так и Т-клеточного иммунного ответа (Бажан и др., 2004а,б; Бажан, 2008; Vazhan *et al.*, 2004, 2008, 2010; Karpenko *et al.*, 2004, 2007); ее структура и процесс получения различных компонентов подробнее будут описаны и обсуждены ниже. В 2011 г. была завешена фаза I клинических испытаний этой вакцины и показана ее безвредность. Вакцина «КомбиВИЧвак» также получила разрешение на проведение фазы II клинических испытаний.

3.2.3 Конструирование искусственных ген-эквивалентов, кодирующих полиэпитопные ВИЧ-иммуногены, как основа создания эффективных ДНК-вакцин

С появлением новых методов в иммунологии и теоретической биологии стало возможным выявлять и предсказывать в вирусных белках иммунологически значимые Т- и В-клеточные антигенные детерминанты, консервативные среди различных субтипов вируса, и использовать их для конструирования искусственных ген-эквивалентов, кодирующих полиэпитопные вирусные иммуногены. Такой подход представляется весьма перспективным для конструирования ДНК-вакцин нового поколения. В самом деле, он теоретически позволяет преодолеть проблемы, связанные с антигенной изменчивостью ВИЧ-1, поскольку может направить иммунный ответ на основные протективные детерминанты, покрывающие практически весь спектр различных эпитопов, характерных для большинства субтипов вируса.

В связи с вышесказанным нельзя не отметить, что подобный интересный и многообещающий подход к созданию новой генерации эффективных и безопасных вакцин в середине 90-х годов прошлого столетия был предложен А. М. Ерошкиным с соавторами. Он основан на идентификации в вирусных белках Т- и В-клеточных эпитопов и создании на их основе синтетических полиэпитопных вакцин (Eroshkin *et al.*, 1995; Loktev *et al.*, 1996). Такие вакцины вполне могут быть свободны от многих недостатков, свойственных вакцинам, создаваемым на основе живого аттенуированного или инактивированного вируса, а также на основе нативных либо рекомбинантных вирусных белков. Подобные генноинженерные конструкции имеют огромный потенциал, поскольку позволяют улучшить иммунный ответ против ВИЧ относительно ответа, который вызывается естественной ВИЧ-инфекцией, исключив нежелательные эпитопы, индуцирующие иммунопатологию или ингибирующие протективный иммунитет.

В вышеназванных исследованиях авторы применили данный подход для конструирования четырех- α -спирального искусственного белка ТВ1, содержащего Т- и В-клеточные эпитопы (T and B cell epitopes containing Immunogen), в качестве кандидатной молекулярной полиэпитопной вакцины (Eroshkin *et al.*, 1995; Loktev *et al.*, 1996). Белок ТВ1 содержит четыре Т-клеточных эпитопа и пять В-клеточных нейтрализующих эпитопов из белков ВИЧ-1 Env и Gag. Было показано, что у

мышей, иммунизированных рекомбинантным белком ТВ1, формировался как гуморальный, так и клеточный ответ к ВИЧ-1, причем анти-ТВ1-антитела обладали ВИЧ-нейтрализующей активностью. В настоящее время рекомбинантный белок ТВ1 является компонентом комбинированной полиэпитопной вакцины «КомбиВИЧвак», представляющей собой вирусоподобные частицы.

Как отмечалось выше, обеспечение эффективной защиты от инфекции связано с индукцией как гуморального, так и клеточного иммунитета. Однако в случае ВИЧ-инфекции создание вакцины, индуцирующей вируснейтрализующие антитела, оказалось фактически невозможным, поскольку практически все вакцины были эффективны только в отношении лабораторных штаммов ВИЧ, на основе которых они и разрабатывались, но способностью нейтрализовать первичные (полевые) изоляты они не обладали (Hanke and McMichael, 2000). При этом ускользание вируса от нейтрализации не было связано с возникновением escape-мутантов, а было обусловлено особенностями кристаллической структуры белка gp120, выявившей ряд механизмов, посредством которых вирус предотвращает эффективную индукцию синтеза антител (Wyatt *et al.*, 1998).

Несмотря на разработку новых многообещающих подходов, призванных эффективно стимулировать гуморальное звено иммунитета (Binley *et al.*, 2000), многие вакцинные дизайнеры обратили свое внимание на мощную индукцию именно Т-клеточного иммунного ответа (Thomson *et al.*, 1995, 1996; Hanke *et al.*, 1998a,b,c), поскольку появились убедительные доказательства, что ответы цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов (CTL), вызванные ВИЧ-инфекцией, являются важным звеном противовирусного иммунитета (Koup *et al.*, 1994; Borgow *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1999; Saez-Cirion *et al.*, 2007). Следовательно, ВИЧ-специфичные CTL-иммуногены, кодируемые новыми ДНК-вакцинами, могут играть важнейшую роль в формировании надежной иммунологической защиты против инфекции, вызываемой ВИЧ-1 (Rowland-Jones *et al.*, 1996; Letvin, 1998). Более того, в литературе имеются данные о том, что в плазме крови ВИЧ-инфицированных наблюдается достоверная обратная корреляция между количеством ВИЧ-специфических CTL и нагрузкой вирусной РНК (Ogg *et al.*, 1999), что подтвердило ранее полученные результаты, свидетельствующие об элиминации ВИЧ-1 в инфицированном организме вследствие повышения уровня

CTL и их специфических ответов в фазе острой инфекции (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994).

Было также показано, что CTL могут защищать от ВИЧ-инфекции, так как они элиминировали пул ВИЧ-инфицированных клеток до того, как последние успевали продуцировать новые вирионы (Yang *et al.*, 1997), кроме того CTL освобождали хемокины, ингибирующие ВИЧ-инфекцию (Price *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1998). Чуть позже неоднократно было продемонстрировано, что прогрессирование ВИЧ-инфекции связано с дисфункцией CD8+ Т-лимфоцитов (Arpaу *et al.*, 2000; McKay *et al.*, 2002; Ascierno *et al.*, 2006), а недавно было показано, что стимулированный вакцинацией ВИЧ-специфический CTL-ответ способен контролировать репликацию ВИЧ-1 в модельном эксперименте на животных (Mudd *et al.*, 2012). Поэтому совершенно неудивительно, что уже с конца прошлого столетия основные усилия разработчиков ДНК-вакцин против ВИЧ-1 направлены в основном на создание вакцины, эффективно индуцирующей CTL-ответы.

Одной из первых перспективных искусственных вакцинных конструкций, содержащих множественные CTL-эпитопы ВИЧ-1, является полиэпитопный иммуноген, состоящий из семи смежных минимальных HLA-A2-рестриктированных CTL-эпитопов из белков ВИЧ-1 Gag, Pol, Env и Nef (Woodberry *et al.*, 1999). HLA-A2-трансгенные мыши, иммунизированные рекомбинантным вирусом осповакцины, кодирующим этот CTL-иммуноген, генерировали CTL-специфические ответы на каждый включенный в его состав эпитоп. Кроме того, эпитоп-специфические CTL, полученные от ВИЧ-1-инфицированных индивидуумов, опознавали каждый эпитоп внутри полиэпитопной конструкции. Полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что предложенный подход для конструирования вакцины против ВИЧ-1 является перспективным.

Более сложная вакцинная конструкция, содержащая 20 перекрывающихся CTL-эпитопов, рестриктированных двенадцатью молекулами HLA-I класса, была предложена Т. Ханке с соавторами. В эту конструкцию были включены также три обезьяньих эпитопа и один мышинный для тестирования иммуногенности кандидатной вакцины, а также для отработки оптимальных схем вакцинации на экспериментальных животных. Для доставки и экспрессии полученной вакцинной конструкции использовались ДНК-плазмида и модифицированный вирус

осповакцины (BOB) Анкара (MVA), в результате чего была достигнута активация CD8+ CTL и продукция γ -IFN после однократной иммунизации мышей (Hanke *et al.*, 1998a,b). Кроме того, авторы в дальнейшем показали, что комбинированный режим вакцинации, при котором мыши были сначала праймированы ДНК-вакциной, а затем бустированы MVA, является наиболее эффективным протоколом как для активации CD8+ CTL, так и для индукции γ -IFN (Hanke *et al.*, 1998c). Комбинированный режим вакцинации оказался самым эффективным и при иммунизации обезьян *Macaca mulatta* (Rhesus macaque), которые выявили высокий уровень CTL, сравнимый с таковым у SIV-инфицированных обезьян (Hanke *et al.*, 1999; Hanke and McMichael, 1999). Эти результаты, можно сказать, воодушевили вакцинных дизайнеров, выбравших путь конструирования полиэпитопных CTL-вакцин. Вместе с тем стало очевидно, что эффективные CTL-иммуногены должны содержать достаточно большое число консервативных эпитопов, отобранных из основных вирусных антигеннозначимых белков, а также желательно, чтобы они комбинировались с эпитопами CD4+ Т-хелперов, которые играют важную роль в развитии как В-, так и Т-клеточного иммунного ответа.

В дальнейшем было опубликовано большое количество работ, посвященных дизайну, конструированию и исследованию активности различных искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, включая и описанные в настоящей работе (Belyakov *et al.*, 1998, 2001, 2004, 2006, 2007, 2012; Berzofsky *et al.*, 2001; Bazhan *et al.*, 2004, 2008, 2010; Fischer *et al.*, 2007; Karpenko *et al.*, 2007; Ahlers and Belyakov, 2010a,b,c; Rosario *et al.*, 2010; Knudsen *et al.*, 2012; McMichael and Haynes, 2012). Однако, несмотря на то что многие ДНК-вакцинные конструкции хорошо себя зарекомендовали в серии доклинических испытаний и успешно проходят в настоящее время клинические испытания, нельзя сказать, что проблема создания эффективной и безопасной вакцины против ВИЧ/СПИД близка к своему разрешению.

К апрелю 2015 г. в клинических испытаниях участвовало 87 ДНК-вакцинных препаратов, некоторые из них в настоящее время проходят испытания в фазе II, однако ни одна ДНК-вакцина ни разу не участвовала в III фазе клинических испытаний и, более того, пока даже не допущена к участию в таковой (IAVIRreport: <http://www.iavireport.org/Trials-Database>).

Далее целесообразно сконцентрировать внимание на подходах к получению Т-клеточных иммуногенов с акцентом на СТЛ-ответы, предложенных С. И. Бажаном (ГНЦ ВБ «Вектор») и реализованных на уровне синтеза генов и конструирования плазмидных ДНК в настоящей работе (Бажан и др., 2004а,б; Бажан, 2008; Vazhan *et al.*, 2004, 2008, 2010; Karpenko *et al.*, 2004, 2007).

На первом этапе был проведен дизайн полиэпитопного Т-клеточного иммуногена, содержащего СТЛ-эпитопы как можно большего числа главных антигенов ВИЧ-1, предназначенного для создания на его основе эффективной и безопасной вакцины против ВИЧ-1. С этой целью была разработана стратегия выбора эпитопов, вовлеченных в индукцию ВИЧ-1-специфичных СТЛ-ответов в инфицированном организме.

Известно, что вирусная инфекция индуцирует СТЛ-ответы путем представления вирусных антигенов в комплексе с молекулами МНС-I класса на поверхности инфицированных клеток. При этом вирусные антигены распознаются специфическими Т-лимфоцитами как короткие пептиды (8-12 а/к), ассоциированные со специфическими аллелями МНС-I класса (Oldstone, 1989; Goldberg and Rock, 1992). Эти короткие антигенные эпитопы появляются из синтезированных в клетке вирусных белков в результате специфического процессинга, происходящего в протеасомах (Rammensee *et al.*, 1993; York and Rock, 1996). Поскольку распределение HLA-аллелей варьирует в различных популяциях, эффективная вакцина против ВИЧ-1 должна содержать эпитопы, рестриктированные основными HLA-аллелями, чтобы покрыть генетическое разнообразие молекул МНС-I класса для населения конкретного региона.

Эффективные полиэпитопные СТЛ-вакцины кроме определенной HLA-специфичности должны содержать также большое количество консервативных эпитопов, вовлеченных в индукцию как CD8+, так и CD4+ Т-лимфоцитов. Аминокислотные последовательности таких эпитопов суммированы в базе данных *Los Alamos HIV Molecular Immunology Database*.

Для конструирования целевого СТЛ-иммуногена, пригодного в качестве вакцинного кандидата, были выбраны эпитопы, удовлетворяющие следующим критериям.

1. Индуцируют как CD8+ CTL, так и CD4+ Т-лимфоциты и являются высоко консервативными среди подтипов А, В и С ВИЧ-1, распространенных на территории России, США и Западной Европы.
2. Эпитопы принадлежат основным вирусным белкам-антигенам: Env, Gag, Pol и Nef и индуцируют значимые CTL-ответы.
3. В рассмотрение принимались эпитопы, индуцирующие CTL, опознающие соответствующие естественно процессируемые эпитопы.
4. Выбирались, по-возможности, оптимальные эпитопы, которые в исследованиях по титрованию перекрывающихся усеченных пептидов были определены как минимальные эпитопы, вызывающие наиболее эффективную сенсibilизацию CTL, специфичных к определенным молекулам МНС-I класса.
5. Учитывались CD8+ CTL эпитопы, которые в совокупности рестриктированы десятью различными оптимально подобранными аллелями HLA-I класса, поскольку известно, что этого достаточно для покрытия генетического разнообразия антигенов МНС-I класса в популяции практически любого географического района (Lalvani *et al.*, 1994; Sidney *et al.*, 1996; Hanke *et al.*, 1998a). При этом выбирались эпитопы, специфичные к распространенным на территории России HLA-аллелям, к которым отнесены антигены HLA-I и -II классов, встречающиеся в 20 % и более случаев, а именно: A1, A2, A3, A9, A10, Aw19, B7, B12, B35, Cw3, Cw4, DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR7 (таблица 3.1).

Данные по распределению HLA-аллелей I и II классов у населения Новосибирска, Магадана и Семипалатинска представлены профессором В. Прокофьевым (Институт клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск). Наиболее распространенные HLA-аллели, имеющие частоту встречаемости больше, чем 20 %, отмечены жирным шрифтом и перечислены в последней колонке.

Таблица 3.1 – Распределение HLA-аллелей I и II классов у населения Западной Сибири в сравнении с мировыми данными

HLA	Мировые данные	Новосибирск	Магадан	Семипалатинск	Наиболее распространенные аллели (>20 %)
HLA-A	N=2163	N=600	N=150	N=184	
A1	26.4	22.5	17.3	30.4	A1
A2	49.4	49.7	34.0	55.9	A2
A3	24.7	27.0	26.7	20.1	A3
A9	22.0	33.5	24.7	28.8	A9
A10	11.5	17.2	29.3	23.4	±A10
A11	12.2	12.5	13.3	10.3	-
Aw19	27.1	11.2	4.7	6.5	±Aw19
A28	9.2	5.2	22.0	2.7	-
HLA-B	N=2132	N=600	N=150	N=184	-
B5	15.7	16.2	12.0	25.0	-
B7	21.7	25.3	24.7	25.0	B7
B8	18.3	13.2	11.3	15.8	-
B12	23.8	20.7	18.7	16.3	B12
B13	5.7	11.3	7.3	20.1	-
B14	7.3	5.2	6.0	4.9	-
B15	13.1	9.3	9.3	6.5	-
B16	8.8	8.2	12.0	9.8	-
B17	5.7	7.0	8.0	5.4	-
B18	10.7	6.3	8.7	7.6	-
B21	5.7	4.3	2.7	9.2	-
B22	0.8	3.7	0.0	1.6	-
B27	6.7	11.3	7.3	8.7	-
B35	19.9	21.7	18.7	19.6	B35
B40	11.5	13.7	15.3	7.6	-
HLA-C	N=2106	N=420	N=150	N=184	-
Cw1	6.5	3.8	2.0	3.3	-
Cw2	7.9	20.0	6.7	10.9	-
Cw3	23.6	33.8	18.0	15.8	Cw3
Cw4	21.9	45.5	26.7	20.1	Cw4
Cw5	13.3	0.2	0.0	2.2	-
Cw6	16.5	5.9	0.0	1.6	-
Cw7	42.7	1.2	0.0	2.7	-
Cw8	7.3	0.2	0.0	0.0	-

Таблица 3.1 (окончание)

HLA	Мировые данные	Новосибирск	Магадан	Семипалатинск	Наиболее распространенные аллели (>20 %)
HLA-DR	N=1926	N=142	-	-	
DR1	18.1	21.83			DR1
DR2	29.1	29.58			DR2
DR3	22.6	14.79			±DR3
DR4	23.8	24.65			DR4
DR5	26.6	37.32			DR5
Drw6	21.1	10.56			-
DR7	22.6	23.94			DR7
Drw8	5,9	4.23			-

В результате проведенного анализа для конструирования целевого CTL-иммуногена были выбраны эпитопы, строго удовлетворяющие вышеперечисленным критериям. Все эти эпитопы суммированы в таблице 3.2 и таблице 3.3.

Таблица 3.2 – CTL-эпитопы, отобранные для конструирования искусственного иммуногена

Вирусные белки	Последовательности эпитопов	Позиции эпитопов	Вирусные штаммы	HLA
Nef	RPQVPLRPMTY	75-85	SF2	B35
	FPVRPQVPL	68-77	SF2	B35
	QVPLRPMTYK	73-82	LAI	A2, A3.1
	QVPLRPMTYK	73-82	NL432	A3.1,
	QVPLRPMTYK	73-82	BRU	A3, B35
	FPVTPQVPLR	68-77	LAI	B7
	VPLRPMTY	74-81	LAI	A3, B35
	DLSHFLKEKGGLEGL	86-100	LAI	B35
	DLSHFLKEK	86-92	LAI	A3.1
	FLKEKGGL	90-97	LAI	B8
	PLTFGWICYKL	136-145	LAI	A2
	YPLTFGWICf	139-147	SF2	B35
	TPGPGVRYPL	128-137	LAI	B7
	HSQRRQDILDWIIYH	104-118	LAI	B7
	WIYHTQGYFPDWQNYT	113-128	BRU	A1
	YFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWC	120-144	SF2	A24
	NYTPGPGVRYPLT	126-138	BRU	B7
	TPGPGVRYPL	136-145	LAI	B7
	GVRYPPLTFGWICYKLVP	130-145	BRU	A1

Таблица 3.2 – (окончание)

Вирусные белки	Последовательности эпитопов	Позиции эпитопов	Вирусные штаммы	HLA
RT	CTEMEKEGKISKIGP	205-219	A/B/D	HLA-broad
	ITLWQRPLV	71-79	-	A19
	VLDVGDAYFSV	267-277	LAI	A2
	TVLDVGDAY	262-270	LAI	B35
	VIYQYMDDL	346-354	LAI	A2
	AIFQSSMTK	325-333	LAI	A3.1
	AIFQSSMTK	325-333	IIIB	A33 (A19)
	NPDIVIYQY	328-336	LAI	B35
	NPDIVIYQY	328-336	-	B35
	WKGSPAIFQSSMT	308-320	SF2	B7
	SPAIFQSSM	311-319	-	B35
p17	KIRLRPGGK	18-26	LAI	A3.1
	RLRPGGKKK	20-28	LAI	A3.1
	RLRPGGKKKY	20-29	LAI	A3.1
	KYKCLKHIVW	28-36	LAI	A24
	WASRELERF	36-44	LAI	B35
	SLYNTVATL	77-85	LAI	A2
	GSEELRSLY	71-79	LAI	A1
p24	QAISPRTLNAW	145-155	LAI	A25
	SPRTLNAWV	148-156	LAI	B7
	QAISPR	145-150	-	Cw3
	TLNAWVKVV	151-159	-	A2
	KRWIILGLNKIVRMY	263-267	LAI	A33 (A19)
gp120	TVYYGVPVWK	37-46	LAI	A3.1
	LFCASDAKAY	53-62	LAI	A24
	VPVWKEATTTL	42-52	LAI	B35
	KLTPLCVTL	120-128	LAI	A2
	FNCGGEFFY	376-384	LAI	A29 (A19)
	FNCGGEFFY	376-384	IIIB	A29 (A19)
	SFNCGGEFF	375-383	PV22	Cw4
	KQIINMWQEVGKAMYA	428-443	IIIB	A2
	KQFINMWQEVGKAMYA	428-443	LAI	A2
	RIKQIINMW	419-427	HXB2	A32 (A19)
gp41	YLKDQQLL	591-598	LAI	A24
	TAVPWNASW	611-619	LAI	B35
	LLNATdIAV	818-827	LAI	A2
	LLNATdIAV	815-823	LAI	A2
	IPRRIRQGL	843-851	LAI	B7
	YRAIRHIPRRIRQGLERILL	844-863	-	B35
	RRIRQGLERILL	852-863	-	B7
	DRVIEVVQAYRAIR	834-848	IIIB	A2

Таблица 3.3 – Картирование эпитопов в а/к последовательностях вирусных белков

Вирусные белки	Расположение эпитопов в последовательностях белков	HLA
Nef (68-100)	FPVVRPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGL	-
	FPVVRPQVPL	B35
	FPVTPQVPLR	B7 (B*0702)
	RPQVPLRPMTY	B35
	VPLRPMTY	B35 (B*3501), A3
	QVPLRPMTYK	A2, A3, (A11, B27)
	DLSHFLKEKGGLEGL	B35
	DLSHFLKEK	A3.1
	PLRPMTYK	(A11)=A*1101
	AAVDLSHFLKEK	(A11)
AvDLSHFLK	(A11)	
FLKEKGGGL	(B8)	
Nef (104-149)	IHSQRRQDILDLDWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGiRYPLTFGWcyKLVp	-
	HSQRRQDILDLDWIYH	B7
	WiYHTQGYFPDWQNYT	A1
	YFPDWQNYTPGPGiRYPLTFGWc	A24=A9
	NYTPGPGvRYPLT	B7
	TPGPGvRYPL	B7
	GvRYPLTFGWcyKLVp	A1, (B8)
	PLTFGWcyKL	A2
	YPLTFGWcf	B35
	RYPLTFGW	(B*2705)
	YPLTFGWcy	(B18)
YFPDWQNYT	(B37)	
YFPDWQNYT	(B57)	
HTQGYFPDWQ	(B57)	
RT (71-79)	ITLWQRPLV (clade A/B/D)	A19, (A28)
RT (205-219)	EICTEMEKEGKISKIGP	-
	CTEMEKEGKISKIGP	HLA - broad
	EICTEMEKEGKISKIGP	Th epitope human
	CTEMEKEGKISKIGP	Th epitope murine
RT (266-277)	TVLDVGDAYFSV	-
	VLDVGDAYFSV	A2
	TVLDVGDAY	B35
RT (320-354)	WKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIvIYQYMDDL	-
	VIYQYMDDL	A2
	WKGSPAIFQSSMT	B7
	SPAIFQSSM	B35
	AIFQSSMTK	A3.1, (A11, A33)
	NPDIvIYQY	B35
	AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIvIYQ	(A11)
p17 (12-47)	KIRLRPGGKKYKLKHIVWASRELERFAVN	-
	KIRLRPGGK	A3.1
	RLRPGGKKK	A3.1
	KYKLKHIVW	A24=A9
	WASRELERF	B35
HIVWASRELERFAVN	Th epitope	
p17 (71-86)	GSEELRSlyNTVATL	-
	GSEELRSly	A1
	SlyNTVATL	A2
	ELRSlyNTV	(B8)
p24 (140-159)	QAISPRTLNAWVKVV	-
	QAISPRTLNAW	A25=A9
	SPRTLNAWV	B7
	QAISPR	Cw3
TLNAWVKVV	A2	
p24 (253-284)	NPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSI	-
	PPIPVGEIY	B35
	KRWIILGLNKIVRMY	A33=A19, (B27)
	KRWIILGLNKIVRMY	Th epitope
	NPPIPVGEIYKRWII	(B8)
	IPVGEIYKRWIILGL	(B8)
	GEIYKRWII	(B8)
	RMYSPTSI	(B52=B5)
	KRWIILGLNK	(B27)
	LGLNKIVRMY	(Bw62)

Таблица 3.3 – (окончание)

Вирусные белки	Расположение эпитопов в последовательностях белков	HLA
p24 (288–309)	GPKEFFRDYVDRFYKTLRAEQA	-
	GPKEFFRDYVDRFYK	Th epitope
	PKEFFRDYVDRFYKTLRAEQA	Th epitope
	EPFRDYVDRFYKTLRAEQA	Th epitope
	EPFRDYVDRF	CTL epitope
	KEFFRDYVDR	B epitope
	FYKTLRAEQA	B epitope
gp120 (37–61)	TVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAY	-
	TVYYGVPVWK	A3.1
	VPVWKEATTTL	B35
	LFCASDAKAY	A24
	VYYGVPVWKEA	Th epitope
gp120 (120–128)	KLTPLCVTL	(A2)
gp120 (375–384)	SFNCGGEFFY	-
	FNCGGEFFY	A29 (A19)
	SFNCGGEFF	Cw4
gp120 ((426–451)	SFNCGGEFF	(B15)
	RIKQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIR	-
	RIKQIINMW	A32=A19
	KQIINMWQEVGKAMYA	A2+Th (hu+mu)
	KQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIR	Th epitope
gp41 (591–598)	YLKDQQLL	A24, (B8)
gp41 (814–857)	SLLNATDIAVAEGTDRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIRQGLERILL	-
	SLLNATdIAV	A2
	LLNATdIAV	A2
	SLLNATdIAV	A*0201
	AVAEGTDRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIRQGLER	Th
	DRVIEVVQGAYRAIR	A2
	YRAIRHIPRRIRQGLERILL	A30, B35
	IPRRIRQGL	B7
RRIRQGLERILL	B7, (B8)	

Следует отметить, что некоторые из перечисленных в таблице 3.2 эпитопов способны связываться с дополнительными молекулами HLA, которые первоначально не были приняты к рассмотрению, так как их аллели имеют низкую частоту встречаемости в популяции. Предполагается, что такие эпитопы, узнаваемые несколькими HLA-аллелями, могут повысить потенциал создаваемой вакцины.

В качестве стратегии объединения множества отобранных эпитопов из разных белков ВИЧ-1 в одну полипептидную цепь был выбран подход, основанный на объединении эпитопов как перекрывающихся пептидов. В предложенной конструкции перекрывающиеся эпитопы располагаются друг относительно друга так же, как и в нативных вирусных белках. При этом перекрывание эпитопов позволяет минимизировать общую длину иммуногена. Оказалось, что в данном случае большинство выбранных эпитопов (таблица 3.2) картируется в последовательностях нативных вирусных белков как частично или полностью перекрывающиеся пептиды и локализовано в нескольких непрерывных областях (таблица 3.3). Такие активные в антигенном отношении районы, содержащие

перекрывающиеся эпитопы, были идентифицированы и в дальнейшем использовались для дизайна ДНК-вакцинной конструкции, кодирующей полиэпитопный иммуноген.

Таким образом, авторами был проведен дизайн искусственного Т-клеточного иммуногена, реализация которого на генетическом уровне подробно описана в разделе 5 настоящей работы, и предложена аббревиатура TCI (T Cell Immunogen) для его наименования. Общий дизайн этого иммуногена представлен на рисунке 3.19. Длина искусственного белка составляет 392 а/к (последовательность приведена в разделе 5 на рисунке 5.25). Рассчитанный белок содержит не менее восьмидесяти эпитопов (как CD8+ CTL, так и CD4+ Т-хелперов), многие из которых перекрываются и в совокупности рестриктированы десятью различными HLA-аллелями. Чтобы исследовать CTL-ответы, индуцируемые ДНК-вакциной на экспериментальных животных, в состав целевого иммуногена были включены дополнительные эпитопы, представляемые молекулами MHC-I класса мышей и обезьян Rhesus macaque (*Macaca mulatta*).

Разработанный полиэпитопный CTL-иммуноген продемонстрировал хороший вакцинный потенциал, особенно в составе комбинированной кандидатной вакцины «КомбиВИЧвак», представляющей собой вирусоподобные частицы, в которых коровая часть состоит из ДНК pcDNA-TCI, а оболочка содержит молекулы вышеописанного рекомбинантного белка TBI, конъюгированного с комплексом полиглюкин-спермидин. Такой подход позволяет получать самоорганизующиеся вирусоподобные наночастицы с инкапсулированной ДНК-вакциной pcDNA-TCI (Lebedev *et al.*, 2000; Бажан и др., 2004а,б; Бажан, 2008; Карпенко и др., 2003, 2006, 2007; Vazhan *et al.*, 2004, 2008; Karpenko *et al.*, 2004, 2007). Таким образом, частицы «КомбиВИЧвак» сопоставимы с размерами вирионов ВИЧ-1, оболочка из полиглюкина защищает ДНК-вакцину от действия нуклеаз и может повышать иммуногенность такой вакцины за счет большей вероятности захвата таких частиц АПК. Расположенный на поверхности частиц рекомбинантный белок TBI способствует не только развитию гуморального ответа, но и повышению активации Т-клеточного звена иммунитета.

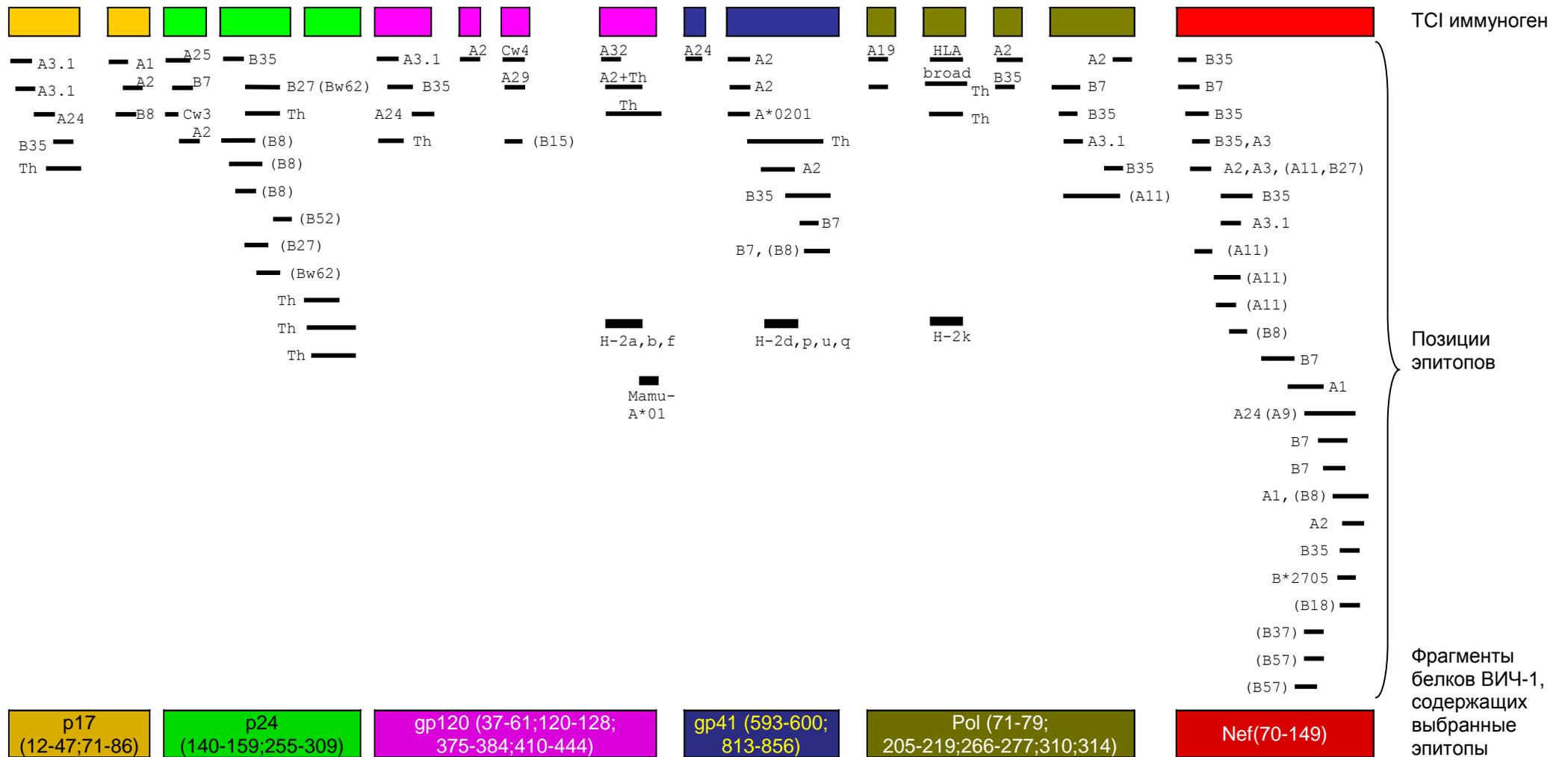


Рисунок 3.19 – Общий дизайн TSI-иммуногена

На сегодняшний день вакцина «КомбиВИЧвак» является первой из трех российских вакцин, допущенных к клиническим испытаниям II фазы по результатам клинических исследований по программе фазы I (данные Интернет-ресурса IAVIRreport: <http://www.iavireport.org/Trials-Database>).

3.2.4 Методы оптимизации полиэпитопных иммуногенов с целью повышения стимуляции СТЛ

Для повышения иммуногенности полиэпитопных ДНК-вакцин, направленных на стимуляцию CD8+ Т-клеточного ответа, существует ряд способов; некоторые из них обсуждались выше, но здесь уместно суммировать основные подходы, направленные на решение столь важной задачи.

А) Использование множества консервативных эпитопов ВИЧ-1, в том числе распознаваемых различными HLA-аллелями.

Проектирование полиэпитопных вакцин должно основываться на использовании консервативных эпитопов из различных субтипов ВИЧ-1 для улучшения «иммунологического покрытия» в условиях большой вариабельности вируса (Бажан и др., 2004а,б; Бажан, 2008; Vazhan *et al.*, 2004, 2008, 2010; Karpenko *et al.*, 2004, 2007, 2014; Borthwick *et al.*, 2014; Hanke, 2014). Эта идея обсуждалась выше, здесь лишь следует подчеркнуть, что основывается она на особенностях биологии ВИЧ-1. Кроме того, известно, что CD8+ Т-лимфоциты, специфичные к различным детерминантам, могут проявлять не одинаковую противовирусную активность, а генетическая вариабельность индивидуумов может приводить к различным СТЛ-ответам на одну и ту же детерминанту (Spencer and Braciale, 2000).

Как отмечалось выше, Т-клеточный иммунитет рестриктирован по антигенам МНС-I -II классов, поэтому проектирование вакцины требует тщательного планирования для обеспечения стимуляции иммунных реакций в контексте разнообразных HLA. Разнообразие молекул HLA и HLA-аллелей варьирует в различных популяциях и у разных людей в одной популяции, следовательно, проектирование Т-клеточных полиэпитопных вакцин требует строго учета этих особенностей, чтобы покрыть генетическое разнообразие в популяции. ДНК-вакцины, кодирующие эпитопы, которые могут быть представлены

супертипами HLA (наиболее встречающимися среди людей во всем мире), видимо, являются самыми перспективными. Например, ранее было показано, что ДНК-вакцина, построенная на основе эпитопов, рестриктированных тремя супертипами HLA: A2, A3 и B7, способна вызывать вирус-специфические ответы Т-лимфоцитов у 80-90 % людей во всем мире (Sette and Sidney, 1998).

Использование CD4+ Т-хелперных эпитопов, рестриктированных молекулами МНС-II класса, необходимо не только для активации В-клеточного звена иммунитета, но и для дополнительной стимуляции и усиления ответа CD8+ Т-лимфоцитов. Особую роль Т-хелперы играют в генерации Т-клеток памяти, которые способны осуществлять долгосрочный мониторинг инфекционного агента (Castellino and Germain, 2006).

Б) Повышение аффинных характеристик СТЛ-эпитопов.

Повышение аффинных характеристик СТЛ-эпитопа можно осуществить несколькими путями. Выделим здесь три основных.

- Повышение аффинности связывания эпитопа с молекулами МНС путем модификации его а/к последовательности. Было показано, что в ряде случаев это может преобразовать субдоминантный эпитоп в доминантный, увеличивая его конкурентные способности связывания с молекулами МНС (Pogue *et al.*, 1995; Berzofsky *et al.*, 2001).
- Повышение аффинности комплекса [пептид-МНС] к Т-клеточному рецептору. Улучшенные характеристики связывания комплекса [эпитоп-МНС] с рецептором Т-лимфоцитов также были получены путем изменения а/к последовательности эпитопа (Tangri *et al.*, 2001).
- Генерирование кросс-реактивных Т-лимфоцитов широкого спектра специфичности, эффективных в отношении большого количества штаммов ВИЧ-1. Этот подход был применен с использованием СТЛ-эпитопа из переменного сегмента белка Env ВИЧ-1, в котором замена одного а/к остатка в области взаимодействия с Т-клеточным рецептором индуцировала кросс-реактивные СТЛ, способные распознавать множество вариантов ВИЧ-1 (Takahashi *et al.*, 1992).

В) Повышение иммуногенности ДНК-вакцины благодаря рациональному дизайну полиэпитопной конструкции, обеспечивающей эффективный процессинг продукта экспрессии и презентацию освободившихся эпитопов Т-лимфоцитам в комплексе с молекулами МНС.

Современное понимание особенностей внутриклеточного процессинга и презентации антигенов на поверхности АПК, а также накопленные результаты испытаний полиэпитопных ДНК-вакцин позволяют задуматься относительно новых стратегий повышения их иммуногенности и создают предпосылки для рационального конструирования новых высокоиммуногенных ДНК-вакцин (Sanou *et al.*, 2012).

На сегодняшний день в научной литературе накопилось достаточно много данных, свидетельствующих о корреляции успешности Т-клеточного иммуногена и эффективности его процессинга. Процессинг нативных вирусных белков является низкоэффективным: из миллионов копий синтезируемого в клетке вирусного белка генерируется небольшая часть пептидов, которые образуют комплексы с молекулами МНС-I класса (Yewdell and Bennink, 1999), следовательно, увеличение генерации таких комплексов АПК ведет к повышению иммуногенности (Chen *et al.*, 2000). Вместе с тем, известны многочисленные методы модуляции трансляции мРНК антигенов и стратегии доставки целевого антигена в различные клеточные компартменты (Ogata and Fukuda, 1994; Sandoval *et al.*, 1994; Anton *et al.*, 1997; Day *et al.*, 1997; Porgador *et al.*, 1997; Wu and Kipps, 1997; Rodriguez *et al.*, 1998, 2001; Ishioka *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 1999; Uebel *et al.*, 1999; Delogu *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2000; Varshavsky *et al.*, 2000; Livingston *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2006; Cardinaud *et al.*, 2009; Weinberger *et al.*, 2013; Karpenko *et al.*, 2014).

Ниже будут кратко рассмотрены основные подходы к рациональному дизайну полиэпитопных иммуногенов, нацеленных на достижение максимально эффективной презентации целевых эпитопов в комплексе с молекулами МНС.

Пути повышения МНС-I-зависимой презентации.

1) *Нацеливание иммуногенов на протеасому для их адекватного расщепления.*

Ранее было установлено, что уровень презентации эндогенного антигена

определяется уровнем его деградации с помощью Ub-зависимого пути, таким образом, нацеленные на протеасом-опосредуемый процессинг антигены подвергаются более быстрому расщеплению и презентации иммуногенных эпитопов по пути МНС-I (Grant *et al.*, 1995). На уровне конструирования полиэпитопных иммуногенов этого эффекта можно достичь путем генетического слияния целевых генов с Ub-кодирующей нуклеотидной последовательностью, причем, как с 5'-конца, так и с 3'-конца кодирующей последовательности иммуногена (Varshavsky *et al.*, 2000; Velders *et al.*, 2001).

- 2) *Использование а/к, фланкирующих детерминанты, способствующих эффективному протеасомному процессингу полиэпитопных иммуногенов.* Для полиэпитопных конструкций большое значение имеет окружение конкретных эпитопов, поскольку оно способно модулировать уровень ответов Т-лимфоцитов, в частности СТL-ответов. Так, например, Ишиока с соавторами установил, что изменение положения эпитопов в составе полиэпитопных вакцинных конструкций, кодирующих HLA-рестриктированные СТL-эпитопы, влияет на величину ответов CD8+ Т-лимфоцитов. Вскоре было показано, что эффективность процессинга и представления эпитопа можно существенно повысить вставкой единственной а/к с его С-конца, в частности, вставка фланкирующего Lys значительно увеличивала ответ CD8+ Т-лимфоцитов на этот эпитоп. Сравнимые ответы наблюдались также на вставку остатков Arg, Cys, Asp, или Gly (Ishioka *et al.*, 1999; Kuttler *et al.*, 2000; Livingston *et al.*, 2001).
- 3) *Использование мотивов узнавания для ТАР.* Очень важным моментом в антиген-презентации является эффективность транспорта уже образовавшихся в протеасомах свободных эпитопов в просвет ER, где им необходимо сформировать комплекс с молекулами класса МНС-I для последующей презентации на поверхности АПК CD8+ Т-лимфоцитам. В настоящее время известны аминокислотные мотивы, определяющие не только эффективность протеасомного расщепления полиэпитопного иммуногена, но и мотивы, определяющие аффинность связывания отдельных эпитопов с комплексом ТАР, который и ответственен за транспорт целевых антигенных эпитопов в ER (Toes *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2003; Doytchinova *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2011). Принципы распознавания ТАР впервые были опубликованы С. Уэбелем с

соавторами и неоднократно успешно применялись в различных работах по конструированию полиэпитопных СТЛ-иммуногенов для повышения их вакцинного потенциала (Uebel *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2003; Cardinaud *et al.*, 2009; Bazhan *et al.*, 2010).

Пути повышения МНС-II-зависимой презентации.

- 1) *Экспрессия минигенов антигенных детерминант, содержащих сигнальные последовательности для транспорта в ER.* В отличие от обычных минигенных продуктов экспрессии, которые зачастую эффективно разрушаются протеасомами (Fu *et al.*, 1998; Luckey *et al.*, 1998), использование ER-сигнальных последовательностей является надежным методом, обеспечивающим образование комплексов антигенных эпитопов с молекулами класса МНС-II (Ciernik *et al.*, 1996; Porgador *et al.*, 1997; Anton *et al.*, 1997). Однако из-за того, что ER имеет ограниченные способности для эндопротеолиза (Snyder *et al.*, 1998), целесообразно ER-нацеленные минигены экспрессировать индивидуально, а не в виде полиэпитопного иммуногена.
- 2) *Использование мотива LAMP-1.* Известно, что присоединение LAMP-1 к С-концу целевого иммуногена на генно-инженерном уровне способно эффективно направлять его в клеточные эндосомальные/лизосомальные компартменты, что способствует презентации индивидуальных эпитопов, образованных в этих структурах, по пути МНС-II, вызывая стимуляцию специфических CD4+ Т-клеток (Wu *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1999). Так, например, экспериментальная ДНК-вакцинная конструкция, кодирующая антиген Gag ВИЧ-1, С-конец которого слит с а/к последовательностью LAMP-1, вызывала не только мощный и длительный гуморальный ответ, но и ответы CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти, сравнимые по уровню с ответами на нативный белок Gag (de Arruda *et al.*, 2004).
- 3) *Использование инвариантной цепи (Ii) молекулы МНС-II класса.* Недавно был предложен еще один оригинальный поход, имеющий целью повышение стимуляции CD4+ Т-клеток. Суть его состоит в генетическом присоединении к N-концу целевого иммуногена инвариантной цепи (Ii) молекулы МНС-II класса человека, которая выполняет функцию сигнала нацеливания на лизосому, что обеспечивает эффективный транспорт синтезированного белка в лизосомы, его

протеолитическую деградацию и представление специфических эпитопов в комплексе с молекулами МНС-II класса. Такой подход позволил повысить уровень антиген-специфического (РТ ВИЧ-1) Т-клеточного иммунного ответа в результате ДНК-иммунизации (Starodubova E. S. *et al.*, 2014).

Совершенно очевидно, что применение какой-либо одной стратегии повышения иммуногенности ДНК-вакцины вряд ли будет достаточным для достижения поставленной цели. Необходим тщательный анализ вклада тех или иных подходов в каждом конкретном случае, а также использование других приемов, способствующих повышению вакцинного потенциала ДНК-конструкции (Sanou *et al.*, 2012). Некоторые общие подходы, призванные обеспечить повышение иммуногенности ДНК-вакцинных препаратов, были рассмотрены выше в главе 3.2.1, однако здесь будет уместно их вкратце суммировать и снабдить соответствующими ссылками:

- использование оптимизированных кодонов, сильных промоторов и других регуляторных элементов на генетическом уровне (Chapman *et al.*, 1991; Ertl and Thomsen, 2003; Gao *et al.*, 2003; Barouch *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Pillai *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009; Williams, 2013);

- совместное с ДНК-вакциной введение различных комбинаций цитокинов и клеточных рецепторов, а также кодирующих их плазмид (Disis *et al.*, 1996; Ahlers *et al.*, 1997; Barouch *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2006; Ulmer *et al.*, 2006);

- использование активаторов TLR9-рецепторов, таких как CpG-последовательности в ДНК-вакцинах (Klinman *et al.*, 1996, 1997; Sato *et al.*, 1996);

- использование альтернативных способов иммунизации и систем доставки в АПК, включая аутологичные дендритные клетки как систему доставки вакцины (Berzofsky *et al.*, 2001), частицы, покрытые ДНК (Webster and Robinson, 1997; Hutnick *et al.*, 2011), электропорацию *in vivo* (Widera *et al.*, 2000; Rosati *et al.*, 2008; Sardewsai and Weiner, 2011; Vasan *et al.*, 2011; Hutnick *et al.*, 2012), доставку инкапсулированной ДНК-вакцины на основе липосом (Klavinskis *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2007), бустирование различными вирусными рекомбинантными векторами или рекомбинантными белками (Kent *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 1999; Gorelick *et al.*, 2000; Amara *et al.*, 2002; McConkey *et al.*, 2003; Nitayaphan *et*

al., 2004; Casimiro *et al.*, 2005; Harari *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008) и другие альтернативные методы.

Идея комплексной проверки перечисленных выше стратегий повышения иммуногенности полиэпитопной ДНК-вакцины против ВИЧ/СПИД путем оптимизации МНС-I-зависимой презентации целевых эпитопов была предложена С. И. Бажаном (Бажан, 2008).

На первом этапе был проведен анализ имеющихся данных в базе *Los Alamos HIV Molecular Immunology Database*, в результате которого по жестким критериям, описанным выше в главе 3.2.3 для выбора эпитопов, составляющих иммуноген ТСИ, был сформирован список наиболее предпочтительных HLA A*0201-рестриктированных CTL-эпитопов. Результаты этого анализа приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – HLA A*0201- рестриктированные CTL-эпитопы из *Los Alamos HIV Molecular Immunology Database*, отобранные для конструирования полиэпитопного иммуногена

Эпитоп	Белок (а/к)	Score(**)	Вариабельность эпитопов среди подтипов ВИЧ-1
SLYNTVATL	p17 (77-85)	157,227	Консервативный (А, В, С)
ALVEICTEM	RT (33-41)	20,369	Консервативный (В)
VIYQYMDDL	RT (179-187)	18,008	Консервативный (А, В, С)
ILKEPVHGV	RT (309-317)	39,025	Консервативный (А, В, С)
RGPGRAFVTI (*)	gp160 (311-320)	0,129	Слабо консервативный
QMEDIISL	gp160 (103-111)	145,490	Консервативный (А, В, С)
KLTPLCVTL	gp160 (121-129)	74,768	Консервативный (А, В, С)
RLRDLILLIV	gp160 (770-778)	20,437	Консервативный (А, В)
VLEWRFDSSL	Nef (180-189)	8,832	Консервативный (В)
RILQQLLFI	Vpr (62-70)	67,142	Консервативный (А, В, С)
VLAЕAMSQV	Gag/p2p7p1p6 (1-7)	1114,988	Консервативный (А, В,)

Примечания: (*) – этот эпитоп был выбран, несмотря на низкое значение score = 0,129, так как кроме HLA A*0201 он является также H-2d-рестриктированным, и это позволяет тестировать иммуногенность к данному пептиду на мышах BALB/c;

(**) - оценка времени полу жизни диссоциации молекул, содержащих эти пептиды.

Сравнительный анализ иммуногенности, проведенный на HLA-A2-трансгенных мышах, как и можно было ожидать, показал, что наибольшим вакцинным потенциалом обладает генетическая конструкция, оптимизированная по всем параметрам (разделение соседних эпитопов а/к, формирующими мотивы распознавания для ТАР наряду с мотивами протеасомного процессинга), причем наиболее предпочтительным оказалось расположение Ub на N-конце целевого иммуногена (Vazhan *et al.*, 2010).

Полученные результаты открыли новые возможности целенаправленной рациональной оптимизации структуры Т-клеточных иммуногенов, которая в настоящее время активно реализуется в ГНЦ ВБ «Вектор» (Регузова и др., 2013, Reguzova *et al.*, 2015).

3.2.5 Современные достижения в области разработки и применения ДНК-вакцин

Состояние в области разработки различных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД было подробно освещено в предыдущих главах этого раздела. Теперь имеет смысл взглянуть на проблему разработки и применения ДНК-вакцин несколько шире. Как обстоят дела в этой области относительно других инфекционных заболеваний человека и животных?

Обнадеживающие результаты в экспериментах на животных (доклинические испытания) показали многие ДНК-вакцины. На рубеже веков стали накапливаться результаты исследований все новых ДНК-вакцин, которые показали высокую иммуногенность и протективность против многих инфекционных агентов. Так, например, весьма обнадеживающие результаты были получены при изучении иммуногенного потенциала ДНК-вакцин против вируса гриппа (Webster *et al.*, 1994; Kodihalli *et al.*, 1997), папилломавирусов (Stanley *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2002), поксвирусов (Hooper *et al.*, 2004; Heraud *et al.*, 2006; Sakhatskyu *et al.*, 2006; Максютон, 2010) и герпесвирусов (Kondo *et al.*, 2004). Активно проводились подобные исследования в отношении ряда флавивирусов (Schmaljohn *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2001; Putnak *et al.*, 2003; Spik *et al.*, 2006), филовирусов (Vanderzanden *et al.*, 1998; Riemenschneider *et al.*, 2003), буньявирусов (Hooper *et al.*, 1999, 2001; Spik

et al., 2006) и некоторых других вирусов. Испытывались также и ДНК-вакцины против ряда бактериальных возбудителей, например, вызывающих сибирскую язву (Price *et al.*, 2001), листериоз (Yoshida *et al.*, 2001), боррелиоз (Scheibelhofer *et al.*, 2003) и туберкулез (Ferraz *et al.*, 2004), а также против малярийного плазмодия, вызывающего малярию (McConkey *et al.*, 2003; Rainczuk *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2003).

Успешные результаты, полученные при испытаниях разработанных ДНК-вакцин на лабораторных животных, вселяли оптимизм при переходе к их клиническим испытаниям. Однако до сих пор, как и в случае с ДНК-вакцинами против ВИЧ/СПИД, ни одна из них не смогла успешно пройти все фазы клинических испытаний и продемонстрировать эффективную протективность на волонтерах, участвовавших в этих экспериментах. Это лишний раз подтверждает необходимость проведения более тщательного рационального дизайна целевых иммуногенов и генетических конструкций в целом с применением различных стратегий оптимизации, описанных выше.

Тем не менее, в настоящее время уже существуют ДНК-вакцины, разрешенные Управлением США по контролю над продуктами питания и лекарственными препаратами (USFDA) к применению на животных. К таким вакцинным препаратам относятся следующие лицензированные ДНК-вакцины.

- West Nile-Innovator против вируса Западного Нила для лошадей, производства “Ft Dodge Animal Health”, Голландия (Powell, 2004). Вакцина кодирует структурный белок вируса PrE-M-E, предназначена для профилактической защиты от инфекции; лицензирована в 2005 г.

- Арех-ИHN против вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани для лососевых рыб, производства “Novartis AG”, Швейцария (Lorenzen and LaPatra, 2005). Вакцина кодирует вирусный гликопротеин и предназначена для увеличения количества и качества выращиваемой рыбы; лицензирована в 2005 г.

- LifeTide® SW 5 направлена на высвобождение гипофизом гормона роста и пролактина у свиней, производства “VGX Animal Health”, США (Khan *et al.*, 2005; Person *et al.*, 2008). Вакцина кодирует соматолиберин свиньи; лицензирована в 2008 г.

- Терапевтическая вакцина ONCEPT Canine Melanoma Vaccine против меланомы у собак, производства “Merial”, США (Bergman *et al.*, 2006). Вакцина кодирует тирозиназу человека, применяется в качестве альтернативы операционному вмешательству при меланоме; лицензирована в 2010 г.

Успешное применение ДНК-вакцин в ветеринарной практике с каждым годом дает новые подтверждения тому, что подобная вакцинация безопасна и может быть весьма эффективным оружием в борьбе с различными патологиями, включая инфекционные заболевания. Разработка новых более совершенных методов конструирования рекомбинантных плазмидных ДНК и систем адресной доставки вакцинных препаратов, полученных на их основе, несомненно, приближает тот день, когда в арсенал медицины войдут и займут достойное место вакцинные препараты, предназначенные для человека, полученные на основе рекомбинантных плазмид.

4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Материалы

4.1.1 Реактивы

Натрия хлорид, натрия гидроокись, натрий лимоннокислый, натрий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный, калий фосфорнокислый однозамещенный, калия гидроокись, лития перхлорат, ацетон, фенол, хлороформ, спирт этиловый, спирт изоамиловый, спирт изопропиловый, борная кислота, соляная кислота, фосфорная кислота, ледяная уксусная кислота (Реахим, Россия). Степень чистоты реактивов – о.с.ч. или х.ч.

Агароза, акриламид, аммония хлорид, аммония сульфат, аммония персульфат, N',N'-метиленабисакриламид, N',N',N',N'-тетраметилендиамин (ТЕМЕД), белковые маркеры молекулярных весов, бромистый этидий, глицин, глицерин, глюкоза, гуанидингидрохлорид, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP) и рибонуклеотидтрифосфаты (NTP), ДНК спермы лосося денатурированная, додецилсульфат натрия (ДСН), калия ацетат, кальция хлорид, 2-меркаптоэтанол, митомицин С, морфолинпропансульфо кислота (MOPS), магния хлорид, марганца хлорид, маркерные наборы молекулярных весов белков, мочевины, рубидия хлорид, трисгидроксиметиламинометан (Трис), тритон X-100, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозид (X-gal), изопропил-1-тио-β-D-галактозид (ИПТГ), лития хлорид, tween-20 (Sigma либо ICN, США). Степень очистки – для использования в молекулярной биологии.

Бромфеноловый синий, бычий сывороточный альбумин (БСА), додецилсульфат натрия (ДСН), ксиленианол, кумасси R-250, поливинилпироллидон, фикола-400 (Serva, Германия). Степень очистки – для использования в молекулярной биологии.

Бакто-агар, бакто-триптон, дрожжевой экстракт (Difco, США).

Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP), различные маркерные наборы длин фрагментов ДНК и молекулярных весов белков (СибЭнзим, Новосибирск, Россия).

[γ-³²P]АТР, [α-³²P]dNTP (1000-4000 Ки/ммоль) производства Радиопрепарат (Ташкент, Узбекистан).

Интерлейкин-2 человека, рекомбинантный (Діагностикум, Львов, Украина).
Ангиогенин (Ферментас, Вильнюс, Литва);

4.1.2 Наборы реактивов

Набор для выделения плазмидной ДНК (Медиген, Новосибирск, Россия).

Набор для проведения ПЦР (СибЭнзим, Новосибирск, Россия).

Набор для проведения секвенирующей реакции “Big Dye v.1” (Applied Biosystems”, США).

Набор для элюции ДНК из геля «Gel Extraction Kit» (Qiagen, Германия).

Набор для очистки фрагментов ДНК «Wizard SV Gel and PCR Clean Up System» (Promega, США).

Набор для очистки плазмидной ДНК «Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System» (Promega, США).

Набор для очистки плазмидной ДНК от эндотоксинов «EndoFree Plasmid Giga Kit» (Qiagen, Германия).

Набор для очистки продуктов реакции секвенирования «DyeEx Spin Kit» (Qiagen, Германия).

Система очистки плазмидной ДНК «PureYield®Plasmid Maxiprep» (Promega, США).

Набор для клонирования ПЦР-фрагментов «pGEM-T Vector System» (Promega, США).

Набор для клонирования ПЦР-фрагментов «pGEM-T Easy Vector System» (Promega, США).

4.1.3 Ферменты

На первом этапе работы использовали ферменты нуклеинового обмена (эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага Т4, ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) производства НПО Ферментас (Вильнюс, Литва) либо НИКТИ БАВ (Бердск, Россия). Затем использовали в основном ферментные препараты производства НПО СибЭнзим (Новосибирск, Россия). Кроме вышеназванных ферментов использовали *Taq*-ДНК-полимеразу,

M-MuLV-обратную транскриптазу этого же производителя. Лизоцим, РНКаза А (Serva, Германия).

4.1.4 Антибиотики

Антибиотики: ампициллин, тетрациклин, стрептомицин использовали различных отечественных производителей либо производства Sigma (США).

4.1.5 Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигодезоксирибонуклеотиды (далее – олигонуклеотиды) были синтезированы в лаборатории тонкого химического синтеза ГНЦ ВБ «Вектор» Горбуновым Ю.А., Рябининым В.А., Синяковым А.Н. Позже – Горбуновым Ю.А. в ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) либо Рябининым В.А. в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск). Степень очистки: ВЭЖХ либо электрофорез в ПААГ.

4.1.6 Буферные растворы

TE:

1 mM ЭДТА

10 mM Трис-HCl

pH 8,0

ТАЕ:

40 mM Трис-HCl

40 mM CH₃COOH

2 mM ЭДТА

pH 8,0

ТВЕ:

89 mM Трис-борат

2,5 mM ЭДТА

pH 8,3

Готовили: 108 г трис, 55 г борной кислоты и 9,3 г Na₂ЭДТА*2H₂O растворяли в дистиллированной воде, доводили объем до 1 л – 10х штоковый раствор.

PBS:

100 мМ NaCl

80 мМ Na₂HPO₄

20 мМ NaH₂PO₄*2H₂O

pH 7,5

Здесь приведены рабочие концентрации реагентов в растворе (1x). Готовили все растворы в концентрированном виде (10x) – штоковые растворы, как указано для TBE.

4.1.7 Растворы для трансформации клеток *E. coli***RF-1:**

100 мМ RbCl

50 мМ MnCl₂*4H₂O

30 мМ CH₃COOK

10 мМ CaCl₂*2 H₂O

15 % глицерин

pH доводили 0,2 М ледяной уксусной кислотой (CH₃COOH) до значения 5,8.

Стерилизовали фильтрованием через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Sigma, США), разливали на аликвоты и хранили при -20 °С

RF-2:

10 мМ RbCl

10 мМ MOPS

75 мМ CaCl₂*2 H₂O

15 % глицерин

pH доводили 5 М NaOH до значения 6,8. Стерилизовали и хранили аналогично RF-1.

4.1.8 Растворы для выделения плазмидной ДНК**Раствор 1:**

20 мМ ЭДТА

25 мМ Трис-HCl, pH 8,0

50 мМ глюкоза

Раствор 2:

0,2 М NaOH

1 % ДСН

Раствор 3:

3 М CH₃COONa, рН 4,8 (натрий уксуснокислый)

4.1.9 Растворы для гибридизации ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах**Раствор Денхардта (50х):**

1 % фикола-400

1 % поливинилпироллидон

1 % БСА

SSC (20х):

3 М NaCl

0,3 М Na₂C₆H₅O₇*5H₂O (натрий лимоннокислый)

SSPE (20х):

3,6 М NaCl

0,2 М NaH₂PO₄

20 мМ ЭДТА

рН 7,4

4.1.10 Питательные среды**LB (Лурия-Бертани):**

10 г/л бакто-триптон

5 г/л дрожжевой экстракт

10 г/л NaCl

Доводили показатель рН до 7,5 раствором 5 М NaOH, стерилизовали автоклавированием при 1,2 атм (127 °С) в течение 1 ч.

LB агаризованная:

В среду LB добавляли бакто-агар до концентрации 16 г/л и стерилизовали аналогично среде LB.

2xYT:

16 г/л бакто-триптон

8 г/л дрожжевой экстракт

10 г/л NaCl

Доводили показатель pH до 7,5 раствором 5 М NaOH и стерилизовали аналогично среде LB.

M9CA (Минимальная среда с казаминовыми кислотами):

48 мМ Na₂HPO₄

22 мМ KH₂PO₄

18,7 мМ NH₄Cl

1 мМ MgSO₄

0,1 мМ CaCl₂

8,5 мМ NaCl

0,4 % глюкоза

0,2 % казаминовые кислоты

Стерилизовали фильтрованием через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Sigma, США).

4.1.11 Плазмиды и векторы

В работе использовали:

- рекомбинантную плазмиду pRIL18, содержащую искусственный ген IL-2 человека под контролем *recA*-промотора *Proteus mirabilis*, любезно предоставленную Камыниной Т.П. (ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово Новосибирской области);

- рекомбинантную плазмиду pSHT23, несущую клонированный оперон шига-токсина, любезно предоставленную Козловым Ю.В. (Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, г. Москва);

- плазмиды pH3X1 и pΔВam, содержащие клонированные фрагменты генома ВНО двух штаммов с ОПТ В9R, кодирующей белок, гомологичный человеческому рецептору γ -IFN (любезно предоставлены Тотмениным А.В. и Чижиковым В.Е., ГНЦ ВБ «Вектор»);

- эукариотические экспрессионные векторные плазмиды pBKRSV (Stratagene, США) с промотором из LTR RSV и pcDNA3.1/Мус-His(-)/lacZ (Invitrogen, США) с предранним промотором CMV (любезно предоставлены Щелкуновым С.Н. и Гилевой И.П., ГНЦ ВБ «Вектор»);

- плазмиды для получения химерных белков в клетках *E. coli* pET32a (Novagen, США) и pGEX-4T-1 (Pharmacia, Швеция);

- готовые плазмидные векторы для клонирования ПЦР-фрагментов по А-Т-выступающим концам pGEM-T и pGEM-T Easy (Promega, США);

- плазмиды pFH-серии и рекомбинантные плазмиды pFL137, pIL123, содержащие фрагменты искусственного гена IL-2 человека, полученные ранее в ГНЦ ВБ «Вектор» (Данилюк и др., 1990, 1991б);

- векторные бактериофаги M13mp8, M13mp9, M13mp10 и плазмиды pBR322, pBR327, pUC18 из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор».

4.1.12 Бактериальные штаммы

В работе использовали бактериальные штаммы *Escherichia coli*:

XL1-blue (*endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)*);

JM103 (*endA1 glnV44 sbcBC rpsL thi-1 Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*);

JM109 (*endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)*);

HB101 (*F⁻ mcrB mrr hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44 λ⁻*);

RR1 – (HB101 *recA⁺*);

BL21 (*F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal [malB⁺]_{K-12}(λ^S)*) - *E. coli* B;

BL21(DE3) (*F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*) – из коллекции ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»;

VL1201 (*htpR_{am}⁻ supC strA*);

VL1222 (*htpR_{am}⁻ supC lon*) – из коллекции ФГУП «ГосНИИгенетика» (г. Москва).

4.2 Методы

4.2.1 Общие методы исследования

4.2.1.1 Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Приготовление компетентных клеток проводили по методике, описанной в руководстве «Клонирование ДНК» (Гловер, 1988) с небольшими изменениями.

Индивидуальную колонию, выращенную на чашке Петри на агаризованной среде, засекали в 5 мл жидкой LB-среды и помещали в термостат при 37 °С (или при 30 °С для штаммов RRI, VL1201, VL1222) на 15-18 ч. Затем 500 мкл полученной ночной культуры добавляли в 50 мл свежей среды LB и продолжали инкубирование при интенсивной аэрации до достижения суспензией клеток оптической плотности $D_{560}=0,8-0,9$. Полученную суспензию клеток охлаждали во льду в течение 30 мин, затем клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин при 4 °С в течение 10 мин в роторе JA-20 в центрифуге J2-21 (Beckman, США). Супернатант тщательно удаляли, осадок аккуратно ресуспендировали в 15 мл буфера RF-1 и инкубировали во льду в течение 15 мин. Клетки осаждали в аналогичных условиях, супернатант вновь удаляли. Осадок клеток ресуспендировали в 3 мл буфера RF-2 и инкубировали во льду 10 мин, после чего суспензию клеток расфасовывали в 1,5 мл пробирки типа Eppendorf по 200 мкл и хранили в низкотемпературном морозильнике при -70 °С.

4.2.1.2 Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Трансформацию компетентных клеток плазмидной ДНК или лигазной смесью проводили по методике, описанной в руководстве (Маниатис и др., 1984) с небольшими изменениями.

Компетентные клетки объемом 200 мкл размораживали во льду, добавляли 10-20 мкл лигазной смеси или 5 мкл раствора, содержащего плазмидную ДНК в концентрации 0,1 мкг/мл, аккуратно перемешивали и инкубировали 30 мин на льду. Далее клетки подвергали тепловому шоку, для чего пробирки помещали в водяную баню с температурой 42 °С на 2 мин (или 37 °С на 5 мин), затем охлаждали до 0 °С на льду и рассеивали на чашках Петри с соответствующим антибиотиком.

4.2.1.3 Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом, предложенным в работе (Birnboim and Doly, 1979) с небольшими изменениями.

Индивидуальную колонию *E. coli* засеивали в 50 мл LB-среды с соответствующими антибиотиками и растили ночь при 37 °С (или при 30 °С для штаммов RRI, VL1201, VL1222). Затем клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин при 4 °С в течение 10 мин в роторе JA-20 в центрифуге J2-21 (“Beckman”, США). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 2 мл раствора I для выделения плазмидной ДНК и охлаждали во льду.

К полученной суспензии клеток добавляли 1 мг лизоцима, растворенного в 0,1 мл раствора I для выделения плазмидной ДНК, встряхивали и инкубировали во льду в течение 5 мин. Затем к лизату добавляли 4 мл свежеприготовленного раствора II для выделения плазмидной ДНК, аккуратно перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной (18-22 °С) температуре, после чего к суспензии добавляли 3 мл раствора III для выделения плазмидной ДНК, осторожно перемешивали и инкубировали во льду в течение 30 мин. Полученный раствор центрифугировали при 17000 об/мин при 4 °С в течение 20 мин в роторе JA-20 в центрифуге J2-21, супернатант осторожно отбирали и переносили в новую пробирку, добавляли 2 мл изопропанола (в соотношении 1:1), встряхивали и центрифугировали при 10000 об/мин при 4 °С в течение 10 мин в роторе JA-20 в центрифуге J2-21.

Осадок промывали этанолом и высушивали при комнатной температуре (20-30 мин), затем растворяли в 1,5 мл буфера TE, добавляли 1,5 мл 5 М LiCl и полученный раствор инкубировали при -20 °С в течение 10 мин. После этого раствор центрифугировали при 10000 об/мин при 4 °С в течение 10 мин в роторе JA-20 в центрифуге J2-21. Супернатант переносили в чистую пробирку, добавляли 3 мл изопропанола, охлаждали при -20 °С в течение 20 мин и ДНК осаждали в вышеприведенных условиях. Полученный осадок ДНК вновь промывали этанолом, высушивали и растворяли в 500 мкл буфера TE, после чего добавляли 5 мкл РНКазы (10 мг/мл), инкубировали в термостате при 37 °С в течение 10 мин. Далее добавляли 500 мкл фенола, насыщенного TE-буфером, встряхивали и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 2 мин в центрифуге типа

«Эппендорф». Водную фазу аккуратно отбирали в чистые пробирки, добавляли 50 мкл 3 М ацетата натрия, 1,2 мл этанола и выдерживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч. Затем ДНК осаждали центрифугированием аналогично вышеописанному, осадок промывали этанолом, вновь центрифугировали, высушивали и растворяли в 200 мкл ТЕ-буфера.

В аналитических количествах ДНК выделяли для скрининга рекомбинантных клонов из 3-5 мл ночной культуры по вышеприведенной методике при пропорциональном уменьшении объемов всех растворов (I – 100 мкл, II – 200 мкл, III – 150 мкл) без добавления лизоцима. Все операции проводились на рабочем столе с использованием настольной центрифуги «Эппендорф».

4.2.1.4 Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

Для гидролиза ДНК рестриктазами готовили реакционную смесь, которая обычно содержала 1-2 мкг ДНК в объеме 20 мкл, рестриктазу из расчета 1-2 е.а. на 1 мкг ДНК, 2 мкл соответствующего буфера 10х, поставляемого вместе с ферментом фирмой-производителем. Гидролиз проводили в условиях, рекомендуемых производителем, устанавливая время реакции, как правило, 2-3 ч. При необходимости время гидролиза увеличивали. Для получения гидролизованных фрагментов в препаративных количествах обычно брали 10 мкг ДНК и реакцию проводили в 100-200 мкл в течение 6 ч.

4.2.1.5 Введение радиоактивной метки ^{32}P по «липким» концам молекул ДНК

К 2-10 пмоль фрагмента ДНК с «липкими» концами, образованными действием эндонуклеаз рестрикции, добавляли 2 мкл полимеразного буфера (1/10 от конечного объема реакционной смеси), 10 пмоль требуемого $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ (1-4 мкКи/пмоль), другие необходимые dNTP до конечной концентрации 200 мкМ и 2-4 е.а. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова), доводили стерильной дистиллированной водой до 20 мкл и инкубировали при $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин. Реакцию останавливали осаждением нуклеотидного материала, как описано в следующей главе (4.2.1.6).

4.2.1.6 Фосфорилирование фрагментов ДНК. Введение радиоактивной метки ^{32}P с помощью Т4-полинуклеотидкиназы

Для получения меченых ^{32}P олигонуклеотидов и других фрагментов ДНК к 10-50 пмоль ДНК добавляли 2 мкл киназного буфера (10x), 2-3 пмоль $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с удельной активностью 1-4 мкКи/пмоль в ТЕ-буфере и 1-2 е.а. Т4-полинуклеотидкиназы. Объем доводили стерильной дистиллированной водой до 20 мкл и помещали в термостат при 37 °С на 30 мин. Останавливали реакцию инаktivацией фермента при 100 °С в течение 4 мин либо осаждением нуклеотидного материала. В случае невысоких концентраций ДНК (менее 30 мкг/мл) использовали осаждение 2 % раствором перхлората лития в ацетоне, для чего добавляли 200 мкл этого раствора (десятикратный объем), перемешивали и осаждали ДНК центрифугированием. Осадок промывали последовательно ацетоном и 70 % этанолом, высушивали и использовали по назначению.

Для сборки синтетических фрагментов ДНК из олигонуклеотидов в реакцию брали по 100-200 пмоль каждого нуклеотида с внутренними 5'-ОН группами (в составе целевого фрагмента) и проводили вышеописанную реакцию, после чего в смесь добавляли АТР до конечной концентрации 1 мМ и повторно инкубировали 30 мин при 37 °С. По окончании реакции фермент инаktivировали, смесь охлаждали и использовали для реакции лигирования.

4.2.1.7 Лигирование

Типичная лигазная смесь формировалась следующим образом. Конечный объем - 30 мкл. Количество векторной молекулы - около 0,2 пмоль, количество фрагмента (фрагментов) – по 1-2 пмоль (вектор и фрагмент после рестрикции были очищены одним из приведенных ниже способов), 50 е.а. ДНК-лигазы фага Т4 (50-100 е.а./мкл), 3 мкл поставляемого лигазного буфера 10x (СибЭнзим, Новосибирск). Реакционную смесь инкубировали в течение 15-18 ч при 8-10 °С либо 3-5 ч при 16 °С.

4.2.1.8 Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот в ПААГ и агарозном геле

Электрофоретический анализ фрагментов ДНК проводили в соответствии с рекомендациями, приведенными в руководстве (Маниатис и др., 1984). Электрофорез в агарозном геле проводили в горизонтальных пластинах при напряженности электрического поля 5-10 В/см в течение 1-1,5 ч, используя 1,0-2,0 % агарозный гель в буфере ТАЕ. Электрофорез в ПААГ осуществляли на пластинах в вертикальных камерах, используя буфер ТВЕ. Концентрация акриламида в геле была от 4 до 15 % в зависимости от размера фрагментов ДНК, подвергаемых разделению. Пластины геля (ПААГ и агарозный) окрашивали раствором бромистого этидия (0,2 мкг/мл), промывали водой и фотографировали в отраженном УФ-свете при помощи системы визуализации изображений.

4.2.1.9 Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля

Элюцию фрагментов ДНК из агарозного геля при помощи набора «Gel Extraction Kit» (Qiagen, Германия) проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце процесс выглядел следующим образом. К вырезанной полоске агарозного геля, содержащей нужный фрагмент ДНК, добавляли в соотношении 1:3 (вес/объем) раствор QG для расплавления агарозы и помещали в термостат при 50 °С на 10 мин до полного растворения геля. Затем добавляли изопропанол (1:1) и перемешивали. Раствор наносили на сорбирующий слой колонки и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 мин в центрифуге типа “Эппендорф”. Элюат отбрасывали, а колонку промывали 750 мкл раствора PE центрифугированием при 13000 об/мин в течение 1 мин. ДНК смывали с колонки 50 мкл TE-буфера аналогичным центрифугированием. При использовании набора другой фирмы строго следовали вложенной инструкции производителя.

4.2.1.10 Элюция фрагментов ДНК из ПААГ

Из ПААГ фрагменты ДНК извлекали методом пассивной элюции. В качестве примера приведем методику извлечения ДНК из полоски геля размером примерно 30x3x1 мм.

Полоску геля, содержащую целевой фрагмент ДНК, переносили пинцетом в пробирку типа «Eppendorf» и тщательно измельчали стеклянной палочкой. К измельченному гелю добавляли 1 мл буфера для элюции (10 mM трис-HCl, pH 8,0; 1 mM ЭДТА; 200 mM NaCl) и энергично перемешивали. Пробирку помещали в морозильную камеру на -20 °C на 15-20 мин, затем оттаивали при комнатной температуре (20-22 °C).

Суспензию ПААГ центрифугировали при 13000 об/мин в течение 3 мин, автоматической пипеткой аккуратно отбирали водную (верхнюю) фазу объемом 0,5 мл и переносили в чистую аналогичную пробирку, добавляли 1 мл этанола, встряхивали. К оставшейся суспензии геля добавляли 0,5 мл того же буфера, встряхивали и затем центрифугировали вместе с пробиркой, залитой этанолом, аналогично вышеуказанному.

Спиртовой раствор декантировали и в эту же пробирку переносили 0,5 мл водной фазы из пробирки с суспензией геля, добавляли 1 мл этанола, встряхивали и аналогично центрифугировали. Супернатант декантировали, в пробирку с осадком вносили 1 мл 70 % этанола, энергично встряхивали и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1-2 мин. Осадок ДНК высушивали и растворяли в воде или буфере, требуемом для проведения последующей реакции. Для длительного хранения применяли буфер TE и образцы ДНК помещали в хранилище при -20 °C.

Второй метод извлечения фрагментов ДНК из полоски геля состоял в проведении электроэлюции на ионнообменную бумагу DE-81 в TBE-буфере при мощности 3 Вт в течение 1,5-3 ч. По окончании переноса бумажный диск промывали водой, этанолом и высушивали. Десорбцию проводили 1,5 М водным раствором перхлората лития при 55 °C 4 раза по 15 мкл, собирая раствор с бумаги в пробирку типа «Eppendorf» кратковременным (10 с) центрифугированием. По окончании процесса к раствору ДНК добавляли 600 мкл ацетона, встряхивали и осаждали, как описано выше.

4.2.1.11 Гибридизация ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах

Метод гибридизации ДНК использовали при скрининге рекомбинантных бактериальных клонов на первом этапе работы. При этом использовали методику,

изложенную в руководстве Маниатиса с соавторами (Маниатис и др., 1984) с некоторыми изменениями.

Бактериальные колонии переносили на фильтр методом реплик и обрабатывали последовательно 1 мл 0,5 М NaOH дважды и 1 мл раствора, содержащего 1,5 М NaCl и 1 М трис-HCl, pH 7,4, на пленке Saran Wrap по 5 мин, после чего фильтр высушивали, а затем помещали на 70 °C на 2 ч. После прогрева фильтр помещали в раствор SSC (6x) на 5 мин и выдерживали при выбранной температуре гибридизации в 5 мл предгибризационного буфера (раствор Денхардта (5x), буфер SSPE (5x), 0,1 % ДСН и 100 мкг/мл денатурированной спермы лосося) в течение 10 мин. После этого раствор декантировали и добавляли аналогичный, но содержащий 20-30 пмоль меченого ³²P зонда (1 мкКи/пмоль), полученного, как описано выше (4.2.1.5 и 4.2.1.6). Гибридизацию вели в течение 2 ч, после чего раствор с зондом аккуратно собирали в пробирку, а фильтр промывали в течение 10 мин при температуре гибридизации в 20 мл раствора SSC (2x) с добавлением ДСН до концентрации 0,1 %, затем промывку повторяли при комнатной (20-22 °C) температуре. Фильтр высушивали и экспонировали с пленкой типа PM-1 или PM-B в течение 15-18 ч. По полученному радиоавтографу выявляли рекомбинантные клоны для дальнейшего анализа.

4.2.1.12 Иммуноблоттинг

Пластину геля после разделения белков в ПААГ помещали в камеру для переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану в буфере, содержащем 187 г/л глицина, 20 % этанола, 0,1 % ДСН, pH 8,3, при силе тока 50 мА в течение 2 ч. Затем фильтр выдерживали 40 мин при комнатной (20-22 °C) температуре в растворе, содержащем антитела к исследуемому белку (например, мышинные МКА к IL-2 человека, к белку р24 ВИЧ-1, кроличьи антитела против токсина шигеллы) в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали 3 ч при 25 °C в режиме медленной вибрации. После этого фильтр отмывали трижды по 20 мин раствором 0,1 М трис-HCl (pH 8,0), 0,15 М NaCl, 0,1 % твин-20 и помещали в 10 мл раствора, содержащего антивидовые вторичные антитела (например, кроличьи антитела на мышинные), конъюгированные с пероксидазой хрена, 1 % желатин, 25 мМ трис-HCl, pH 8,0 на 2 ч при той же температуре, после чего фильтр промывали 2 раза по

10 мин в таком же растворе без антител. Иммунные комплексы выявляли в растворе, содержащем 80 мМ трис-НСl, рН 7,5, 15 % этанола, 0,02 % H₂O₂, 0,5 мг/мл 4-хлор-1-нафтола в течение 10 мин при энергичном встряхивании.

4.2.1.13 Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК

На первом этапе определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК (далее – секвенирование) проводили химическим методом, предложенным Максамом и Гилбертом (Maxam and Gilbert, 1980) с некоторыми изменениями, подробно описанными в работе Данилюк с соавторами (Данилюк и др., 1986). Введение радиоактивной метки проводили по методикам, изложенным выше (4.2.1.5 и 4.2.1.6).

В дальнейшем реакцию секвенирования проводили с использованием BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit («Applied Biosystems», США) с последующей очисткой продуктов с помощью набора DyeEx Spin Kit (Qiagen, Германия). Капиллярный электрофорез продуктов реакции секвенирования осуществляли на автоматическом анализаторе ABI 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Все процедуры выполняли строго в соответствии с рекомендациями производителей. Первичный анализ полученных нуклеотидных последовательностей в виде хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы Sequencher v. 4.0.5 (Gene Codes, США).

4.2.1.14 Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Для выравнивания нуклеотидных и а/к последовательностей использовали программы BioEdit v.7.0 (Hall, 1999), ClustalW и ClustalX v.1.8 (Thompson *et al.*, 1994, 1997). Филогенетический анализ нуклеотидных и а/к последовательностей различных штаммов и изолятов вируса ККГЛ и расчет расстояний между генетическими группами при проведении генотипирования выполняли методом объединения ближайших соседей с помощью программы Mega v.3.1 (Kumar *et al.*, 2001).

Поиск гомологичных последовательностей в GenBank осуществляли посредством BLAST-анализа (Altschul *et al.*, 1997) с использованием интернет-ресурса NCBI (National Center for Biotechnology Information). Праймеры

рассчитывали с помощью программы Oligo различных версий (Rychlik and Rhoads, 1989; Rychlik and Rychlik, 2000).

Анализ картин рестрикции в интересующих нуклеотидных последовательностях, виртуальное клонирование целевых генов и построение карт рекомбинантных плазмид проводили с помощью программы Vector NTI 9.0.0 (InforMax, США).

4.2.2 Частные методики исследования

4.2.2.1 Получение рекомбинантной плазмиды pIL2m

Плазмиду pIL2m получали в два этапа. На первом конструировали рекомбинантную плазмиду pIL4m клонированием достроенного и гидролизованного *Sau3A*-дуплекса из олигонуклеотидов (XIII) и (XIV) в векторе pFH125/*Bam*HI совместно с олигонуклеотидным дуплексом (XVII), как показано ниже на рисунке 5.3 в главе 5.1.2 по методикам, приведенным выше в этом разделе. Нуклеотидная последовательность использованных в работе олигонуклеотидов приведена на указанном выше рисунке.

На втором этапе использовали *Pst*I-*Fok*I-фрагмент плазмиды pIL123 и *Fok*I-*Bam*HI-фрагмент плазмиды pIL4m, которые лигировали совместно с вектором pFH125/*Bam*HI-*Pst*I, как описано выше. В результате была получена целевая рекомбинантная плазида pIL2m. Скрининг рекомбинантных клонов проводили методом молекулярной гибридизации ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах, используя меченый, как описано выше, олигонуклеотид XIII в качестве зонда с последующим рестрикционным анализом и секвенированием по методу Максама и Гилберта (Maxam and Gilbert, 1980).

4.2.2.2 Получение рекомбинантной плазмиды pIL4s

Плазида pIL4s была получена с использованием ПЦР и плазмиды pFL137, несущей 3'-концевой фрагмент гена IL-2 человека, в качестве матрицы (см. ниже рисунок 5.4). Для этого матричную ДНК линеаризовали расщеплением рестриктазой *Pst*I и проводили 30 циклов амплификации, после чего выделяли амплифицированные фрагменты длиной 55 и 80 п.н., обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I с добавлением смеси dNTP, расщепляли рестриктазами

SalI (фрагмент 55 п.н.) и *Sau3A* (фрагмент 80 п.н.), вновь очищали и лигировали совместно с вектором pFH123/*Bam*HI-*SalI*. Скрининг рекомбинантных клонов и подтверждение соответствия нуклеотидной последовательности вставки ожидаемой проводили как описано выше.

4.2.2.3 Конструирование рекомбинантной плазмиды pFHAs10, кодирующей А-субъединицу токсина шигеллы

Общая схема получения приведена на рисунке 5.8 в главе 5.2.2.

На первом этапе выделяли *Bgl*II-*Bsp*RI-фрагмент (1,6 т.п.н.) плазмиды pSHT23, содержащий полную последовательность А-гена, затем его расщепляли рестриктазой *Bgl*II и выделяли оба фрагмента, полученных в результате гидролиза. *Bgl*II-*Bsp*RI-фрагмент подвергали действию рестриктазы *Fok*I и получали *Bgl*II-*Fok*I-фрагмент. Недостающий 3'-концевой участок гена получали химико-ферментативным синтезом из 4-х олигонуклеотидов (ниже на рисунке 5.8 они обозначены как 1-4, здесь приведены списком в направлении 5'→3'):

1. ATATTGTGGGATTCATCCACTCTGG
2. GGGCAATTCTGATGCCGAGAАСТАТТАGСТCAGCGСТАТGAGТCGACTGСА
3. GTCGACTCАТАGCGСТGAGСТААТАGТТСТGCG
4. САТCAGAАТТGСССССCAGAGТGGATGAАТСССCАCА

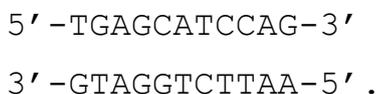
На следующем этапе вышеназванные три фрагмента совместно лигировали с вектором pFH125/*Pst*I-*Bam*HI и клонировали в клетках *E. coli* с получением рекомбинантной плазмиды pFHА10, которую отбирали аналогично описанному выше, правильность встройки подтверждали секвенированием.

На третьем этапе *Eco*RI-*Hind*III-фрагмент плазмиды pFHА10 реклонировали в ДНК бактериофага M13mp9 и проводили олигонуклеотиднаправленный мутагенез с целью образования участка узнавания для рестриктазы *Eco*31.I (см. рисунок 5.8б).

На последнем этапе модифицированный фрагмент А-гена был возвращен в исходную плазмиду по тем же участкам рестрикции после проверки соответствия заданной последовательности нуклеотидов методом Сэнгера (Sanger *et al.*, 1977). Таким образом была получена целевая рекомбинантная плазида pFHAs10, несущая А-ген, полностью подготовленный для создания любых генетических конструкций, в том числе химерных генов.

4.2.2.4 Реконструкция плазмиды pIL2 с получением целевой плазмиды pIL2d

Для получения плазмиды pIL2d выделяли *PstI-FokI*-фрагмент плазмиды pIL2 и лигировали его с вектором pFH125/*EcoRI-PstI* совместно с олигонуклеотидным дуплексом:



Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* JM109, как описано выше. Отбор рекомбинантов проводили тоже аналогично вышеописанному, секвенирование осуществляли по методу, предложенному Максамом и Гилбертом (Maxam and Gilbert, 1980).

4.2.2.5 Получение плазмиды pRIL3

Общая схема получения целевой плазмиды приведена ниже на рисунке 5.5 в главе 5.1.3.

EcoRI-гидролизованную плазмиду pBR327 обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I с использованием dATP и dTTP, а затем гидролизовали рестриктазой *SalI*. Плазмиду pRIL18 подвергали последовательно действию рестриктаз *SmaI* и *SalI*, после чего выделяли целевой *SmaI-SalI*-фрагмент (630 п.н.) и лигировали его совместно с описанным выше и выделенным вектором на основе плазмиды pBR327.

Скрининг рекомбинантных клонов и секвенирование проводили аналогично вышеописанному.

4.2.2.6 Получение плазмид pRIL2m и pRIL2s

Для получения целевой плазмиды pRIL2m в векторе pRIL3/*PvuII-SalI* клонировали *PvuII-EcoRI*-фрагмент плазмиды pIL2m, содержащий ген IL-2m без первых 11 кодонов и участок полилинкера векторной плазмиды, совместно с полилинкерным *EcoRI-SalI*-фрагментом плазмиды pFH123.

Для получения экспрессирующей ген (Phe¹²¹)-IL-2 плазмиды – pRIL2s – клонировали *PvuII-FokI*-фрагмент плазмиды pIL123, составляющий основную часть гена IL-2 (Данилюк и др., 1991a), совместно с *FokI-SalI*-фрагментом

плазмиды pIL4s, представляющим мутантную 3'-концевую часть гена, в векторе pRIL3/*PvuII-SalI*, содержащем 5'-концевую часть гена IL-2.

Все операции по скринингу рекомбинантных клонов проводились в соответствии с вышеописанными методиками.

4.2.2.7 Получение плазмид pRILA4 и pRAIL3, направляющих синтез химерных белков ILA и AIL

Для получения целевой рекомбинантной плазмиды pRILA4 лигировали *PvuII-FokI*-фрагмент гена IL-2 из плазмиды pIL2d и *Eco31.I-SalI*-фрагмент A-гена из плазмиды pFHAs10 с вектором pRIL3/*PvuII-SalI* и с коннектором для стыковки 5'-выступающих *FokI*- и *Eco31.I*- концов двух фрагментов:



Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* JM103. Далее скрининг вели аналогично вышеописанному.

В случае плазмиды pRAIL, содержащей ген химеротоксина AIL, мы испытали существенные сложности при реализации схемы клонирования, описанной выше. Поэтому вектор клонирования был заменен на неэкспрессирующий - pFH126/*EcoRI-SalI*. Клетки *E. coli* JM103 трансформировали лигазной смесью, составленной из 0,5 пмоль этого вектора, *Eco31.I-HaeII*-фрагмента A-гена плазмиды pFHAs10 и *HaeII-SalI*-фрагмента гена IL-2 из плазмиды pIL2 (по 5 пмоль) с коннектором для стыковки *EcoRI*- и *Eco31.I*-концов вектора и A-гена:



Из полученной рекомбинантной плазмиды pAIL1 выделяли *EcoRI-SalI*-фрагмент с химерным геном AIL и реклонировали его в экспрессионный вектор pRIL3/*EcoRI-SalI* с получением целевой плазмиды pRAIL3, направляющей синтез химерного белка AIL.

Методики скрининга рекомбинантных клонов и подтверждение структуры целевого гена в полученной рекомбинантной плазмиде аналогичны описанным выше для других генов.

4.2.2.8 Реконструкция плазмид pRIL3, pRIL18, pRILA4, pRAIL3 и сравнительный анализ уровней синтеза целевых рекомбинантных белков

Реконструкция этой серии плазмид заключалась в формировании палиндромного участка вслед за стоп-кодонами трансляции целевых генов путем встройки по *SalI*-участку тандема *SalI-EcoRI*-фрагментов, полученных из полилинкерной области векторной плазмиды pFH123. Рекомбинантные плазмиды pRIL3, pRIL18, pRILA4, pRAIL3 были снабжены вышеназванной палиндромной последовательностью, что было подтверждено рестрикционным анализом. В результате были получены рекомбинантные плазмиды pRIL4t, pRIL7t, pRIL18t, pRILA4t, pRAIL3t.

Уровни синтеза рекомбинантных белков в клетках *E. coli* JM103, обеспечиваемые различными плазмидами, были сопоставлены в одних и тех же условиях: 10 мл среды M9CA, индуктор – митомицин С (конечная концентрация - 2 мкг/мл), время индукции – 3 ч (внесение индуктора – при оптической плотности суспензии $D_{600}=1,00$). Клетки штаммов-продуцентов ресуспендировали в 1 мл PBS, разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе и собирали центрифугированием тельца включений, которые солюбилизовали в растворе 8 М мочевины (либо 6 М гуанидингидрохлорида), затем анализировали методом электрофореза в ПААГ и определяли концентрацию и выход целевого рекомбинантного белка по методу Брэдфорд (Bradford, 1976), используя в качестве калибровочного раствор БСА.

4.2.2.9 Получение экспрессионной плазмиды pRTU1

Для получения целевой плазмиды готовили лигазную смесь, состоящую из *EcoRI-EcoRV*-фрагмента плазмиды pEZTZ318 и *EcoRI-NruI*-фрагмента плазмиды pRIL7t. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* JM109. Протоколы представлены выше. Отбор рекомбинантов проводили рестрикционным анализом плазмидной ДНК с подтверждением правильности структуры секвенированием области реконструкции.

4.2.2.10 Получение рекомбинантных плазмид pRIRinT и pRIRgT

Фрагменты ДНК с генами целевых белков получали из рекомбинантных плазмид с клонированными участками генома ВНО, которые содержали искомую ОПТ В9R. Из плазмиды pH3X1 извлекали *AsuII-SalI*-фрагмент с геном гомолога рецептора γ -IFN штамма India-1967, а из плазмиды p Δ Bam – *AsuII-XhoI*-фрагмент с аналогичным геном штамма Garcia-1966 (подробная схема приведена ниже на рисунке 5.15).

Целевые рекомбинантные плазмиды получали в результате стандартного (гибридизация и анализ с помощью рестриктаз) скрининга клонов, полученных после трансформации клеток *E. coli* JM109 лигазной смесью, составленной из 0,4 пмоль вектора pRTU1/*EcoRI-SalI*, 4 пмоль вышеуказанного фрагмента вирусной ДНК и 12 пмоль фосфорилированного синтетического коннектора в виде ДНК-дуплекса с «липкими» *EcoRI-AsuII*-концами (см. рисунки 5.15 и 5.16 ниже, на последнем приведена нуклеотидная последовательность использованного ДНК-дуплекса).

4.2.2.11 Синтез и экспрессия гена аналога человеческого анафилатоксина C5a

Для синтеза гена человеческого анафилатоксина C5a использовали 10 олигонуклеотидов, структура которых приведена ниже в таблице 4.1.

Для конструирования рекомбинантной плазмиды pFHC5a/3 дуплекс, полученный лигированием 6 олигонуклеотидов (1-6) – фрагмент I – клонировали в составе вектора pFH123/*BamHI*. Аналогично клонировали и второй фрагмент гена C5a, полученный в результате достройки частично комплементарных полинуклеотидов 7 и 8 (по таблице 4.1).

Первый дуплекс извлекали из полученной рекомбинантной плазмиды в виде *EcoRI-HhaI*-фрагмента, второй – в виде *HhaI-FokI*-фрагмента (рисунок 5.12) и клонировали их в векторе pFH123/*EcoRI-SalI* совместно с олигонуклеотидным дуплексом, составленным из полинуклеотидов 9 и 10, образующим третий дуплекс, имеющий «липкие» концы *FokI* (комплементарен таковому второго фрагмента) и *SalI* с получением целевой рекомбинантной плазмиды pFHC5a/3.

Таблица 4.1 – Олигонуклеотиды, использованные для синтеза гена аналога человеческого анафилатоксина C5a

№	Структура (5'→3')	Кодируемая область*	Длина
1	GATCCAGTATGTTGCAAAAAAAAAATTGAAGAAATTGCTGCTAAATATAAACATTCTGTTGTAAAAAATG	1-21 (+)	70
2	TTGTTATGATGGAGCTTCTGTТААТААТ	22-30 (+)	28
3	GATGAAACCTGCGAACAACGCGC	31-37 (+)	23
4	TTTATATTTAGCAGCAATTTCTTCAATTTTTTTTTTGCAACATACTG	1-14 (-)	46
5	TCCACCATAACAACATTTTTТААСААСАГААТG	15-25 (-)	33
6	GATCGCGCGTTGTTTCGCAGGTTTCATCATTTAААСАГААGС	26-37 (-)	42
7	CGCTGCTAGAAATTTCTTTGGGACCTAGATGTATTAAAGCATTТАСАГАА	38-53 (+)	49
8	CCTGTCGACGCTCTCAATTGAGAAGCAACAACAACATTTCTGTAAATGCTTTA	49-63 (-)	54
9	AGCGAATATTTCTCATAAAGATATGCAATTGGGAAGATAGGATCCG	63-74 (+)	46
10	TCGACGGATCCTATCTTCCCAATTGCATATCTTTATGAGAAATATT	64-74 (-)	46

Примечание: * - (+) – кодирующая цепь, (-) – комплементарная ей.

На втором этапе получали плазмиду pFHC5ad, в которой был смещен участок узнавания для рестриктазы *FokI* относительно 5'-конца гена – клонировали *FokI-SalI*-фрагмент гена из плазмиды pFHC5a/3 в векторе pFH123/*EcoRI-SalI* совместно с олигонуклеотидным дуплексом в качестве *EcoRI-FokI*-коннектора:

5' -AATTCTGGATG-3'

3' -GACCTACGTCA-5' .

Для достижения экспрессии гена человеческого анафилатоксина C5a была получена рекомбинантная плазида pRC5a, для чего ген IL-2 в плазмиде pRIL3 был заменен синтетическим геном C5a по *EcoRI-SalI*-участкам рестрикции.

4.2.2.12 Экспрессия гена ангиогенина

Синтетический ген ангиогенина получали из бактериофага M13mp8-ang в виде *EcoRI-HindIII*-фрагмента и встраивали в векторную плазмиду pRTU1 по тем же участкам рестрикции под контроль *recA*-промотора *P. mirabilis* с образованием целевой плазмиды pRTang. Скрининг рекомбинантных клонов, полученных после трансформации клеток *E. coli* JM103 лигазной смесью, составленной из вышеуказанных фрагментов ДНК, вели аналогично описанному ранее (гибридизация и анализ плазмидной ДНК с помощью рестриктаз)

Для достижения эффективной экспрессии гена ангиогенина клетки *E. coli* VL1212 трансформировали плазмидой pRTang, выращивали в среде M9CA и индуцировали митомицином С (конечная концентрация – 2 мкг/мл), время индукции – 6-12 ч (внесение индуктора – при оптической плотности суспензии $D_{600}=1,00$). Наличие продукта экспрессии целевого гена фиксировали электрофоретически с использованием коммерческого препарата ангиогенина в качестве маркерного белка с молекулярной массой 14,2 кДа.

4.2.2.13 Синтез искусственного гена TCI

Перечень всех олигонуклеотидных праймеров для синтеза блоков гена TCI и схема сборки целевого гена представлены в разделе 5 (Таблица 5.2 и рисунки 5.20 – 5.22). Предварительно готовили растворы всех праймеров в концентрации 10 пмоль/мкл, т.е. 10 нМ, раствор смеси четырех dNTP в концентрации 5 мМ каждого, а также кДНК ВИЧ-1 в концентрации 100 нг/мкл (далее кДНК). На всех

этапах использовали термостойкую *Taq*-ДНК-полимеразу с активностью 5 е.а./мкл (далее полимераз), соответствующий стандартный буфер 10x (далее буфер) и дистиллированную деионизованную стерильную воду (далее вода).

Методика получения блока 1 гена TCI

Готовили реакционные смеси для проведения ПЦР следующего состава:

Вода – 70 мкл; буфер – 10 мкл; кДНК – 1 мкл; dNTP – 16 мкл; праймер 7 – 1 мкл; праймер 8 – 1 мкл; полимераз – 1 мкл (смесь для получения фрагмента А).

Вода – 70 мкл; буфер – 10 мкл; кДНК – 1 мкл; dNTP – 16 мкл; праймер 9 – 1 мкл; праймер 10 – 1 мкл; полимераз – 1 мкл (смесь для получения фрагмента В).

Условия реакций:

92 °С – 0,8 мин; 48 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,5 мин - 2 цикла;

92 °С – 0,6 мин; 52 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,2 мин - 13 циклов;

92 °С – 1,2 мин; 56 °С - 1,2 мин; 70 °С - 1,2 мин - 1 цикл.

По окончании реакции в каждую реакционную смесь добавляли по 100 мкл хлороформа и 100 мкл фенола, интенсивно встряхивали и центрифугировали на центрифуге типа Eppendorf (12000 g) в течение 1 мин. Водную фазу переносили в чистую пробирку, добавляли 10 мкл ацетата калия 3 М и 250 мкл этанола, перемешивали, выдерживали 1 ч при -20 °С и ДНК осаждали центрифугированием, как указано выше. Осадок промывали этанолом, центрифугировали и высушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. ДНК-фрагменты разделяли в 6 % ПААГ и выделяли целевые фрагменты из полосок геля, как описано в главе 4.2.8.

Для получения фрагмента С готовили реакционную смесь следующего состава:

Вода – 57 мкл; буфер – 10 мкл; dNTP – 16 мкл; фрагмент В – 5 мкл; праймер 10 – 6 мкл; праймер 11 – 1 мкл; праймер 12 – 1 мкл; праймер 13 – 1 мкл; праймер 14 – 2 мкл; полимераз – 1 мкл.

Условия реакции:

92 °С – 1,2 мин; 45 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,5 мин - 2 цикла;

92 °С – 0,6 мин; 50 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,3 мин - 22 цикла;

92 °С – 1,2 мин; 52 °С - 1,2 мин; 70 °С - 1,2 мин - 1 цикл.

ПЦР-фрагмент С выделяли из реакционной смеси по схеме, описанной выше.

Для сборки блока 1 гена TCI смешивали:

Вода – 62 мкл; буфер – 10 мкл; dNTP – 16 мкл; фрагмент А – 5 мкл; фрагмент С – 5 мкл; полимеразы – 1 мкл.

Условия реакции:

92 °С – 1,2 мин; 45 °С - 1,5 мин; 50 °С – 1,5 мин; 70 °С - 1,5 мин - 1 цикл; затем в реакционную смесь добавляли праймер 7 и праймер 10 по 1 мкл и проводили ПЦР в следующих условиях:

92 °С – 0,8 мин; 50 °С - 0,8 мин; 70 °С - 0,6 мин - 19 циклов;

92 °С – 1,3 мин; 52 °С - 1,2 мин; 70 °С - 1,5 мин - 1 цикл.

Целевой ПЦР-фрагмент выделяли, как описано выше, затем гидролизовали рестриктазами *VamHI* и *XhoI* и подвергали электрофорезу в 4 % ПААГ аналогично вышеописанному. После элюции фрагмента ДНК из геля, как описано выше, ДНК растворяли в 20 мкл ТЕ-буфера и хранили при -20 °С.

Методика получения блока 2 гена TCI

Готовили реакционные смеси для проведения ПЦР следующего состава:

Вода – 70 мкл; буфер – 10 мкл; кДНК – 1 мкл; dNTP – 16 мкл; праймер 15 – 1 мкл; праймер 16 – 1 мкл; полимеразы – 1 мкл (смесь для получения фрагмента D).

Вода – 70 мкл; буфер – 10 мкл; кДНК – 1 мкл; dNTP – 16 мкл; праймер 19 – 1 мкл; праймер 20 – 1 мкл; полимеразы – 1 мкл (смесь для получения фрагмента E).

Вода – 70 мкл; буфер – 10 мкл; кДНК – 1 мкл; dNTP – 16 мкл; праймер 21 – 1 мкл; праймер 22 – 1 мкл; полимеразы – 1 мкл (смесь для получения фрагмента F).

Условия реакций:

92 °С – 0,8 мин; 48 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,5 мин - 2 цикла;

92 °С – 0,6 мин; 52 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,2 мин - 13 циклов;

92 °С – 1,2 мин; 56 °С - 1,2 мин; 70 °С - 1,2 мин - 1 цикл.

Очищенные фрагменты D, E, F получали аналогично вышеописанному.

Для получения фрагмента G смешивали:

Вода – 62 мкл; буфер – 10 мкл; dNTP – 16 мкл; фрагмент E – 5 мкл; фрагмент F – 5 мкл; полимеразы – 1 мкл.

Условия реакции:

92 °С – 1,2 мин; 45 °С - 1,2 мин; 50 °С – 1,2 мин; 70 °С - 1,2 мин - 1 цикл; затем в реакционную смесь добавляли праймер 19 и праймер 22 по 1 мкл и проводили ПЦР в следующих условиях:

92 °С – 0,8 мин; 50 °С - 0,8 мин; 70 °С - 0,4 мин - 19 циклов;

92 °С – 1,2 мин; 55 °С - 1,2 мин; 70 °С - 1,5 мин - 1 цикл.

Для получения фрагмента Н смешивали:

Вода – 63 мкл; буфер – 10 мкл; dNTP – 16 мкл; фрагмент D – 5 мкл; праймер 15 – 2 мкл; праймер 17 – 1 мкл; праймер 18 – 2 мкл; полимеразы – 1 мкл.

Условия реакции:

92 °С – 1,2 мин; 45 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,4 мин - 1 цикл;

92 °С – 0,6 мин; 50 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,2 мин - 18 циклов;

92 °С – 1,2 мин; 52 °С - 1,2 мин; 70 °С - 0,8 мин - 1 цикл.

Получение целевого ПЦР-фрагмента, содержащего блок 2 гена TCI, осуществляли аналогично сборке блока 1 с использованием праймеров 15 и 22. Выделение ПЦР-фрагмента проводили по схеме, описанной для блока 1. Для формирования 5'-выступающих «липких» концов использовали рестриктазы *Bam*HI и *Sall*.

Методика получения блока 3 гена TCI

Готовили реакционные смеси для проведения ПЦР следующего состава:

Вода – 70 мкл; буфер – 10 мкл; кДНК – 1 мкл; dNTP – 16 мкл; праймер 1 – 1 мкл; праймер 2 – 1 мкл; полимеразы – 1 мкл. Смесь для получения фрагмента К.

Вода – 70 мкл; буфер – 10 мкл; кДНК – 1 мкл; dNTP – 16 мкл; праймер 3 – 1 мкл; праймер 4 – 1 мкл; полимеразы – 1 мкл. Смесь для получения фрагмента L.

Условия реакций:

92 °С – 0,8 мин; 48 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,4 мин - 2 цикла;

92 °С – 0,6 мин; 52 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,2 мин - 13 циклов;

92 °С – 1,2 мин; 56 °С - 1,2 мин; 70 °С - 0,8 мин - 1 цикл.

Для реакционной смеси фрагмента М смешивали:

Вода – 70 мкл; буфер – 10 мкл; кДНК – 1 мкл; dNTP – 16 мкл; праймер 5 – 1 мкл; праймер 6 – 1 мкл; полимеразы – 1 мкл.

Условия реакции:

92 °С – 1,2 мин; 48 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,8 мин - 2 цикла;

92 °С – 0,6 мин; 52 °С - 0,6 мин; 70 °С - 0,4 мин - 13 циклов;

92 °С – 1,2 мин; 56 °С - 1,2 мин; 70 °С - 0,8 мин - 1 цикл.

Очищенные фрагменты К, L, М выделяли аналогично вышеописанным фрагментам.

Блок 3 конструировали, используя полученные фрагменты К, L и М, для чего готовили следующую реакционную смесь:

Вода – 57 мкл; буфер – 10 мкл; dNTP – 16 мкл; фрагмент К – 5 мкл; фрагмент L – 5 мкл; фрагмент М – 5 мкл; полимеразы – 1 мкл.

Условия реакции:

92 °С – 1,2 мин; 45 °С - 1,5 мин; 50 °С – 1,5 мин; 70 °С - 1,2 мин - 2 цикла; затем в реакционную смесь добавляли праймер 1 и праймер 5 по 1 мкл и проводили ПЦР в следующих условиях:

92 °С – 0,8 мин; 50 °С - 0,8 мин; 70 °С - 0,6 мин - 19 циклов;

92 °С – 1,3 мин; 52 °С - 1,2 мин; 70 °С - 1,5 мин - 1 цикл.

Дальнейшую обработку ПЦР-фрагмента блока 3 проводили аналогично схеме, описанной для блока 2.

4.2.2.14 Конструирование рекомбинантной плазмиды рFH-TCI

На первом этапе получали три рекомбинантные плазмиды с клонированными фрагментами (блоками) гена TCI. Для этого 10 мкг плазмиды рFH123 гидролизовали рестриктазами *Bam*HI и *Sal*I в 100 мкл, затем векторную часть плазмиды выделяли, как описано выше. Концентрацию вектора доводили до 0,1 пмоль/мкл. Затем готовили три лигазные смеси с полученным вектором и каждым из трех фрагментов (блоков) гена TCI и проводили реакцию лигирования, как описано выше в главе 4.2.1.7. Для трансформации компетентных клеток *E. coli* XL1-blue брали 10 мкл лигазной смеси.

Из полученных бактериальных колоний выделяли плазмидную ДНК в аналитическом варианте (4.2.1.3) и подвергали действию рестриктаз *Bam*HI и *Pst*I, затем отбирали клоны с наличием встройки расчетной длины в выделенной плазмидной ДНК по результатам электрофореза в ПААГ.

Специфичность фрагмента подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих клонированные фрагменты. Затем структуру этих фрагментов устанавливали секвенированием, пользуясь одним из методов, изложенных выше в главе 4.2.1.12. Плазмиды, содержащие целевые последовательности гена TCI, соответствующие ожидаемым, были названы: pFHblock1, pFHblock2, pFHblock3.

Для получения плазмиды pFH-TCI, содержащей полный целевой ген TCI, использовали вектор, описанный выше, а также три фрагмента гена TCI, которые были выделены из плазмид pFHblock1, pFHblock2, pFHblock3. Для этого плазмиду pFHblock1 расщепляли рестриктазой *Bam*HI, а затем рестриктазой *Fok*I и выделяли фрагмент block1/*Bam*HI-*Fok*I аналогично описанному выше. Плазмиду pFHblock2 расщепляли рестриктазой *Fok*I и выделяли фрагмент block2/*Fok*I-*Fok*I. Плазмиду pFHblock3 расщепляли рестриктазой *Sal*I, а затем *Fok*I и выделяли фрагмент block3/*Sal*I-*Fok*I. Концентрацию выделенных блоков приводили к величине равной 1 пмоль/мкл.

Далее готовили лигазную смесь, содержащую указанный вектор и три полученных фрагмента, как описано выше. Трансформацию, отбор рекомбинантных клонов и подтверждение правильности структуры осуществляли аналогично вышеописанному для блоков гена TCI.

4.2.2.15 Получение плазмид pET-TCI и pGEX-TCI

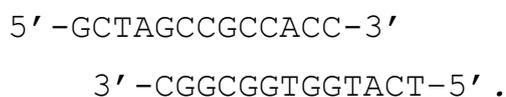
Для получения рекомбинантной плазмид pET-TCI и pGEX-TCI готовили векторы pET32a/*Bam*HI-*Sal*I и pGEX-4T-1/*Bam*HI-*Sal*I, как описано в предыдущей главе для вектора pFH123/*Bam*HI-*Sal*I. Аналогично получали и *Bam*HI-*Sal*I-фрагмент плазмиды pFH-TCI с геном TCI.

Готовили следующие лигазные смеси с каждым из векторов: вектор – 1 мкл (0,05 пмоль); фрагмент – 5 мкл (0,5 пмоль); лигазный буфер – 2 мкл; вода – 11 мкл; T4-ДНК-лигаза (20 е.а./мкл); общий объём – 20 мкл. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* JM109. Скрининг рекомбинантных клонов проводили аналогично описанному выше с использованием эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Sal*I.

4.2.2.16 Получение плазмид pBK-RSV-TCl и pcDNA-TCl

Для получения рекомбинантных плазмид pBK-RSV-TCl и pcDNA-TCl, обеспечивающих экспрессию гена TCl в эукариотических клетках, готовили векторы pBK-RSV/*NheI-SalI* и pcDNA3.1/*Myc-His(-)/lacZr/NheI-XhoI* и фрагмент с геном TCl в виде *FokI-SalI*-фрагмента плазмиды pFH-TCl аналогично описанному выше. Последний вектор получали предварительно, инвертировав в плазмиде pcDNA3.1/*Myc-His(-)/lacZ* *ApaI*-фрагмент, содержащий ген *lacZ* с прилегающими уникальными участками рестрикции. Для этого 5 мкг исходной плазмиды подвергали действию эндонуклеазы рестрикции *ApaI*, выделяли оба рестриктных фрагмента и реклонировали по стандартным методикам фрагмент с геном *lacZ* в составе полученного вектора, внося в лигазную смесь 5-кратный избыток фрагмента по отношению к вектору. Рестрикционным анализом отобрали целевую плазмиду с инверсией фрагмента с геном *lacZ*.

Для соединения выступающих концов молекул векторов (*NheI*) и гена TCl (*FokI*) использовали два олигонуклеотида, смешанных в концентрации по 5 пмоль/мкл каждого и образующих соответствующий коннектор:



Готовили следующие лигазные смеси аналогично с каждым из векторов:

Вода - 26 мкл; лигазный буфер (x10) – 5 мкл; вектор – 2 мкл; ген TCl - 5 мкл; коннектор – 2 мкл; T4-ДНК-лигаза (20 е.а./мкл) – 2 мкл.

Условия проведения реакций, трансформация бактериальных клеток и отбор рекомбинантных клонов совершенно аналогичны описанным выше, за исключением того, что для идентификации клонированного гена TCl использовали рестриктазы *NheI* и *PspEI*, которые выщепляют клонированный ген вместе с введенной последовательностью Kozak в каждой из рекомбинантных плазмид (1,2 т.п.н.).

Таким образом были получены целевые рекомбинантные плазмиды pBK-RSV-TCl и pcDNA-TCl.

4.2.2.17 Конструирование экспрессионных векторных плазмид pV1, pV2 и pV3

На первом этапе конструировали векторную плазмиду pV2. Для этого получали ПЦР-фрагмент ДНК методом поэтапной достройки пяти пар перекрывающихся праймеров в следующей последовательности: (рисунок 5.30 и таблица 5.3):

- (V2-5F)+(V2-6R) – центральная часть целевого фрагмента;
- (V2-4F)+(V2-7R) – удлинение центрального фрагмента с обоих концов;
- (V2-3F)+(V2-8R) – второй этап удлинения фрагмента;
- (V2-2F)+(V2-9R) – третий этап удлинения фрагмента;
- (V2-1F)+(V2-10R) – завершающий этап – получение целевого фрагмента ДНК.

Целевой ПЦР-фрагмент подвергали действию рестриктаз *HindIII* и *XhoI* и клонировали в составе плазмиды pсDNA3.1/*Myc-His(+)/lacZ* по участкам рестрикции *HindIII* и *XhoI*. Полученная векторная плазида pV2 далее служила матрицей в ПЦР для конструирования плазмид pV1 и pV3. Подробные схемы конструирования плазмид и полный список использованных для этого олигонуклеотидов приведены ниже в главе 5.8.3 – рисунки 5.30 – 5.32 и таблица 5.3).

Для получения плазмиды pV1 на матрице плазмиды pV2 методом ПЦР синтезировали целевой фрагмент ДНК с помощью праймеров (V1-1F)+(V2-10R), который затем гидролизовали и клонировали аналогично вышеописанному (рисунок 5.31).

Плазмиду pV3 конструировали следующим образом: на матрице pV2 с помощью праймеров (V3-2F)+(V3-3R) методом ПЦР получали фрагмент ДНК длиной 279 п.н., (рисунок 5.32); затем этот очищенный фрагмент служил матрицей для ПЦР с праймерами (V3-1F)+(V3-3R), вследствие чего он был удлинен с 5'-конца с получением конечного ПЦР-фрагмента, который гидролизовали рестриктазами *PspEI* и *XhoI* и клонировали в векторе pV1 по этим же участкам рестрикции.

Все условия проведения реакций, методики скрининга рекомбинантных клонов аналогичны описанным выше.

4.2.2.18 Сборка генетических конструкций C1, C2, C3 и их клонирование в векторах pV1, pV2 и pV3

Генетическую конструкцию C1 получали методом ПЦР в реакции безматричного синтеза с использованием 12-ти частично перекрывающихся олигонуклеотидных праймеров. Для синтеза гена C2 использовали 14 праймеров, а для получения генетической конструкции C3 - 17 праймеров.

В каждом случае в нуклеотидной последовательности концевых олигонуклеотидов были сформированы сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *PspEI* на 5'- и 3'-концах соответственно для клонирования в любой векторной плазмиде (pV1 – pV3).

Подробные схемы поэтапного получения целевых генетических конструкций и полный список использованных для этого олигонуклеотидов приведены в следующем разделе в главе 5.8.4 (рисунок 5.34 и таблица 5.4).

Условия проведения ПЦР аналогичны подробно описанным для блоков гена TCI с учетом возможной корректировки температуры отжига в каждом конкретном случае в соответствии с рекомендациями компьютерной программы OLIGO.

Для обеспечения надежности получения набора из 9-ти целевых рекомбинантных плазмид генные конструкции C1, C2 и C3 были клонированы в составе одного из векторов, а именно в векторе экспрессии pV2. Для этого полученные ПЦР-фрагменты и плазмидный вектор подвергали действию рестриктаз *KpnI* и *PspEI*, целевые фрагменты выделяли из агарозного геля и совместно лигировали. Каждой из трех полученных лигазных смесей трансформировали клетки *E. coli* XL1-blue, отбор рекомбинантных клонов осуществляли по стандартной схеме: рестрикционный анализ плазмидной ДНК и ПЦР с использованием концевых праймеров.

Правильность структуры встроенных генов подтверждали секвенированием на автоматическом анализаторе, как описано выше, после чего целевые гены были реклонированы в составе двух других экспрессионных векторов (pV1 и pV3)

абсолютно идентично клонированию в векторной плазмиде pV2. Отбор рекомбинантов тоже проводили по аналогичной схеме.

В результате были получены целевые рекомбинантные плазмиды в полном наборе: pV1C1, pV1C2, pV1C3 pV2C1, pV2C2, pV2C3 и pV3C1, pV3C2, pV3C3.

4.2.2.19 Получение рекомбинантных плазмид, направляющих синтез белков вируса ККГЛ

Плазмиды, направляющие синтез белков вируса ККГЛ в клетках *E. coli*, описанные в главе 5.9.3, конструировали по изложенным выше стандартным методикам. Все целевые фрагменты ДНК для клонирования получали с помощью ПЦР, используя в качестве матриц рекомбинантные плазмиды, содержащие ранее клонированные фрагменты (сегменты) кДНК вируса ККГЛ различных штаммов. Все они охарактеризованы в вышеназванной главе.

Рекомбинантные плазмиды pV3N, pV3Gc и pV3Gn, направляющие в эукариотических клетках синтез нуклеокапсидного белка N и поверхностных зрелых гликопротеинов Gc и Gn получали аналогично описанному в предыдущей главе, за исключением того, что целевые гены методом ПЦР синтезировали на плазмидных матрицах, содержащих клонированные фрагменты генома вируса ККГЛ. Список использованных с этой целью праймеров и характеристики клонированных фрагментов генома вируса ККГЛ, как и самих рекомбинантных плазмид, их содержащих, приведен ниже в главе 5.9.6 (рисунки 5.40 – 5.42, таблица 5.6). Для получения трех целевых генов использовали три пары олигонуклеотидных праймеров (таблица 5.6).

4.2.2.20 Методика индикации генетического материала вируса ККГЛ в образцах методом ОТ-ПЦР

Выделение РНК вируса ККГЛ из клинических и полевых образцов (сыворотки крови, суспензии клещей):

- 1) 0,15 мл пробы смешивают со 0,15 мл раствора Д+ и выдерживают 5 мин во льду.
- 2) Добавляют 0,3 мл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (24:24:1) и встряхивают вручную 1 мин.

- 3) Центрифугируют при +4 °С 30 мин при 15000 g.
- 4) Отбирают водную (верхнюю) фазу и помещают в новую пробирку, содержащую 0,3 мл охлажденного во льду изопропанола.
- 5) Образец замораживают при -70 °С (не менее 15 мин) или выдерживают не менее 12 ч в морозильной камере при -20 °С.
- 6) Центрифугируют 10 мин при комнатной температуре при 15000 g, супернатант сливают. При выделении РНК из цельной крови осадок ресуспендируют в 0,1 мл раствора Д и повторяют пункты 2-5.
- 7) Дважды обмывают осадок 75 % этанолом (по 0,5 мл) и 1 раз 96 % этанолом с центрифугированием 1 мин при 12000 g при комнатной температуре.
- 8) Этанол сливают, пробирку вверх дном помещают на фильтровальную бумагу на 2 мин и высушивают осадок при комнатной температуре в течение минимум 20 мин.
- 9) Растворяют осадок РНК в 40 мкл воды при энергичном всраживании.

Примечание: состав растворов: Д – 4 М гуанидинизоцианат; 25 мМ цитрат натрия pH 7,0; 0,5 % саркозил; 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Хранится при комнатной температуре или при +4 °С до 1 года. Д+ -это раствор Д, содержащий 0,2 М натрий ацетат pH 4,0.

Получение кДНК методом обратной транскрипции:

Состав реакционной смеси: вода – 9,2 мкл; праймер SP1 (10 пкм/мкл) – 2 мкл; раствор суммарный dNTP (25 мМ) – 0,8 мкл; буфер 10x – 2 мкл; РНК – 5 мкл; обратная транскриптаза – 1 мкл (25 е.а.).

Условия проведения реакции: 37 °С – 1 ч; 99 °С – 10 мин; 37 °С – 7 мин.

Первый раунд ПЦР:

Состав реакционной смеси: вода – 36,4 мкл; буфер 10x – 5 мкл; раствор суммарный dNTP (25 мМ) – 0,6 мкл; праймер SP2 (10 пкм/мкл) – 1 мкл; праймер SP1 (10 пкм/мкл) – 1 мкл; кДНК – 5 мкл; Taq-ДНК-полимераза – 1 мкл (5 е.а.).

Условия проведения реакции:

94 °С – 0,5 мин; 50 °С - 1,0 мин; 72 °С - 1,5 мин - 3 цикла.

94 °С – 0,4 мин; 55 °С - 0,7 мин; 72 °С – 0,5 мин - 32 цикла.

72 °С – 3 мин.

Второй раунд ОТ-ПЦР:

Состав реакционной смеси: вода – 39,4 мкл; буфер 10x – 5 мкл; раствор суммарный dNTP (0,25 мМ) – 0,6 мкл; праймер SP3 (10 пкм/мкл) – 1 мкл; праймер SP4 (10 пкм/мкл) – 1 мкл; ДНК 1раунда – 2 мкл; *Taq*-ДНК-полимераза – 1 мкл (5 е.а.).

Условия проведения реакции те же, что и в первом раунде ПЦР (см. выше).

Данные анализа продуктов амплификации:

Анализ продуктов амплификации проводится в 1,5 % агарозном геле. В положительных на ККГЛ образцах длина полученного после двух раундов ПЦР фрагмента соответствует расчетной (350 п.н.), а в отрицательном контроле продукты амплификации отсутствуют.

5 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

5.1 Конструирование рекомбинантных плазмид, обеспечивающих экспрессию гена интерлейкина-2 (IL-2) человека и его мутантных аналогов в клетках *Escherichia coli*

5.1.1 Краткая характеристика IL-2 человека

IL-2 является одним из ключевых полифункциональных медиаторов иммунной системы (Smith *et al.*, 1988). Известный как фактор роста Т-лимфоцитов, он играет важную роль в развитии Т-клеточного иммунного ответа организма, в том числе в развитии реакции отторжения аллотрансплантата (Jourdan *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1988). Некоторые аутоиммунные заболевания, СПИД, многие виды злокачественных новообразований зачастую связаны с нарушениями в экспрессии гена IL-2 либо его рецепторов, а также с нарушениями в их взаимодействии (Braakman *et al.*, 1986; Volk and Diamantstein, 1986; Kohtz *et al.*, 1988).

Таким образом, IL-2 представляется перспективным иммунотерапевтическим агентом. И, несмотря на то что несколько штаммов-продуцентов этого лимфокина к моменту начала настоящей работы уже были получены (Sato *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1988), работы в этом направлении по-прежнему не утратили своей актуальности.

Структурно-функциональная организация IL-2 активно изучалась с середины 80-х годов прошлого века (Altman *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1984; Kuo *et al.*, 1986a,b; Brandhuber *et al.*, 1987; Neepfer *et al.*, 1987; Weigel *et al.*, 1989). Это обусловлено не только несомненным теоретическим научным интересом, но и практическим поиском более устойчивых к окислению и изомеризации аналогов, а также возможных его антагонистов (Liang *et al.*, 1986).

Начало настоящей работе было положено в 1987 году. К тому времени объем литературных данных относительно структурно-функциональной организации молекулы IL-2 был невелик (Wang *et al.*, 1984; Kuo L.-M. *et al.*, 1986a,b), работы по установлению точной структуры высокоаффинного рецептора к IL-2 только начались, однако четко было показано, что одним из важных районов, отвечающих за проявление биологической активности человеческого IL-2, является С-концевой участок молекулы, содержащий 120-133 а/к. Делеция как всего этого участка, так и

отдельных а/к, входящих в его состав, приводила к появлению биологически неактивных белков-аналогов IL-2 (Cohen *et al.*, 1986; Kuo L.-M. *et al.*, 1986a; Liang *et al.*, 1986), лигандные свойства которых еще не были в достаточной мере исследованы. В случае сохранения способности связываться с рецептором к IL-2 у какого-либо из подобных аналогов он мог бы служить антагонистом IL-2 и найти применение в иммуносупрессивной терапии, в частности, для лечения ряда аутоиммунных заболеваний и для предотвращения реакции отторжения аллотрансплантата. Учитывая большую потребность медицины в надежных и строго селективных иммунодепрессантах, мы приняли решение приступить к поисковой работе в этом направлении.

5.1.2 Получение мутантных генов IL-2 человека

Поставленная задача явилась логическим продолжением работы по синтезу гена IL-2 человека, в результате которой были получены гибридные плазмиды, содержащие 4 фрагмента гена IL-2, на которые он был разбит для удобства сборки, а также плазмиды, содержащие 3 первых фрагмента (без С-концевого) и полный ген IL-2 (плазмиды pIL123 и pIL2 соответственно). Нуклеотидная и соответствующая ей аминокислотная последовательности гена IL-2 человека в плазмиде pIL2 приведены на рисунке 5.1. На рисунке 5.2 представлено два способа сборки целевого гена IL-2 человека. В последовательности искусственного гена были произведены нуклеотидные замены, не нарушающие а/к последовательность кодируемого белка (так называемые «молчащие» замены). Это было осуществлено для введения кодонов, наиболее предпочтительных для экспрессии в прокариотической системе, или для введения либо разрушения сайтов узнавания некоторых эндонуклеаз рестрикции (Синяков и др., 1988а,б; 1989; Данилюк и др., 1990; 1991а).

Сборку гена IL-2 с делецией 120-133 а/к-сегмента (IL-2m) проводили первым способом, представленным на рисунке 5.2 для гена IL-2, для чего использовали ранее полученный *PstI-FokI*-фрагмент плазмиды pIL123 и субфрагмент D'' из плазмиды pIL4m (*FokI-BamHI*-фрагмент) вместо субфрагмента D. Собственно плазида pIL4m была получена клонированием достроенного и гидролизованного *Sau3A*-дуплекса из олигонуклеотидов (XIII) и (XIV) в векторе pFH125/*BamHI*

совместно с олигонуклеотидным дуплексом (XVII), как схематично изображено на рисунке 5.3 (Серегин и др., 1990; Данилюк и др., 1991а,б). Вместе с тем в литературе появились противоречивые данные о способности мутантного IL-2 с заменой Trp в положении 121 на Phe блокировать трансмембранный сигнал этого лимфокина, а также отмечалась важная роль и других а/к С-концевого сегмента белка (Ju *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1988), что, на наш взгляд, заслуживало экспериментальной проверки. С этой целью мы осуществили синтез гена-аналога IL-2, кодирующего такой мутантный белок.

Для этого использовали рекомбинантную плазмиду pFL137, содержащую 3'-концевой фрагмент гена IL-2 человека, кодирующий 98-133 а/к фрагмент белка, и методом ПЦР амплифицировали участок, содержащий фрагмент гена IL-2 и прилегающие к нему участки рестрикции *Sau3A* и *SalI* с одновременным введением необходимой мутации, как показано на рисунке 5.4. Полученные ПЦР-фрагменты длиной 55 и 80 п.н. расщепляли вышеназванными рестриктазами и совместно клонировали в составе вектора pFH123/*BamHI-SalI* с получением целевой плазмиды pIL4s.

Следует отметить тот факт, что, несмотря на наличие теоретической возможности проводить отбор клонов по Lac-фенотипу, мы предпочли анализировать весь пул клонов методом молекулярной гибридизации, поскольку в области тандема терминирующих кодонов гена IL-2 и его аналогов образуется кодон ATG в рамке считывания гена *lacZ*, с которого возможна реинициация трансляции α -пептида β -галактозидазы. Действительно, все гибридные плазмиды с подобной структурой указанного района, описанные здесь и далее, сообщают клеткам *E. coli* JM103 на индикаторной среде Lac⁺-фенотип (бледно-голубой). Все клонированные фрагменты ДНК были подвергнуты секвенированию химическим методом, предложенным Максамом и Гилбертом (Maxam and Gilbert, 1980).

```

                                14
PstI  A  P  T  S  S  S  T  K  K  T  Q  L  Q  L
CTGCA GCG CCT ACT TCA AGC TCT ACA AAG AAA ACA CAG CTG CAA CTG
                                28
      E  H  L  L  L  D  L  Q  M  I  L  N  G  I
      GAG CAT TTA CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT
                                42
      N  N  Y  K  N  P  A  L  T  R  M  L  T  F
      AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC ACC AGA ATG CTC ACA TTT
                                56
      K  F  Y  M  P  K  K  A  T  E  L  K  H  L
      AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA GAA CTG AAA CAT CTT
                                70
      Q  C  L  E  E  E  L  K  P  L  E  E  V  L
      CAG TGT TTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG GAA GAA GTG CTG
                                84
      N  L  A  Q  S  K  N  F  H  L  R  P  R  D
      AAT TTA GCA CAA AGC AAA AAT TTT CAC TTA CGT CCC CGT GAC
                                98
      L  I  S  N  I  N  V  I  V  L  E  L  K  G
      TTA ATC TCC AAT ATC AAC GTA ATT GTA CTG GAA CTG AAG GGT
                                112
      S  E  T  T  F  M  C  E  Y  A  D  E  T  A
      TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA GCA
                                126
      T  I  V  E  E  I  N  R  W  I  T  F  C  Q
      ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC CGT TGG ATT ACC TTT TGT CAA

      S  I  I  S  T  L  T stop stop SatSI
      AGC ATT ATT TCA ACA CTG ACT TAA TGA GTCGAC

```

Отмечены участки клонирования, стоп-кодоны трансляции. Вертикальными пунктирными линиями показано разбиение на 4 субфрагмента (A – D), из которых был собран ген.

Рисунок 5.1 – Нуклеотидная (нижняя строка) и а/к последовательности искусственного гена IL-2 человека (Данилюк и др., 1991а)

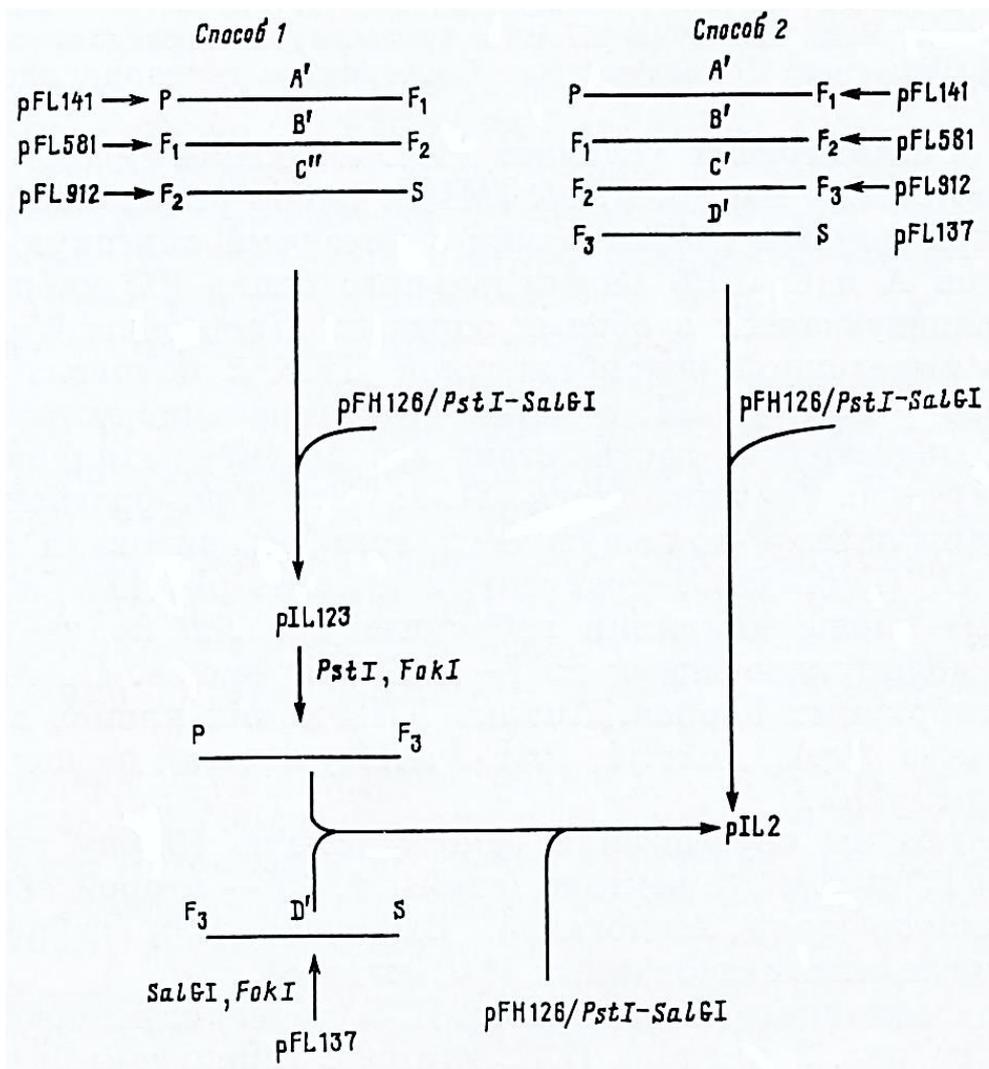


Рисунок 5.2 – Два способа сборки полной последовательности гена IL-2 человека из 4-х субфрагментов, отмеченных на рисунке 1. Ген IL-2m получали способом 1 (Данилюк и др., 1991а)

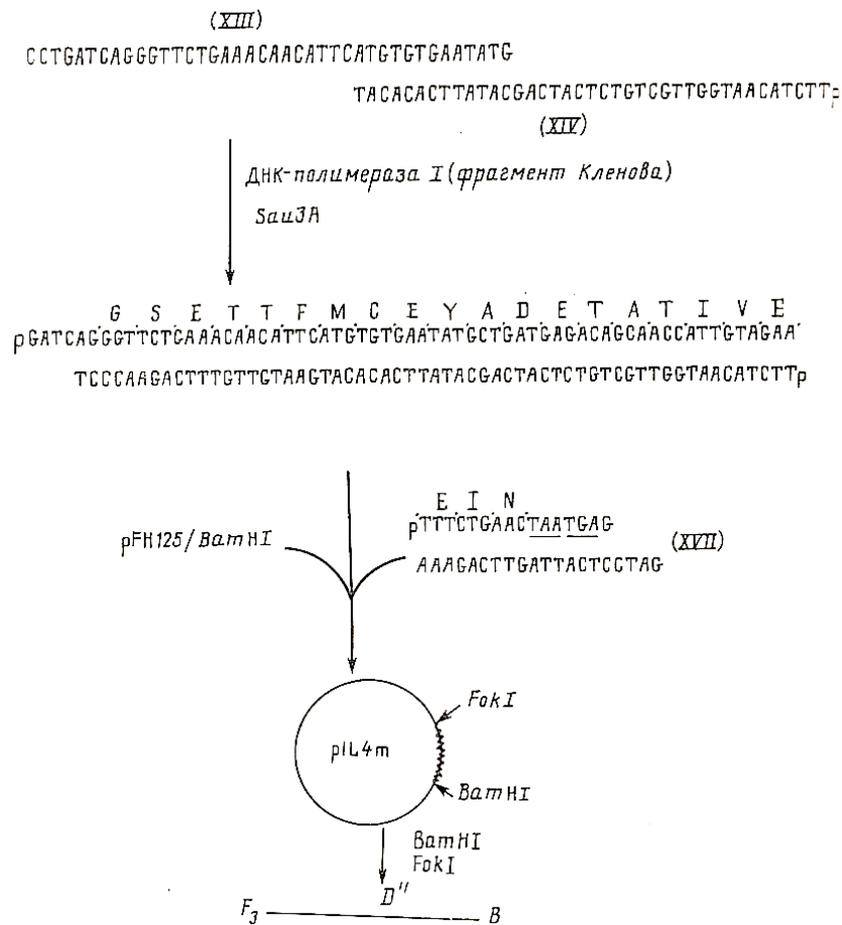


Рисунок 5.3 – Схема получения плазмиды pIL4m и нуклеотидные (соответствующие им а/к) последовательности олигомеров, составляющих целевой мутантный субфрагмент D'' гена IL-2m (Данилюк и др., 1991a)

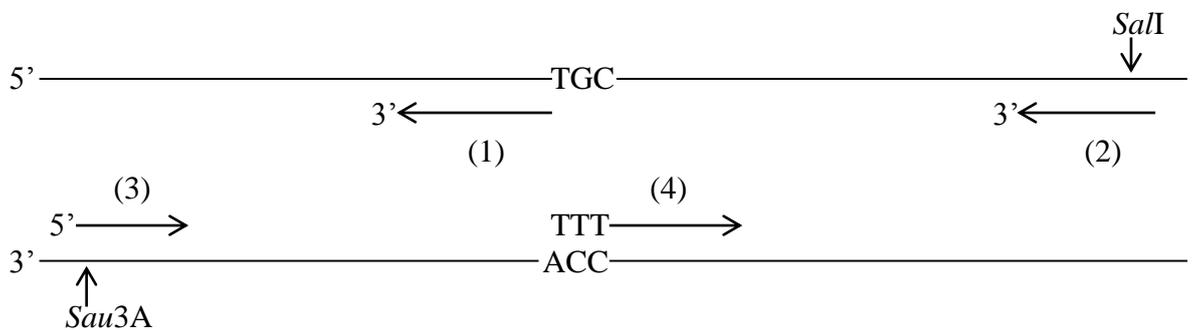


Рисунок 5.4 – Расположение праймеров (1-4), обеспечивающих замену кодона TGC (Trp) на TTT (Phe) в 121 положении IL-2 человека методом ПЦР (начало первого цикла)

5.1.3 Экспрессия гена IL-2 человека и его мутантных аналогов в клетках *E. coli*

Строение рекомбинантной плазмиды pIL2 позволило нам реконструировать ее для совмещения рамок трансляции α -пептида β -галактозидазы и гена IL-2. Для этого линейаризованную рестриктазой *PstI* плазмиду последовательно обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и ДНК-лигазой фага T4. Отобранная в результате трансформации клеток *E. coli* плазида pEXIL2 обеспечивала синтез IL-2 человека с 6 дополнительными а/к на N-конце, от α -пептида β -галактозидазы, под контролем индуцибельного *lac*-промотора *E. coli*. Несмотря на то что уровень синтеза целевого белка был очень низким, специфическая биологическая активность IL-2 в лизатах индуцированных клеток была достоверно подтверждена (Данилюк и др., 1991а).

Таким образом, следующим этапом нашей работы стало создание надежных и эффективных экспрессионных векторных систем для получения целевых белков – IL-2 и его мутантных аналогов – в рекомбинантном виде.

Ряд традиционных подходов к решению этой задачи, предпринятых нами и нашими коллегами из других лабораторий, не увенчался успехом. Наиболее перспективной оказалась новая плазмидная конструкция pRIL18, полученная нашим соавтором Камыниной Т.П., которая содержит синтетический ген IL-2 человека под контролем регуляторной промоторно-операторной области гена *recA* *Proteus mirabilis* (в дальнейшем сокращенно – *recA*-промотор). Эта плазида была получена путем интеграции по участкам рестрикции *EcoRI* и *SalI* векторной плазмиды pBR322 *EcoRI*-фрагмента (198 п.н.) репликативной формы ДНК фага M13grm, содержащей фрагмент ДНК *P. mirabilis* с *recA*-промотором, и *HaeII-SalI*-фрагмента плазмиды pIL2 с геном IL-2 (Данилюк и др., 1991а).

Данная плазида обеспечивала достаточно хороший уровень синтеза целевого рекомбинантного белка, в нашем случае IL-2, однако были все основания полагать, что, проведя определенную реконструкцию, можно добиться существенного повышения уровня экспрессии целевого гена, а также создать более удобную генетическую конструкцию, обладающую всеми необходимыми свойствами для клонирования и экспрессии других генов. Такая задача и была нами поставлена на следующем этапе работы.

Во-первых, было принято решение о необходимости и целесообразности замены векторной части экспрессирующей ген IL-2 плазмиды с pBR322 на pBR327. Тем самым мы, с одной стороны, достигали удаления нежелательного участка рестрикции *PvuII* в векторной части плазмиды, поскольку таковой присутствовал в гене IL-2 человека и был нам полезен для последующих генно-инженерных реконструкций в области самого гена. С другой стороны, на тот момент уже было установлено, что копияность плазмиды pBR327 существенно выше, чем pBR322 (Valbás *et al.*, 1986), и, следовательно, можно было ожидать проявления эффекта дозы гена, то есть повышения уровня синтеза IL-2 по сравнению с прототипом. И, наконец, третий момент, на который мы обратили внимание – это терминация транскрипции целевого гена, находящегося под контролем *recA*-промотора. Дело в том, что после подобной реконструкции ближайший к 3'-концу гена IL-2 человека терминатор транскрипции t_s , расположенный на расстоянии 2035 п.н. в плазмиде pRIL18, оказывается существенно ближе к кодомам терминации трансляции этого гена (975 п.н.). Как было показано в работе Сато с соавт., подобная реконструкция может обеспечить более эффективную экспрессию гена IL-2 (Sato *et al.*, 1987).

Схема описанной выше реконструкции была разработана таким образом, что одновременно был нарушен один из двух участков узнавания для рестриктазы *EcoRI*, чтобы на основе целевой плазмиды обеспечить надежное получение рекомбинантных плазмид, экспрессирующих другие гены в первую очередь мутантные аналоги гена IL-2 человека, полученные нами. Для этого плазмиду pBR327 последовательно обрабатывали рестриктазой *EcoRI*, ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова), рестриктазой *SalI* и выделяли векторную часть плазмиды. В полученном векторе клонировали *SmaI-SalI*-фрагмент плазмиды pRIL18 (630 п.н.), содержащий конструкцию *recA*-промотор-ген IL-2. Так была получена целевая плазида pRIL3 (рисунок 5.5).

В результате уровень экспрессии гена IL-2 действительно возрос (рисунок 5.6а), однако сохранилась существенная зависимость уровня синтеза целевого белка от условий культивирования и индукции. Максимальный уровень синтеза IL-2 наблюдался при использовании минимальной среды M9, дополненной казаминовыми кислотами (M9CA): около 30 мкг/мл бактериальной культуры для плазмиды pRIL3 и 15-20 мкг/мл для pRIL18.

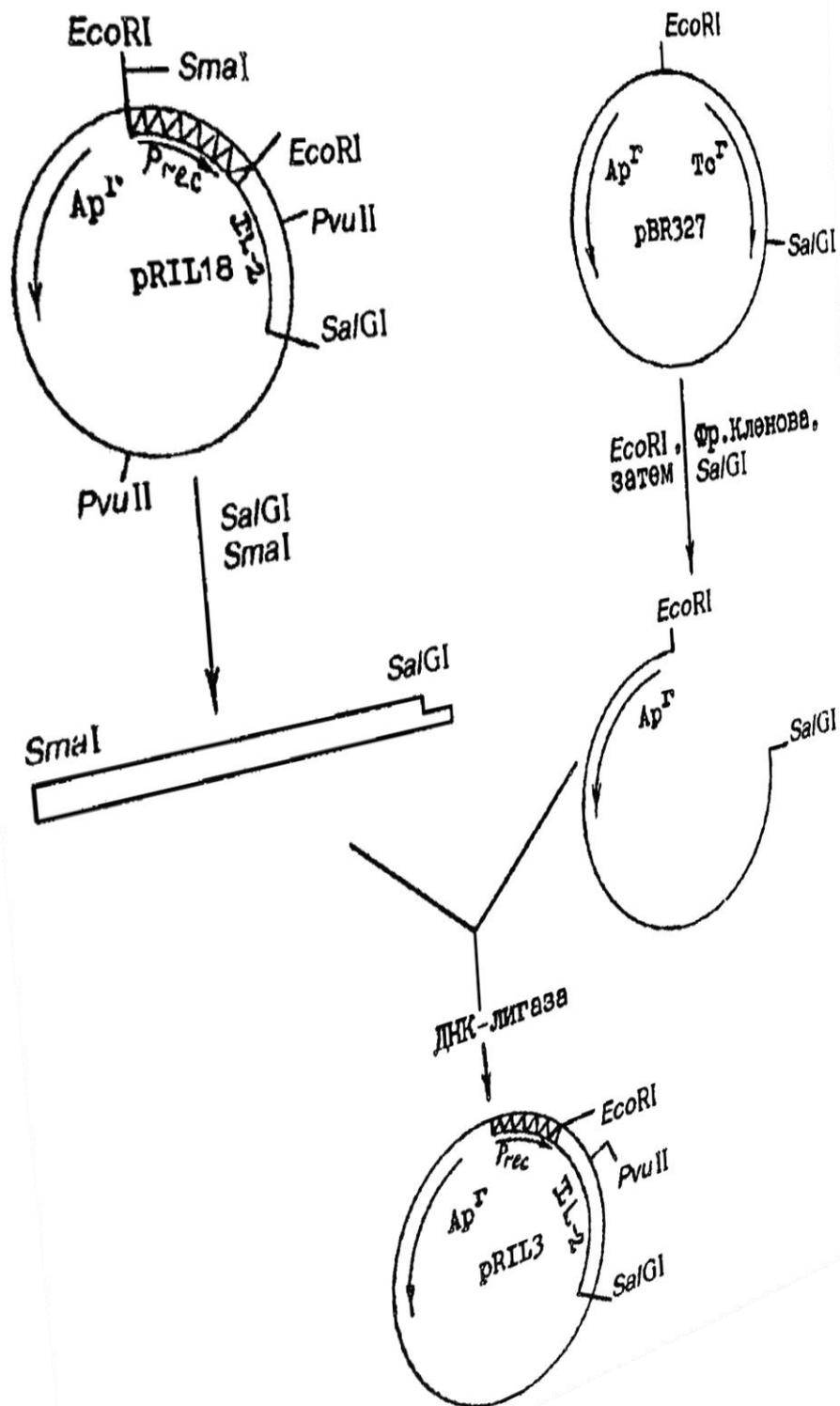
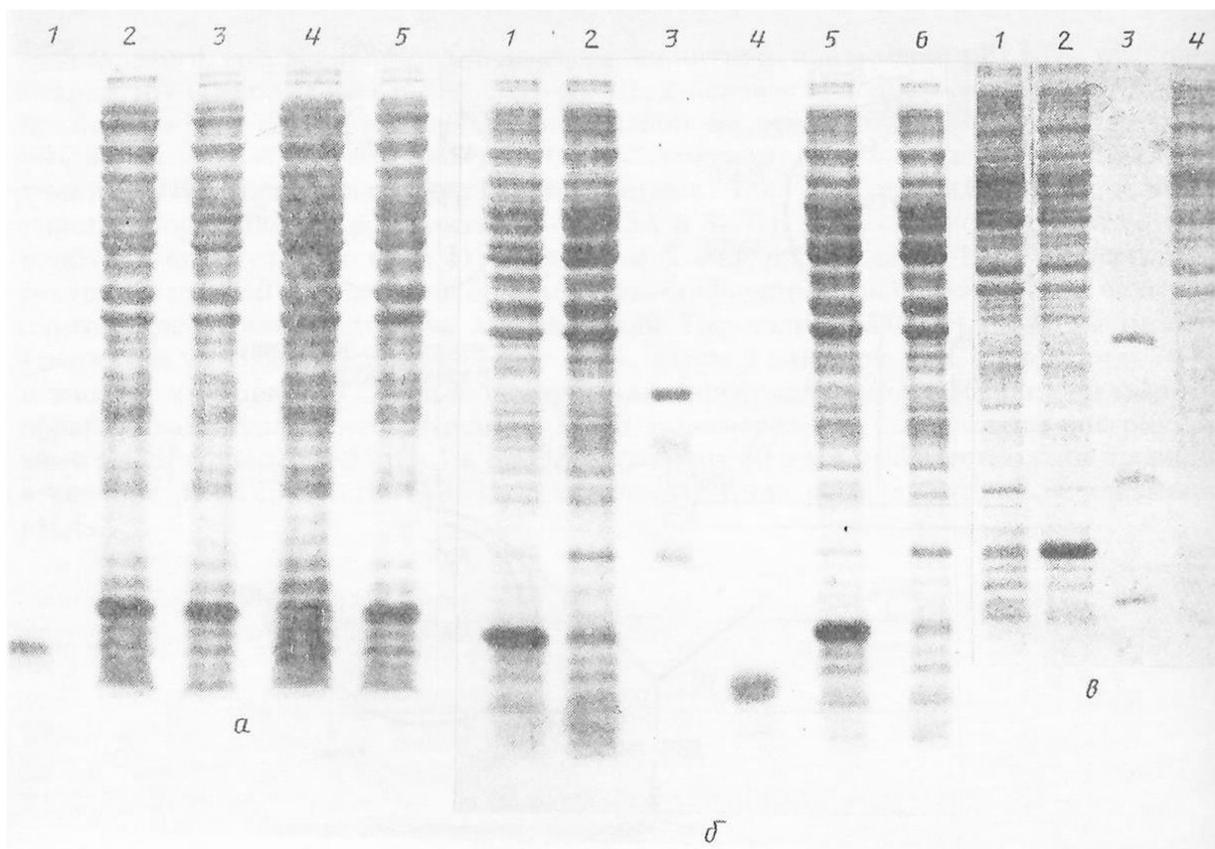


Рисунок 5.5 – Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pRIL3
(Серегин и др., 1993а)



а: 1 – 14 кДа (маркер); 2 и 3 – pRIL2s (+); 4 – pRIL18 (+); 5 – pRIL3 (+);
 б: 1 и 5 – pRIL2m (+); 2 и 6 – pRIL2m (-); 3 – 20, 24, 26 кДа; 4 – 14 кДа (маркеры);
 в: 1 – pRIL18 (+); 2 – pRIL7t (+); 3 – 12, 20, 26 кДа; 4 – клетки без плазмиды;
 (+) – 3 ч индукция митомицином С; (-) – без индукции.

Рисунок 5.6 – Экспрессия гена IL-2 и его аналогов в клетках *E. coli* JM103, направляемая различными плазмидами. Электрофореграммы. 15 % ПААГ (Серегин и др., 1993а)

В то же время отмечалось как минимум двукратное снижение уровня синтеза при использовании богатой питательной среды LB.

Для получения экспрессирующей ген (Phe¹²¹)-IL-2 плазмиды – pRIL2s – мы клонировали *PvuII-FokI*-фрагмент плазмиды pIL123, составляющий основную часть гена IL-2 (Данилюк и др., 1991а), совместно с *FokI-SalI*-фрагментом плазмиды pIL4s, представляющим мутантную 3'-концевую часть гена, в векторе pRIL3/*PvuII-SalI*, содержащем 5'-концевую часть гена IL-2.

На рисунке 5.6а видно, что уровень синтеза мутантного (Phe¹²¹)-IL-2 в клетках *E. coli* JM103(pRIL2s), как и следовало ожидать, был сравним с уровнем синтеза IL-2, обеспечиваемым плазмидой pRIL3.

Экспрессия другого мутантного гена IL-2m была достигнута аналогичным образом (рисунок 5.6б). Однако следует отметить, что 3'-конец этого гена фланкирован участком расщепления рестриктазой *Bam*HI, а не *Sal*I, как ген IL-2, поэтому при клонировании требовался коннектор для стыковки некомплементарных друг другу выступающих 5'-концов молекул ДНК. В качестве такового нами был выбран участок полилинкерной области векторной плазмиды pFH123 (Данилюк и др., 1991б), который способен образовать в целевой плазмиде протяженную шпилечную структуру вслед за геном IL-2m. Эта плазида подробно описана выше в разделе 3 «Обзор литературы» и соответствующая полилинкерная область показана на рисунке 3.4.

Такая реконструкция привела к образованию шпилечной структуры вслед за геном IL-2m, напоминающей некоторые последовательности терминаторов транскрипции генов, что, на наш взгляд, могло привести к увеличению уровня его экспрессии (рисунок 5.7).

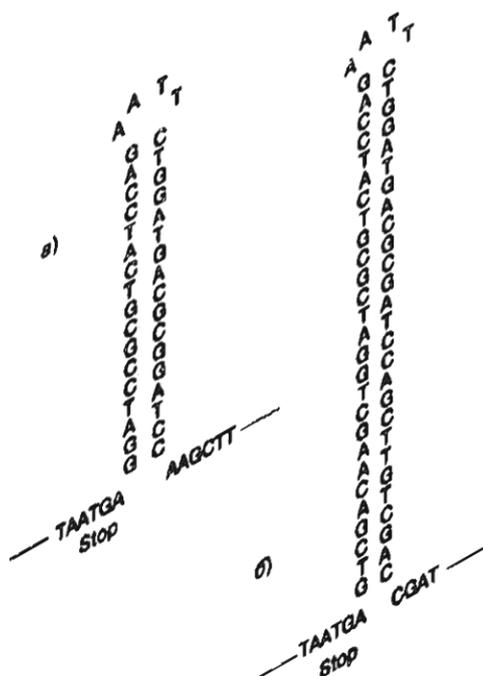


Рисунок 5.7 – Шпилечные структуры, сформированные вслед за стоп-кодонами генов IL-2m в плазмиде pRIL2m (а) и IL-2 в плазмиде pRIL7t (б). Показана только одна цепь ДНК (Серегин и др., 1993а)

Для получения целевой плазмиды pRIL2m в векторе pRIL3/*PvuII-SalI* клонировали *PvuII-EcoRI*-фрагмент плазмиды pIL2m, содержащий ген IL-2m без первых 11 кодонов и участок полилинкера векторной плазмиды, совместно с полилинкерным *EcoRI-SalI*-фрагментом плазмиды pFH123.

Тот факт, что наши ожидания оправдались – плазида pRIL2m обеспечивала в клетках *E. coli* очень высокий уровень синтеза (около 55 мкг/мл бактериальной культуры) целевого белка, причем, как в минимальных, так и в богатых средах, – укрепил нас в мысли, что именно протяженный инвертированный повтор, следующий непосредственно за геном IL2m, образованный засчет использования вышеназванной полилинкерной области в качестве коннектора при конструировании плазмиды, определяет повышение уровня синтеза целевого белка.

В самом деле, выполняет ли этот палиндром функцию терминатора транскрипции или, в противном случае, увеличивает стабильность образующейся информационной РНК, мы не беремся утверждать. Хотя, учитывая тот факт, что за геном IL-2 в плазидах pRIL18 и pRIL3 нет надежного терминатора транскрипции, о чем мы упоминали выше, а образованная структура по своему строению очень напоминает терминатор, зависимый от ρ -фактора (Льюин, 1987), можно предположить, что именно эта функция в данном случае наиболее реальна.

Все вышеизложенное побудило нас проверить влияние 3'-фланкирующего района, состоящего из протяженных инвертированных повторов, на уровень экспрессии других генов и в первую очередь гена IL-2. Для этого вышеуказанный фрагмент полилинкерной области плазмиды pFH123 был клонирован по *SalI*-участку в плазидах pRIL18 и pRIL3. При встройке двух таких фрагментов, сшитых по своим выступающим *EcoRI*-концам, образуется шпилечный участок близкий по структуре полученному ранее (рисунок 5.7). Вполне вероятно и встройка четырех фрагментов с образованием тандема подобных шпилечных структур, что могло бы усилить эффект повышения уровня синтеза целевых рекомбинантных белков.

В итоге были получены и те, и другие варианты для обеих плазмид. Уровень синтеза существенно возрос в случае производных плазмиды pRIL3. Полученные целевые плазмиды pRIL7t и pRIL4t (с одним и двумя шпилечными участками

соответственно) обеспечивали сопоставимый стабильно высокий уровень синтеза IL-2, близкий к уровню синтеза аналога IL2m. Причем зависимость от среды культивирования оказалась не так велика, как в случае исходной плазмиды pRIL3, хотя минимальные среды были предпочтительнее (рисунок 5.6в).

Подобная реконструкция плазмиды pRIL18 привела к тому же, хотя и менее выраженному, эффекту.

Уровни синтеза всех рекомбинантных белков, обеспечиваемые полученными плазмидами, были сопоставлены в одних и тех же условиях: 10 мл среды M9CA, индуктор – митомицин С (конечная концентрация – 2 мкг/мл), время индукции – 3 ч (внесение индуктора – при оптической плотности суспензии $D_{600}=1,00$). Результаты такого эксперимента суммированы ниже в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Уровень синтеза рекомбинантных аналогов IL-2 человека, обеспечиваемый различными плазмидами в клетках *E. coli* JM103

Плазида	Рекомбинантный белок	Выход рекомбинантного белка (мкг/мл культуры)	Количество шпилечных участков (шт)
pRIL18	IL-2	15	0
pRIL18t	IL-2	20	1
pRIL3	IL-2	30	0
pRIL7t	IL-2	45	1
pRIL4t	IL-2	45	2
pRIL2s	(Phe ¹²¹)-IL-2	30	0
pRIL2m	IL2m (укороченный)	55	1*

Примечание: * - данный шпилечный участок образован менее протяженным палиндромом, чем в остальных плазмидах (рисунок 5.7).

Таким образом, мы доказали, что создание протяженных палиндромных структур непосредственно за стоп-кодонами трансляции генов IL-2 и IL-2m приводит к повышению уровня синтеза соответствующих белков. Мы полагаем, что это происходит благодаря тому, что образующиеся шпилечные структуры выполняют функцию терминации транскрипции информационной РНК, что способствует увеличению скорости накопления целевых транскриптов. В

противном случае подобные структуры могут обеспечивать повышенную стабильность информационных РНК, обуславливая тот же конечный эффект.

Нами были разработаны лабораторные методики очистки рекомбинантных аналогов ИЛ-2 человека из биомассы бактериальных клеток штаммов-продуцентов, что позволило провести изучение их биологической активности.

Результаты проведенных экспериментов показали, что ИЛ-2 человека, лишенный 14 С-концевых а/к, и (Phe¹²¹)-ИЛ-2 не обладают биологической активностью ИЛ-2, тогда как контрольные препараты ИЛ-2 (клетки *E. coli* JM103(pRIL7t либо pRIL3)) демонстрировали удельную активность не менее 10⁶ МЕ/мг. Эти результаты полностью согласуются с данными литературы (Cohen *et al.*, 1986; Куо L.-М. *et al.*, 1986а; Liang *et al.*, 1986). Нами также было установлено, что оба мутантных белка обладают приблизительно одинаковой небольшой способностью снижать Т-клеточный пролиферативный ответ на ИЛ-2. Однако существенной блокады не происходит даже в случае 10-кратного превышения по концентрации любого из них над ИЛ-2, а в сравнимых концентрациях они не оказывают практически никакого влияния на действие ИЛ-2. Таким образом, полученные нами результаты биологического тестирования мутантных аналогов ИЛ-2 человека свидетельствуют о том, что последние не являются достаточно сильными антагонистами ИЛ-2 для того, чтобы быть перспективными для иммуносупрессивной терапии, в то время как рекомбинантный ИЛ-2 в полной мере обладает активностью природного лимфокина.

На основе полученных генетических конструкций нами созданы бактериальные штаммы-продуценты человеческого ИЛ-2, разработаны условия их культивирования, методы выделения целевого рекомбинантного белка из биомассы клеток продуцентов, написан и утвержден проект Инструкции по изготовлению и контролю «Интерлейкин-2 рекомбинантный человеческий (субстанция)» (ИК 103.ВК-1892.35-93 от 21.12.1993 г.).

Вместе с тем необходимо отметить, что наши коллеги также провели работу по конструированию рекомбинантной плазмиды, направляющей эффективную экспрессию этого же синтетического гена ИЛ-2 человека под контролем регуляторной (промоторной) области гена *recA P. mirabilis*. Целевая плазида pИЛ-2/21 (Данилюк и др., 1987) содержит ген под контролем вышеназванного

промотора и фрагмент генома фага λ с ρ -независимым терминатором транскрипции t_0 и обеспечивает в бактериальных клетках очень высокий уровень синтеза рекомбинантного человеческого IL-2. Авторы определили уровень синтеза как 45-50 мг/л бактериальной культуры. Эта цифра практически совпадает с представленными выше для плазмид, полученных нами (см. таблицу 5.1).

Важно отметить, что в цитируемой работе авторы указывают на максимальное содержание целевого белка в клеточной биомассе, в то время как мы приводим цифры уже для выделенного, частично очищенного, рекомбинантного IL-2, которые заведомо ниже исходного содержания целевого белка в клетках штамма-продуцента. Поэтому можно утверждать, что рекомбинантные плазмиды pRIL7t и pRIL4t, полученные в настоящей работе, не менее эффективно направляют синтез рекомбинантного IL-2 в клетках *E. coli*, чем плазида pIL-2/21, описанная выше.

Основным преимуществом рекомбинантных плазмид, полученных нами, является тот факт, что они обеспечивают высокий уровень синтеза рекомбинантного IL-2 в обычных лабораторных штаммах, таких как *E. coli* JM103, которые обладают отличными ростовыми характеристиками и высокой генетической стабильностью, в то время как плазида pIL-2/21 обеспечивает подобные показатели лишь при использовании специального лабораторного штамма *E. coli* SG20050, значительно уступающего другим по указанным показателям. Следовательно, по технологичности данный штамм-продуцент IL-2 уступает штамму-продуценту, описанному в настоящей работе.

Таким образом, предлагаемый нами способ получения рекомбинантного IL-2 человека лишен указанных выше недостатков, следовательно, проведенную оптимизацию структуры рекомбинантной плазмидной ДНК можно считать вполне успешной.

5.2 Конструирование рекомбинантных плазмид, обеспечивающих синтез в клетках *Escherichia coli* химерных белков, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы

5.2.1 Краткая характеристика химеротоксинов, содержащих IL-2

Как было отмечено выше, наряду с получением бактериальных штаммов-продуцентов IL-2 человека мы поставили задачу поиска эффективных препаратов

для иммуносупрессивной терапии на основе этого лимфокина. Полученные мутантные аналоги IL-2, к сожалению, не оправдали наших ожиданий в этом контексте, поэтому на следующем этапе было вполне логично поставить задачу поиска подобных белков, используя иные методические и функциональные подходы для ее решения. С другой стороны, мы намеревались получить целевые рекомбинантные плазмиды на основе экспрессионных плазмид, описанных в предыдущем разделе, что позволило бы более полно оценить потенциал данных конструкций в плане их надежности и пригодности для экспрессии различных генов в будущем.

Как отмечалось выше, именно IL-2 играет ключевую роль в развитии реакции отторжения аллотрансплантата, и суперэкспрессия рецепторов к нему является основной причиной развития многих патологических изменений в клетках иммунной системы, в том числе при некоторых аутоиммунных заболеваниях (Braakman *et al.*, 1986; Volk and Diamantstein, 1986; Kohtz *et al.*, 1988, Kupiec-Weglinski *et al.*, 1988). Одним из перспективных путей преодоления подобных проблем может являться применение селективных химеротоксинов, представляющих собой химерные белки, состоящие из IL-2 человека и цитотоксического компонента. При этом очень важно, чтобы используемый токсин был лишен своей природной рецепторной части, функцию которой призвана выполнять интерлейкиновая часть химерной молекулы. Такие химеротоксины потенциально способны обеспечить селективную элиминацию клеток иммунной системы, в первую очередь Т-лимфоцитов, несущих рецепторы к IL-2.

На момент выполнения настоящей работы в литературе было описано два химерных IL-2-содержащих белка с цитотоксическими свойствами (Williams *et al.*, 1987; Lorberboum-Galski *et al.*, 1988). Структура данных белков такова, что функцию домена, распознающего рецепторы, выполняет интерлейкиновая часть химерной молекулы, и это приводит к селективному поражению клеток, имеющих на своей поверхности рецепторы к IL-2. Описаны также и подобные химеротоксины, содержащие другие лимфокины, например, IL-6 (Siegall *et al.*, 1988), обладающие аналогичным механизмом действия. В упомянутых работах авторы использовали дифтерийный токсин (Williams *et al.*, 1987) и псевдомонадный экзотоксин (Lorberboum-Galski *et al.*, 1988; Siegall *et al.*, 1988),

обладающие сходной структурно-функциональной организацией и механизмом действия. Мы приняли решение использовать принципиально иной бактериальный токсин – токсин *Shigella dysenteriae* (шига-токсин), молекула которого состоит из одной цитотоксической А-субъединицы и пяти В-субъединиц, ответственных за связывание с рецептором (Kozlov *et al.*, 1988). Механизм действия этого токсина заключается в ингибировании связывания аминоацил-тРНК с рибосомой, которое зависит от фактора элонгации трансляции EF1. Это обусловлено расщеплением N-гликозидной связи аденинового основания в положении 4324 в 28S рибосомной РНК, входящей в состав большой субъединицы рибосомы (Endo *et al.*, 1988).

Таким образом, следующим этапом работы являлось получение генов IIA и AII, кодирующих химеротоксины, состоящие из IИ-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы в различной последовательности, и получение целевых продуктов их экспрессии в клетках *E. coli* с использованием экспрессионных плазмид, несущих индуцибельный *recA*-промотор *P. mirabilis*.

5.2.2 Реконструкция генов IИ-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы с целью получения генов химеротоксинов IIA и AII

Для получения фрагмента ДНК, кодирующего цитотоксическую А-субъединицу шига-токсина (А-гена) использовали плазмиду pSHT23, несущую фрагмент генома *Sh. Dysenteriae* с опероном этого токсина, полученную ранее и любезно предоставленную Козловым Ю.В. с соавторами (Козлов и др., 1987; Kozlov *et al.*, 1988). Стратегия получения А-гена была разработана таким образом, чтобы обеспечить возможность точной и удобной стыковки этого гена с любым фрагментом ДНК с одновременным удалением участка, кодирующего сигнальную последовательность, при этом сведя к минимуму изменения в а/к последовательности А-субъединицы (Серегин и др., 1992, Серегин и др., 1993б).

Общая схема получения приведена ниже на рисунке 5.8. Как видно из рисунка, сначала выделяли *BglII*-*BspRI*-фрагмент (1,6 т.п.н.) плазмиды pSHT23, содержащий полную последовательность А-гена. Затем этот фрагмент расщепляли рестриктазой *BglII* и выделяли оба фрагмента, полученные в результате гидролиза. *BglII*-*BspRI*-фрагмент подвергали действию рестриктазы *FokI* и получали *BglII*-*FokI*-фрагмент. Недостающий 3'-концевой участок гена получали химико-

ферментативным синтезом из 4-х олигонуклеотидов, при этом перед стоп-кодоном трансляции формировался *HaeII*-участок рестрикции, призванный обеспечить точную стыковку с геном IL-2 без использования коннектора, а непосредственно за стоп-кодоном – *SalI* и *PstI*-участки рестрикции для обеспечения удобства проведения последующих генно-инженерных манипуляций. В результате описанных реконструкций образовалось два дополнительных кодона (GCG – Ala и СТА – Leu), которые, однако, при стыковке по *HaeII*-участку с любым геном элиминируются и сохраняются только в случае конструирования химерных генов, содержащих А-ген на 3'-конце.

На следующей стадии получения А-гена вышеназванные три фрагмента совместно лигировали с вектором pFH125/*PstI*-*BamHI* (рисунок 5.8а) и клонировали в клетках *E. coli* с получением целевой рекомбинантной плазмиды pFHA10.

Таким образом, 3'-концевая область А-гена была успешно подготовлена для дальнейших генно-инженерных манипуляций в плане получения химерных генов. Вместе с тем, 5'-концевая область не содержала удобных участков гидролиза, что не позволяло провести однозначную стыковку с каким-либо генетическим материалом и провести при этом удаление части гена, кодирующего сигнальную последовательность А-субъединицы токсина. Для решения этой задачи мы реклонировали *EcoRI*-*HindIII*-фрагмент плазмиды pFHA10 в ДНК бактериофага M13mp9 и провели олигонуклеотиднаправленный мутагенез с целью образования участка узнавания для рестриктазы *Eco31.I* (рисунок 5.8б), причем никаких изменений кодирующая зрелый белок часть целевого гена не претерпела. Как видно из рисунка 5.8в, вышеназванный участок узнавания сформирован в районе последних кодонов сигнального пептида, который мы и намеревались удалить. Особо следует отметить тот факт, что использование рестриктазы *Eco31.I* значительно повышает надежность правильной сборки фрагментов при различных генно-инженерных манипуляциях за счет несимметричности образующихся при ее действии 5'-выступающих концов молекул ДНК.

Модифицированный фрагмент А-гена был возвращен в исходную плазмиду после проверки точности заданной последовательности нуклеотидов.

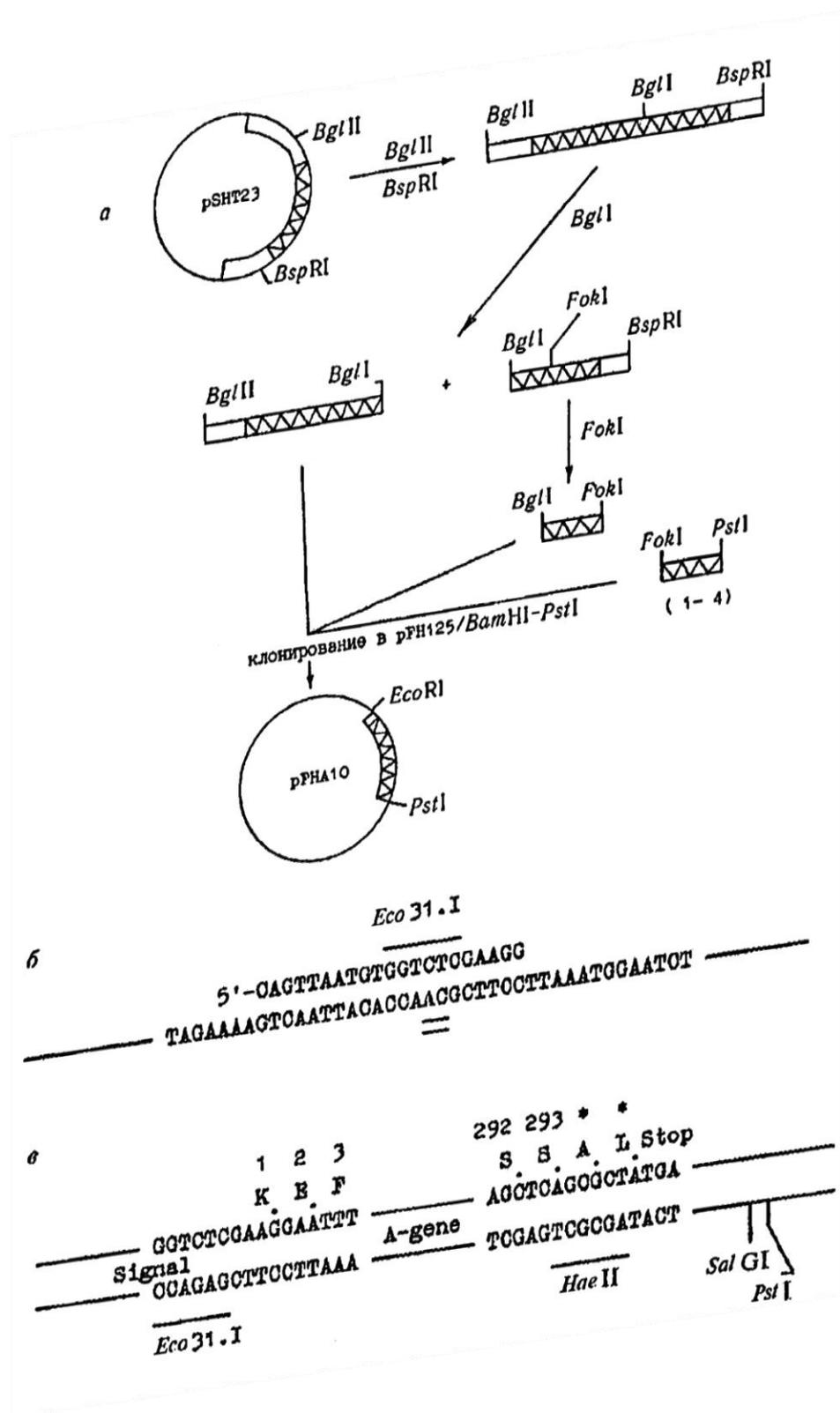


Рисунок 5.8 – Конструирование рекомбинантной плазмиды pFNA10: а – схема получения промежуточной плазмиды pFNA10; б – положение мутационного праймера на ДНК фага M13mp9A; в – строение фланкирующих А-ген районов в плазмиде pFNA10 (Серегин и др., 1993б)

Таким образом была получена целевая рекомбинантная плазида рFNAs10, несущая А-ген, полностью подготовленный для создания любых генетических конструкций, в том числе химерных генов. Тот факт, что при действии рестриктазы *Eco31.I* образуется несимметричный 5'-выступающий конец в районе первых двух кодонов А-гена, позволяет в дальнейшем обойтись очень коротким синтетическим коннектором для стыковки с различными генетическими элементами, легко при этом согласовывая рамки считывания. На рисунке 5.8в приведены концевые области А-гена с фланкирующими их последовательностями в целевой плазмиде рFNAs10.

Реконструкции подверглась и описанная в предыдущем разделе плазида рIL2, поскольку структура созданных нами ранее плазмид не позволяла удобно выделить ген IL-2 без стоп-кодонов трансляции, что было необходимо при получении химерных генов с кодирующей последовательностью IL-2 на 5'-конце.

Наиболее простым способом решения такой задачи нам представлялся сдвиг *FokI*-участка рестрикции относительно гена IL-2 в плазмиде рIL2 таким образом, чтобы при расщеплении плазмидной ДНК фрагмент с целевым геном был лишен терминирующих кодонов и 2-х нуклеотидов последнего кодона гена IL-2. В таком случае конструкция позволяет состыковать ген IL-2 с любым фрагментом ДНК, имеющим 3'-выступающий конец, путем использования коннектора и застройки бреши в нижней цепи. При слиянии с фрагментом, имеющим 5'-выступающий конец, могут быть использованы короткие адаптеры. В любом случае, варьированием длины коннектора или адаптеров можно легко согласовать рамки считывания составных частей химерного гена.

Для получения целевой плазмиды рIL2d мы заменили короткий фланкирующий ген IL-2 участок в плазмиде рIL2 синтетическим дуплексом, который и придал плазмиде вышеописанные свойства (Серегин и др., 1990).

5.2.3 Конструирование и экспрессия генов ILA и AIL, кодирующих химерные белки, состоящие из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы

Экспрессия химерных генов была достигнута под контролем *recA*-промотора *P. mirabilis* в клетках *E. coli*, для чего использовались ранее полученные и

описанные выше рекомбинантные плазмиды: pRIL3, экспрессирующая ген IL-2 (Серегин и др., 1993а), pIL2 и pIL2d, содержащие этот искусственный ген IL-2 (Серегин и др., 1990; Данилюк и др., 1991а).

Общие схемы конструирования представлены на рисунке 5.9. Для создания плазмиды pRILA4, содержащей под контролем *recA*-промотора ген химерного белка ILA (на N-конце химерного белка расположена а/к последовательность IL-2 человека, на С-конце – последовательность цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы), лигировали *PvuII-FokI*-фрагмент гена IL-2 из плазмиды pIL2d и *Eco31.I-SalI*-фрагмент А-гена из плазмиды pFHAs10 в векторе pRIL3/*PvuII-SalI* с коннектором для стыковки 5'-выступающих *FokI*- и *Eco31.I*-концов двух фрагментов и трансформировали клетки *E. coli* JM103.

В случае плазмиды pRAIL, содержащей ген химеротоксина AIL (А-субъединица на N-конце, IL-2 – на С-конце химерной белковой молекулы), мы испытали существенные сложности при реализации подобной схемы клонирования. Уровень трансформации клеток *E. coli* лигазной смесью, составленной из 0,5 пмоль вектора pRIL3/*EcoRI-SalI*, *Eco31.I-HaeII*-фрагмента А-гена плазмиды pFHAs10 и *HaeII-SalI*-фрагмента гена IL-2 из плазмиды pIL2 (по 5 пмоль) с коннектором для стыковки *EcoRI*- и *Eco31.I*-концов вектора и А-гена, оказался практически нулевым в большой серии экспериментов.

Вышеописанные результаты привели нас к мысли, что продукт экспрессии этого химерного гена токсичен для клеток *E. coli*, поскольку базальный уровень синтеза такого полипептида может иметь место вследствие «подтекания» индуцибельного *recA*-промотора, то есть из-за неполной его репрессии даже в отсутствие индуктора в ростовой питательной среде. И небольшое накопление токсичного чужеродного белка, происходящее сразу после проникновения рекомбинантной плазмиды в клетку, может быть губительным для ослабленных компетентных бактериальных клеток.

Чтобы проверить наше предположение, мы заменили вектор на неэкспрессирующий (pFH126/*EcoRI-SalI*) и в первом же эксперименте без проблем получили целевую плазмиду pAIL1 (рисунок 5.9б).

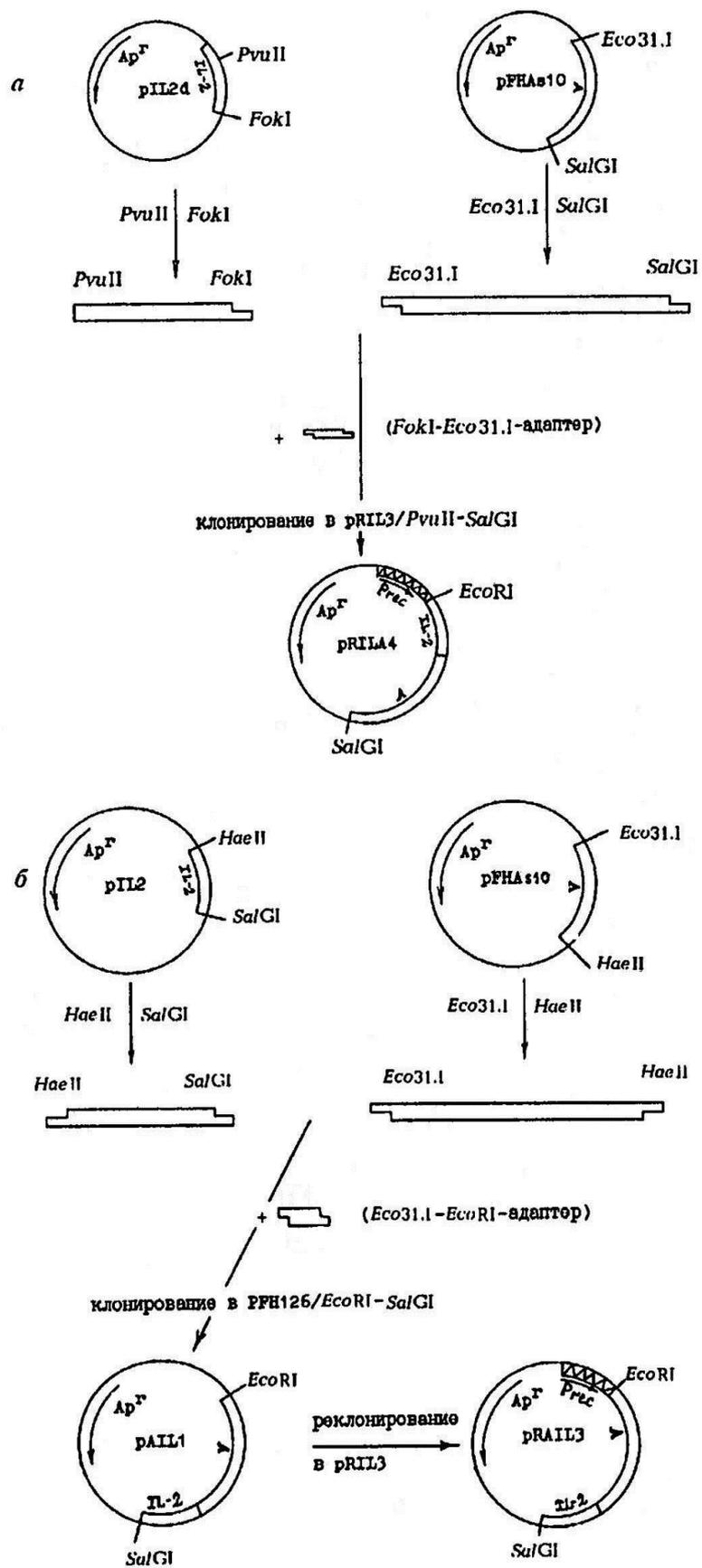


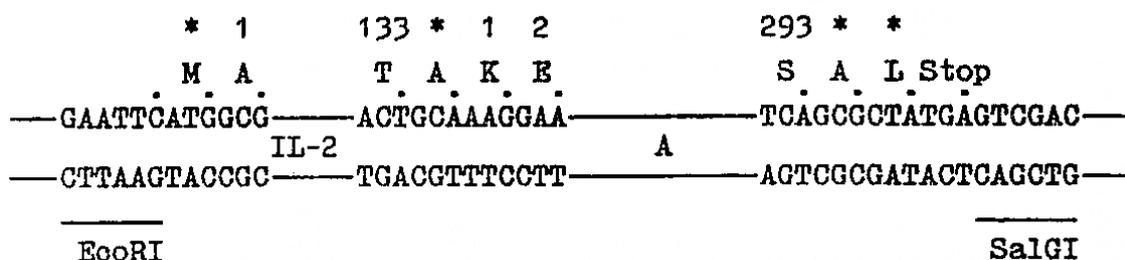
Рисунок 5.9 – Схемы конструирования рекомбинантных плазмид pRILA4 (а) и pRAIL3 (б)

Однако, реклонировав целевой фрагмент в экспрессионный вектор и получив целевую рекомбинантную плазмиду pRAIL3, мы не обнаружили в лизатах индуцированных клеток, содержащих эту плазмиду, продукта экспрессии химерного гена, в то время как нуклеотидная последовательность целевого химерного гена была подтверждена секвенированием. Клетки *E. coli* JM103(pRAIL3) в состоянии индукции резко снижали скорость роста по сравнению с контрольными клетками штаммов-продуцентов IL-2 – *E. coli* JM103(pRIL3) и химеротоксина ILA – *E. coli* JM103(pRILA4), и заметного накопления целевого рекомбинантного белка в процессе культивирования не происходило.

Таким образом, наше предположение о токсичности рекомбинантного химеротоксина AIL для клеток *E. coli* JM103, по-видимому, оказалось верным.

Строение химерных генов ILA и AIL приведено на рисунке 5.10. Цифрами на этом рисунке обозначены порядковые номера а/к для каждого природного белка, знаком (*) отмечены не принадлежащие природным белкам IL-2 человека и A-субъединицы токсина шигеллы а/к.

а)



б)

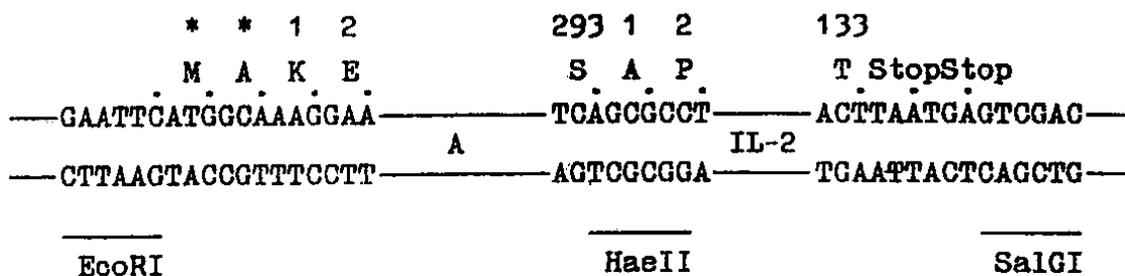


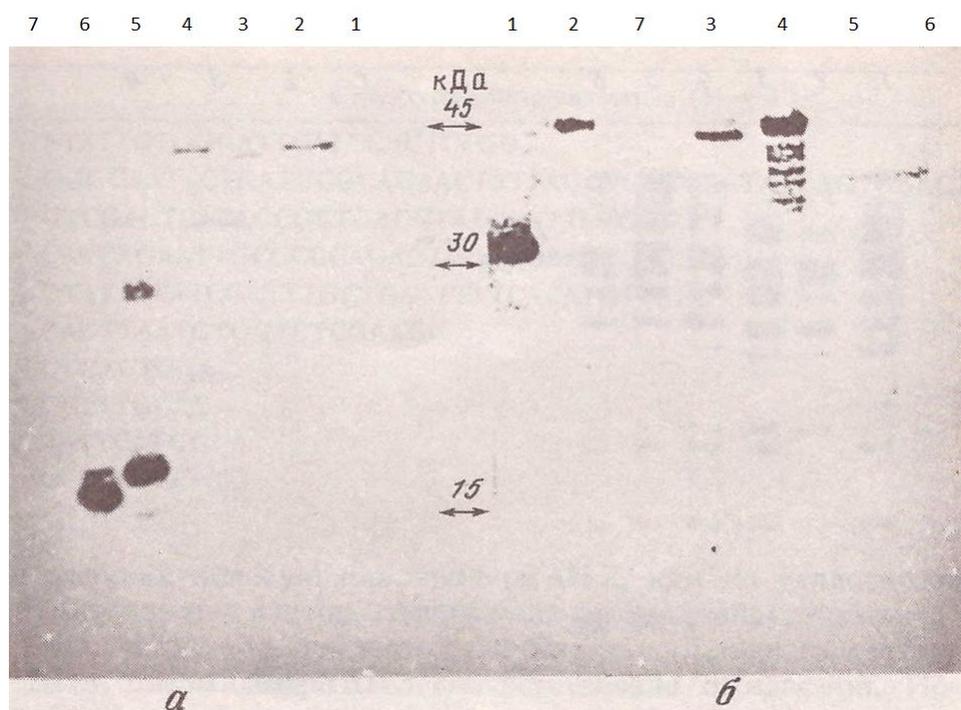
Рисунок 5.10 – Строение химерных генов ILA (а) и AIL (б)

(Серегин и др., 1993б)

Обнаружение продуктов экспрессии химерных генов в клетках *E. coli* JM103 оказалось несколько затруднено низким уровнем синтеза целевых химеротоксинов и наличием в лизатах клеточного белка аналогичной электрофоретической подвижности (около 47 кДа), о чем свидетельствовали результаты электрофореза лизатов как индуцированных, так и неиндуцированных клеток-продуцентов. Однако результаты иммуноблоттинга как с моноклональными антителами к IL-2 человека, так и с сывороткой против шига-токсина, убедительно доказали наличие целевых продуктов экспрессии в лизатах бактериальных клеток (рисунок 5.11).

С целью повышения уровня синтеза химеротоксинов были организованы шпилечные участки за генами ILA и AIL в полученных рекомбинантных плаزمидях так, как это описано выше для гена IL-2 и его мутантных аналогов. В результате были получены плазмиды pRILA4t и pRAIL3t, однако они не обеспечили существенного повышения уровня синтеза целевых химеротоксинов в отличие от IL-2 и его мутантных аналогов (Серегин и др., 1993а,б). По-видимому, существуют более критические факторы, влияющие на содержание целевых химерных белков в бактериальных клетках. Таким фактором может являться скорость протеолитической деградации полипептидных цепей, определяемая активностью внутриклеточных протеаз.

Это привело нас к мысли заменить клетки используемого бактериального штамма на другие, обладающие пониженной способностью к внутриклеточному протеолизу и имеющие другой белковый электрофореграммный спектр, возможно, более благоприятный для четкой визуализации целевых рекомбинантных химеротоксинов в лизатах индуцированных клеток. Мы использовали два таких штамма: *E. coli* VL1201 и VL1222. Для трансформации клеток этих штаммов бактерий мы использовали все экспрессирующие химерные гены плазмиды и установили, что уровень синтеза химеротоксина ILA существенно возрос по сравнению со штаммом *E. coli* JM103, тогда как в случае белка AIL он повысился незначительно (5-6 мкг/мл для AIL и 30-40 мкг/мл для ILA). Тем не менее оба целевых рекомбинантных белка были обнаружены в составе нерастворимых телец включений в лизатах клеток-продуцентов (рисунок 5.12), что позволило нам выделить их из клеточной биомассы аналогично IL-2 (Серегин и др., 1993а,б).



а: связывание с моноклональными антителами к IL-2 человека;

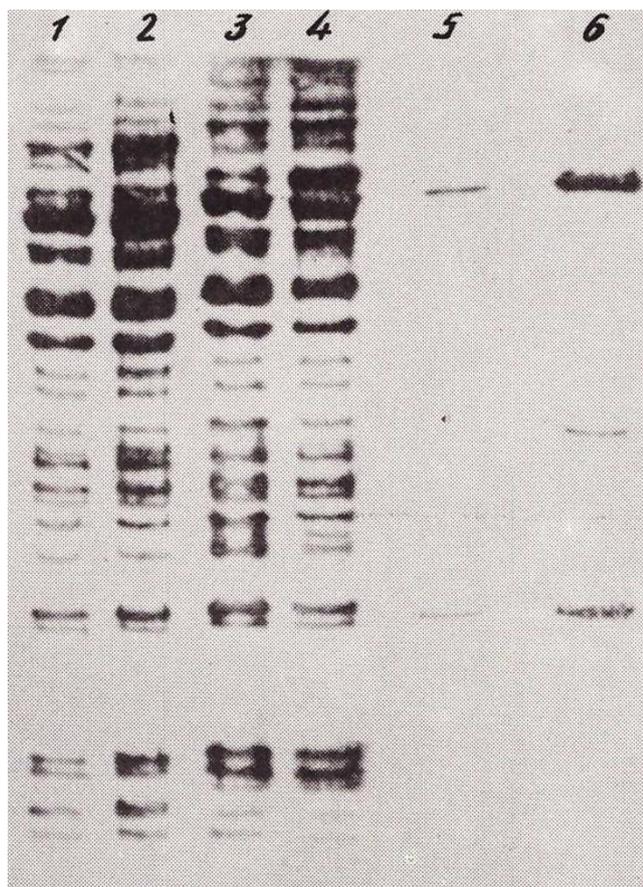
б: связывание с сывороткой против токсина шигеллы.

1 – шига-токсин (очищенный, гомогенный); 2 – ILA (частично очищенный); 3 – AIL (лизат); 4 – ILA (лизат); 5 – IL-2m (лизат); 6 – IL-2 (лизат); 7 – отрицательный контроль (лизат клеток с плазмидой pBR327).

Рисунок 5.11 – Результаты иммуноблоттинга бактериальных клеточных лизатов, содержащих рекомбинантные белки IL-2, IL-2m, ILA и AIL (Серегин и др., 1993б)

В результате серии экспериментов по изучению биологической активности полученных нами химеротоксинов было установлено, что они способны ингибировать синтез белка в бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика *in vitro*, что свидетельствует о сохранении активности А-субъединицы шига-токсина в составе обеих химерных молекул (рисунок 5.13).

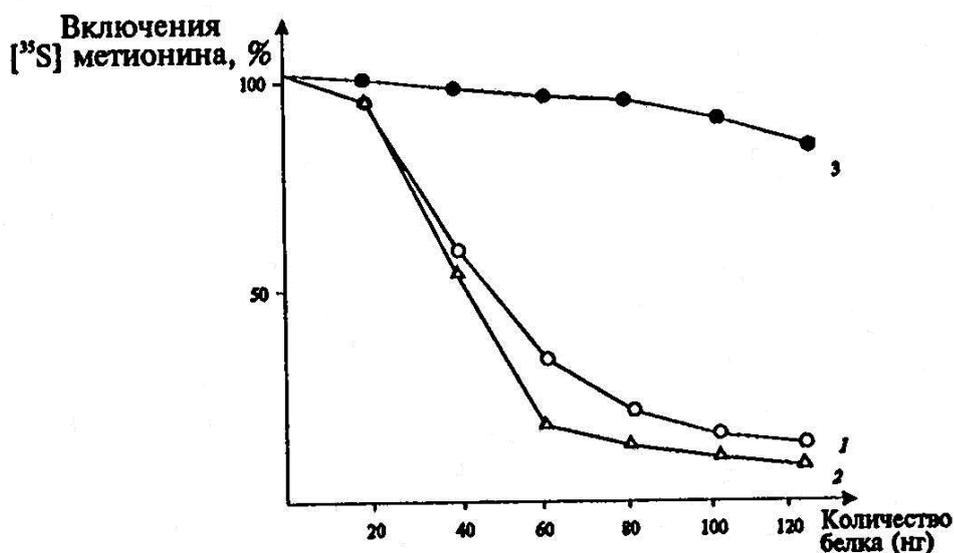
Также было показано, что при действии на Т-лимфоциты человека, выделенные из периферической крови здоровых доноров, полученные химеротоксины проявляют в зависимости от концентрации две противоположно направленные активности, присущие составным частям химерных молекул. Наиболее выраженное угнетение пролиферации бласт-трансформированных Т-лимфоцитов наблюдалось при действии белка AIL в концентрации 10 мкг/мл.



1-4 – лизаты клеток *E. coli* VL1201, содержащих плазмиды: 1 – pRAIL3 (-), 2 – pRAIL3 (+), 3 – pRILA4 (-), 4 – pRILA4 (+); где (+) – 1 ч индукция митомицином С, (-) – без индукции;
5 и 6 – выделенные белки AIL и ILA соответственно.

Рисунок 5.12 – Получение гибридных белков ILA и AIL. Электрофореграмма.
15 % ПААГ (Серегин и др., 1992)

Важно отметить, что другие подобные химеротоксины, о которых мы упоминали выше, проявляют аналогичные свойства (Kiyokawa *et al.*, 1989; Walz *et al.*, 1990). Обнадеживающие результаты были описаны и в ряде других работ (Kelley *et al.*, 1988; Kirkman *et al.*, 1989; Pankewycz *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1990). Следовательно, можно полагать, что химеротоксины могут быть использованы в качестве иммуносупрессивного препарата, для чего потребуются углубленное изучение их биологических свойств.



1 – ILA;

2 – AIL;

3 – контрольный препарат *E. coli* VL1201(pRAIL3) без индукции.

Рисунок 5.13 – Ингибирование синтеза белка химеротоксинами ILA и AIL *in vitro* в бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика (Серегин и др., 1993б)

Таким образом, нами была продемонстрирована возможность успешной экспрессии гена IL-2 человека, а также ряда его мутантных и химерных аналогов, в составе рекомбинантных плазмид под контролем индуцибельного *recA*-промотора *P. mirabilis*. Полученные обнадеживающие результаты привели нас к мысли продолжить серию экспериментов по совершенствованию этой системы экспрессии и в первую очередь проверить возможность достижения высоких уровней экспрессии других генов, кодирующих важные белки, в плане перспективности получения на их основе новых иммунобиологических препаратов. Поскольку на момент проведения этой работы никакие другие гены, удовлетворяющие вышеозначенным условиям, нам не были доступны, мы приступили к химико-ферментативному синтезу гена аналога человеческого анафилатоксина C5a с целью получения продукта его экспрессии в бактериальных клетках с использованием разрабатываемой нами системы.

5.3 Синтез, клонирование и экспрессия в клетках *Escherichia coli* гена аналога анафилатоксина C5a человека

5.3.1 Краткая характеристика человеческого анафилатоксина C5a

Одним из ключевых белков системы комплемента, играющих важную роль в развитии воспалительного процесса и в регуляции иммунного ответа, является анафилатоксин C5a. В отличие от другого ключевого анафилатоксина C3a, обладающего иммуносупрессорными свойствами, C5a, напротив, способен усиливать иммунный ответ организма. Активация системы комплемента классическим либо альтернативным путем приводит к различному соотношению между этими белками, что и влияет на развитие иммунологической реакции при аутоиммунных заболеваниях или при защите от бактериальных инфекций (Morgan *et al.*, 1982).

Участие C5a в воспалительном процессе опосредовано секретлируемыми клетками крови медиаторами, например, такими как гистамин (выделяются тучными клетками), серотонин, лизосомальные ферменты (миелопироксидазы), простагландины, лейкотриены, секретлируемые моноцитами и полиморфноядерными лейкоцитами. Анафилатоксин C5a вызывает направленную миграцию этих клеток (хемотаксис), которые обладают предпочтительной адгезией к эндотелию сосудистой стенки (Bult and Herman, 1983). Таким образом происходит локальное повышение проницаемости сосудистой стенки, отек ткани, накопление клеток крови в просвете сосуда, то есть типичная картина воспалительной реакции.

Высокая биологическая активность, присущая анафилатоксину C5a в процессе воспаления, предопределяет интерес исследователей к нему не только с научной точки зрения, но и имеет огромное значение для практической медицины.

Учитывая тот факт, что выделение анафилатоксина C5a из донорской крови сопряжено не только с огромными затратами, но и значительными рисками, а также то, что существующие методы получения природного белка весьма трудоемки и малоэффективны (Fernandez and Hugli, 1976; Renfer *et al.*, 1986), генно-инженерный способ получения этого лимфокина представляется наиболее перспективным.

5.3.2 Химико-ферментативный синтез и клонирование гена аналога человеческого анафилатоксина C5a

Для синтеза гена человеческого анафилатоксина C5a мы разделили его нуклеотидную последовательность на три произвольных фрагмента, кодирующие а/к последовательности 1-37 (I), 38-62 (II) и 63-74 (III) белка. Искусственный ген кодирует белок, который отличается от аутентичного человеческого C5a (Mandeki *et al.*, 1985) лишь двумя а/к заменами, введенными умышленно: Trp в положении 1 на Met для обеспечения прямой экспрессии в бактериальных клетках и Cys в положении 27 на Ser исходя из особенностей структурно-функциональной организации молекулы: три внутримолекулярные дисульфидные связи образованы шестью остатками цистеина, в то время как седьмой остаток в положении 27 остается незадействованным в образовании указанных «мостиков», что при экспрессии в гетерологичной системе может приводить к образованию «неправильных» дисульфидных связей как внутри молекулы, так и между ними. Такой процесс может быть причиной формирования неправильной вторичной структуры молекулы и, как следствие, привести к потере биологической активности, что крайне нежелательно; тем более на тот момент Моллисон с соавт. уже показали, что эти замены не влияют на специфическую активность анафилатоксина C5a (Mollison *et al.*, 1989). Общая схема клонирования приведена на рисунке 5.14.

Дуплекс, полученный лигированием шести олигонуклотидов (фрагмент I), клонировали в составе векторной плазмиды pFH123, аналогично клонировали и фрагмент II, полученный в результате полимеразной достройки двух частично комплементарных полинуклеотидов, после чего их выделяли из целевых рекомбинантных плазмид и клонировали совместно с синтетическим олигонуклеотидным дуплексом (фрагмент III) в той же векторной плазмиде.

5.3.3 Экспрессия гена аналога человеческого анафилатоксина C5a

Экспрессия гена человеческого анафилатоксина C5a была достигнута под контролем *recA*-промотора *P. mirabilis* в клетках *E. coli*, для чего использовалась ранее полученная рекомбинантная плазида pRIL3, экспрессирующая ген IL-2 (Серегин и др., 1993а), и рекомбинантная плазида pFHC5a/3 (рисунок 5.14).

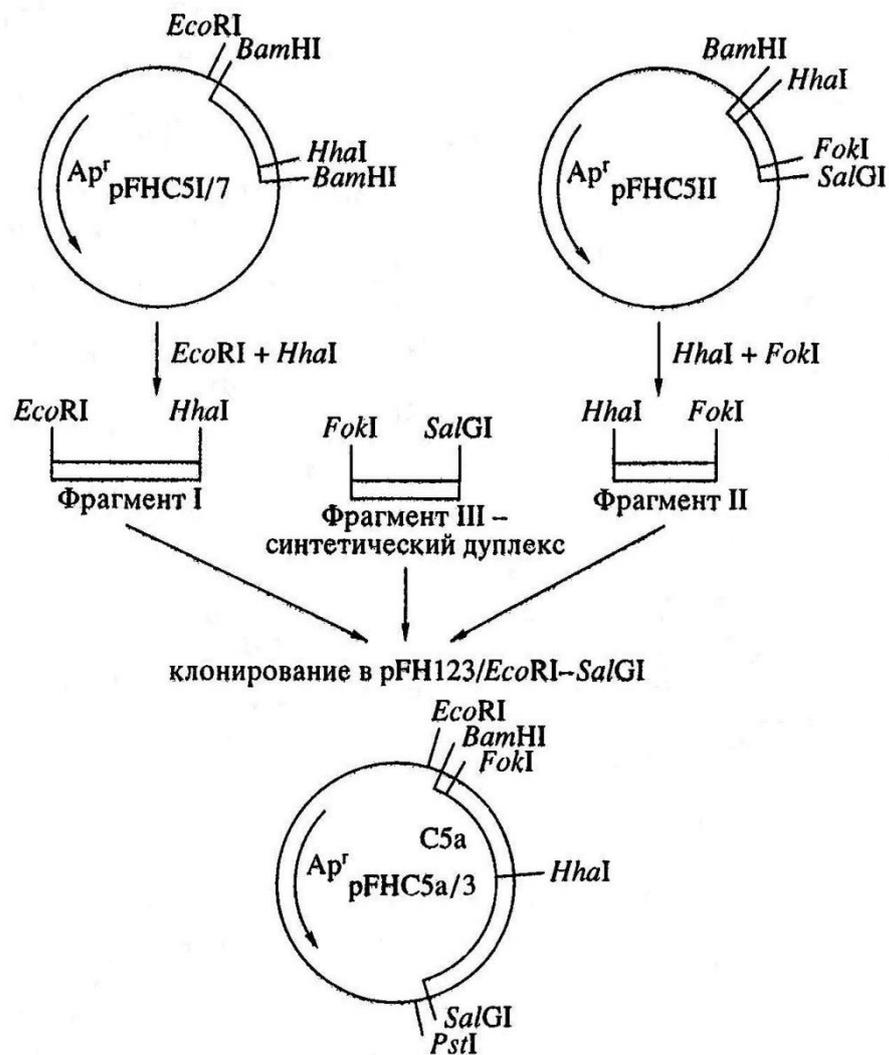


Рисунок 5.14 – Общая схема конструирования рекомбинантной плазмиды pFHC5a/3, содержащей ген аналога человеческого анафилатоксина C5a (Бабкина и др., 1995)

На первой стадии реконструировали плазмиду pFHC5a/3 таким образом, чтобы сдвинуть участок рестрикции *FokI* относительно 5'-конца гена C5a (Бабкина и др., 1995) для обеспечения в дальнейшем прямой экспрессии гена под контролем *recA*-промотора, после чего на второй стадии ген IL-2 в плазмиде pRIL3 был заменен геном анафилатоксина C5a. Строение целевой рекомбинантной плазмиды pRC5a приведено на рисунке 5.15.

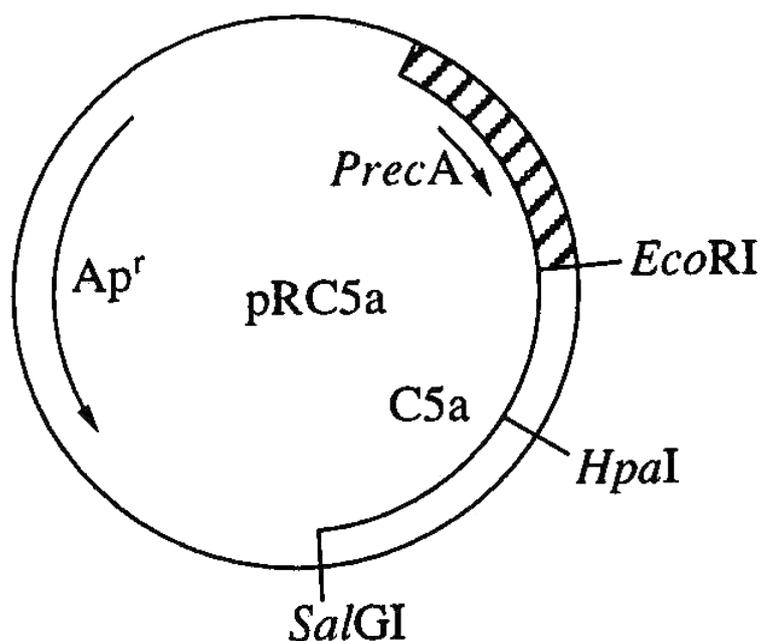
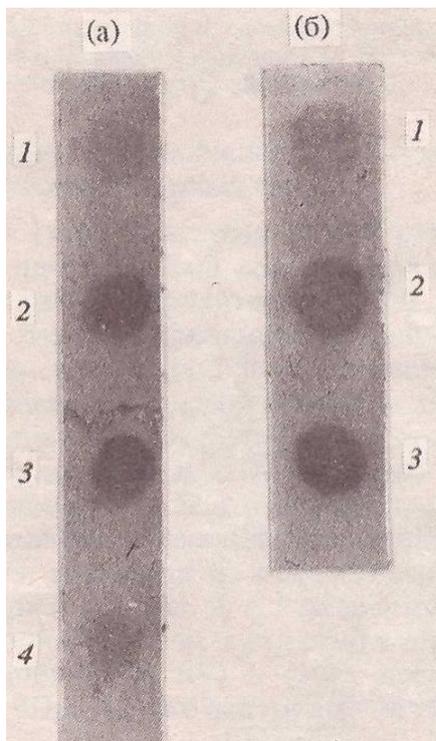


Рисунок 5.15 – Структура рекомбинантной плазмиды pRC5a

Штаммы-продуценты рекомбинантного белка аналога C5a были получены путем трансформации бактериальных клеток *E. coli* JM103 и VL1222 (последний обладает пониженной способностью к внутриклеточному протеолизу). Условия культивирования бактериальных клеток и индукции синтеза целевого белка аналогичны описанным выше для гена IL-2 и его аналогов. Для оптимизации этих условий и сравнения уровней синтеза мы использовали дот-блоттинг (выявление проводили с помощью поликлональной козьей сыворотки к человеческому анафилатоксину C5a), поскольку для низкомолекулярных белков методом электрофореза суммарных клеточных белков это осуществить весьма затруднительно.

Таким образом, было установлено, что максимальный выход белка наблюдается при 12 ч индукции митомицином C, и он составляет приблизительно 1 мкг/мл бактериальной культуры, что соответствует около 0,5 % суммарного клеточного белка, причем дальнейшее увеличение времени индукции до 18 ч приводило к существенному уменьшению количества тестируемого белка – в 4-5 раз (рисунок 5.16).



а – лизаты клеток *E. coli* VL1222(pRC5a), по 10 мкл на точку (сконцентрированы в 100 раз): 1 – в момент внесения индуктора митомицина С, 2, 3, 4 – 6, 12 и 18 ч индукции соответственно;

б – человеческий С5а, выделенный из плазмы доноров: 1 – 0,25 мкг, 2 – 0,5 мкг, 3 – 1 мкг.

Рисунок 5.16 – Оценка уровня экспрессии рекомбинантного белка С5а методом радиоиммунного анализа. Радиоавтограф дот-блоттинга (Бабкина и др., 1995)

Следует также отметить тот факт, что уровень синтеза целевого рекомбинантного белка был практически одинаков для обоих штаммов-продуцентов, что свидетельствует о том, что скорость протеолитической деградации не является критическим фактором, определяющим низкий уровень синтеза целевого белка. Полученные нами результаты полностью согласуются с литературными данными (Mandeckí *et al.*, 1986).

Биологическая активность рекомбинантного аналога анафилатоксина С5а была подтверждена нами в тестах *in vitro*: клеточный хемотаксис и высвобождение пероксидаз из перитонеальных клеток (в основном, гранулоциты) крысы.

Итак, поставленная задача была решена. Однако низкий уровень синтеза рекомбинантного белка С5а в сравнении с IL-2 и его аналогами не позволял сделать вывод о достаточной надежности разрабатываемых векторов экспрессии. Хотя стоит отметить, что для таких коротких белков, каковым является анафилатоксин С5а (74 а/к), подобные уровни синтеза считаются вполне хорошими.

Тем не менее дальнейшая проверка экспрессионных плазмид, содержащих *recA*-промотор *P. mirabilis* оставалась по-прежнему актуальной задачей. Однако в нашем арсенале до сих пор не было определенной векторной плазмиды, обладающей в известной степени универсальностью, обеспечивающей максимальное удобство клонирования различных генов и высокий уровень их

экспрессии. Мы использовали рекомбинантные плазмиды, экспрессирующие определенные гены (в основном, ген *IL-2* человека), и заменяли один ген другим, что неудобно для широкого применения данной системы экспрессии. Таким образом, следующим этапом работы логически последовало конструирование более функциональной экспрессионной векторной плазмиды, содержащей *recA*-промотор *P. mirabilis*, и всесторонняя проверка этого нового вектора с использованием различных генов.

5.4 Конструирование и проверка экспрессионной векторной плазмиды pRTU1

5.4.1 Получение экспрессионной векторной плазмиды pRTU1

Успешное использование полученных нами и описанных выше рекомбинантных плазмид поставило задачу конструирования экспрессионного вектора, не только обладающего всеми достоинствами предшественников, но и предоставляющего новые возможности в плане проведения генно-инженерных манипуляций.

Во-первых, вместо конкретного гена было принято решение организовать протяженный полилинкер с участками узнавания для крупнощеплящих эндонуклеаз рестрикции, который призван облегчить клонирование целевых генов. Во-вторых, логически следовала замена созданного нами шпилечного терминатороподобного участка, расположенного за клонируемыми генами, который в ряде случаев обеспечил существенное повышение уровня экспрессии целевых генов, о чем подробно упоминалось выше, на аутентичный надежный терминатор транскрипции. Для этого мы решили использовать сильный терминатор транскрипции триптофанового оперона *E. coli trpA*, который не зависит от ρ -фактора.

Эта замена диктовалась еще и тем фактом, что шпилечный участок сформирован из серии инвертированных сайтов узнавания для рестриктаз, и некоторые из них хотелось бы ввести в новый полилинкерный участок, где они должны быть уникальными.

Для решения этой задачи использовали плазмидный вектор pEZZT318 (Nilsson and Abrahmsén, 1990), который позволял извлечь фрагмент ДНК,

содержащий необходимый полилинкер, вслед за которым расположен и требуемый терминатор транскрипции. Процедура выглядела следующим образом: *EcoRI-NruI*-фрагмент плазмиды pRIL7t (векторная часть) лигировали совместно с *EcoRI-EcoRV*-фрагментом плазмиды pEZZT318 (содержит полилинкер и терминатор), и после трансформации клеток *E. coli* JM109 был отобран клон, несущий целевую рекомбинантную экспрессионную плазмиду, которая получила название pRTU1. На рисунке 5.17 приведена схема данного плазмидного вектора, несущего кассету «*recA*-промотор *P. mirabilis* – полилинкер – терминатор транскрипции триптофанового оперона *E. coli* *t_{trpA}*».

5.4.2 Проверка экспрессионной векторной плазмиды pRTU1

Для проверки сконструированной нами плазмиды pRTU1 мы на первом этапе использовали искусственный ген IL-2 человека, который был нами ранее экспрессирован в различных вариантах рекомбинантных плазмид под контролем *recA*-промотора, как подробно описано выше в главе 5.1.3. Для этого ген IL-2 человека был реклонирован в плазмиду pRTU1 по *EcoRI-SalI*-участкам рестрикции, и проведена серия экспериментов по индукции синтеза целевого белка в различных условиях в сравнении с рекомбинантной плазмидой pRIL7t, показавшей ранее максимальный результат (45 мкг белка/мл бактериальной культуры). В основном были получены одинаковые результаты, хотя в ряде экспериментов новый вектор pRTU1 показал себя несколько лучше, однако эти различия нельзя признать статистически достоверными.

Для большей уверенности в пригодности нового экспрессионного вектора мы реклонировали в него мутантный ген IL-2m и гены химеротоксинов AIL и ILA. Вновь результаты оказались примерно одинаковыми: уровень синтеза, обеспечиваемый новым экспрессионным вектором, оказался сравним с уровнем синтеза, обеспечиваемым плазмидами-прототипами, описанными в предыдущих главах этого раздела.

Реклонировав в экспрессионную векторную плазмиду pRTU1 ген анафилатоксина C5a человека, мы наблюдали повышение уровня синтеза рекомбинантного белка в 1,5-2 раза по сравнению с прототипом, что составило 1,5-2 мкг/мл бактериальной культуры.

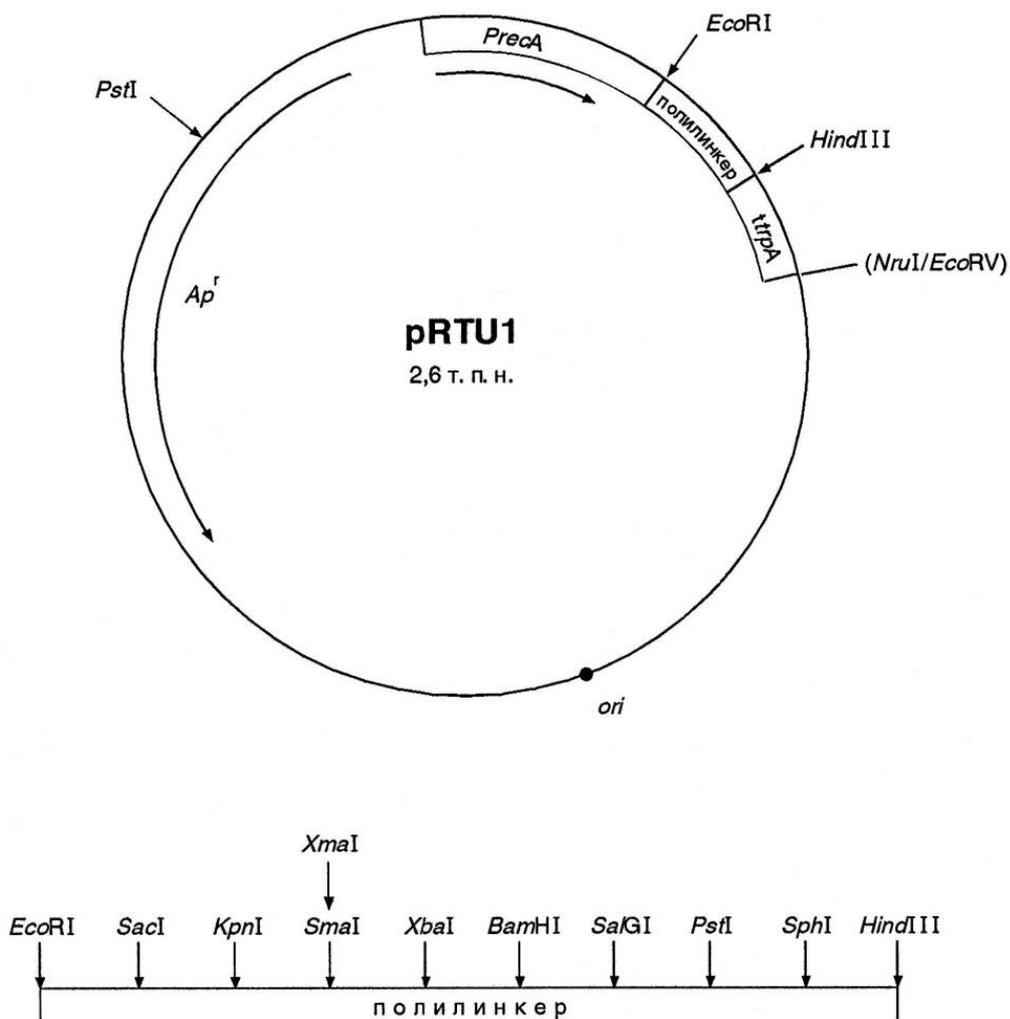


Рисунок 5.17 – Схема экспрессионной векторной плазмиды pRTU1
(Серегин и др., 1996а)

Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что в дальнейшем целесообразно использовать плазмидный вектор pRTU1 для достижения высокого уровня экспрессии целевых генов. Именно такая задача и была поставлена на следующем этапе работы: проверить эффективность экспрессионной векторной плазмиды pRTU1, содержащей кассету «промотор гена *recA* *P. mirabilis* – полилинкер – терминатор транскрипции *trpA* *E. coli*» для получения различных чужеродных белков в клетках *E. coli*.

5.5 Получение белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору γ -интерферона человека, в клетках *Escherichia coli*

5.5.1 Краткая характеристика белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору γ -интерферона человека

Изучение структурно-функциональной организации различных представителей семейства ортопоксвирусов, проведение сравнительного анализа полученных результатов позволяет предсказывать некоторые функции белков, кодируемых теми или иными открытыми рамками трансляции (ОРТ). В этой связи особый интерес представляют белки, ответственные за преодоление как специфического, так и неспецифического защитного барьера организма-хозяина. Получение таких белков в рекомбинантном виде и изучение их биологической активности приобретает важное значение.

В качестве объекта изучения были выбраны два штамма вируса натуральной оспы (ВНО) – возбудителя особо опасного заболевания человека. Важно подчеркнуть, что штамм India-1967 является высоковирулентным (*Variola major*), а штамм Garcia-1966 –слабовирулентным (*Variola minor*). Ранее нашими коллегами был проведен подробный анализ генома ВНО и предсказаны гены, продукты экспрессии которых могут модулировать защитные механизмы инфицированного организма (Shchelkunov *et al.*, 1993; Shchelkunov *et al.*, 1994). Одним из таких белков, вполне вероятно, является продукт ОРТ В9R, гомологичный рецептору γ -интерферона (γ -IFN) человека, имеющий размер 266 а/к (Shchelkunov *et al.*, 1993).

Таким образом, цель следующего этапа работы состояла в получении белков двух штаммов ВНО, гомологичных рецептору γ -IFN человека, в клетках *E. coli* с использованием сконструированной нами экспрессионной векторной плазмиды рRTU1 с целью дальнейшего сравнительного изучения их биологической активности.

5.5.2 Получение белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору γ -интерферона человека, в клетках *E. coli* с помощью экспрессионной плазмиды pRTU1

Фрагменты ДНК с генами целевых белков получали из рекомбинантных плазмид с клонированными участками генома ВНО, которые содержали искомую ОПТ В9R (Shchelkunov *et al.*, 1993; Shchelkunov *et al.*, 1994). Как видно из рисунка 5.18, из плазмиды pH3X1 извлекали *AsuII-SalI*-фрагмент с геном гомолога рецептора γ -IFN штамма India-1967, а из плазмиды p Δ Vam – *AsuII-XhoI*-фрагмент с аналогичным геном штамма Garcia-1966.

На рисунке 5.18 представлена общая схема конструирования целевых рекомбинантных плазмид, обеспечивающих экспрессию ОПТ В9R двух штаммов ВНО. Каждый из этих фрагментов лигировали совместно с вектором pRTU1/*EcoRI-SalI* и *EcoRI-AsuII*-синтетическим дуплексом, обеспечивающим точное восстановление 5'-концевой области гена и правильную стыковку гена с промотором. При этом сигнальные последовательности (16 а/к), ответственные за секрецию белка из пораженной клетки и отщепляемые в ходе этого процесса (Upton *et al.*, 1992), в каждом из генов элиминировались так, чтобы получить продукты их экспрессии в зрелом виде (рисунок 5.19). В результате скрининга клонов были отобраны целевые рекомбинантные плазмиды pRIRgT и pRIRinT.

Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* JM103 и проводили серию экспериментов по оптимизации условий синтеза целевых рекомбинантных вирусных белков.

На следующей стадии работы была проверена возможность повышения уровня синтеза рекомбинантных белков за счет использования бактериальных штаммов с пониженной способностью к внутриклеточному протеолизу. Таких штаммов использовалось три: *E. coli* BL21, *E. coli* VL1201 и *E. coli* VL1222. В результате существенного повышения уровня синтеза не наблюдалось: 10-12 % от общего белка клетки в случае штаммов *E. coli* JM103 и *E. coli* BL21 и 12-15 % в случае двух других (рисунок 5.20а) с содержанием целевых рекомбинантных белков 30-40 мкг в 1 мл бактериальной культуры.

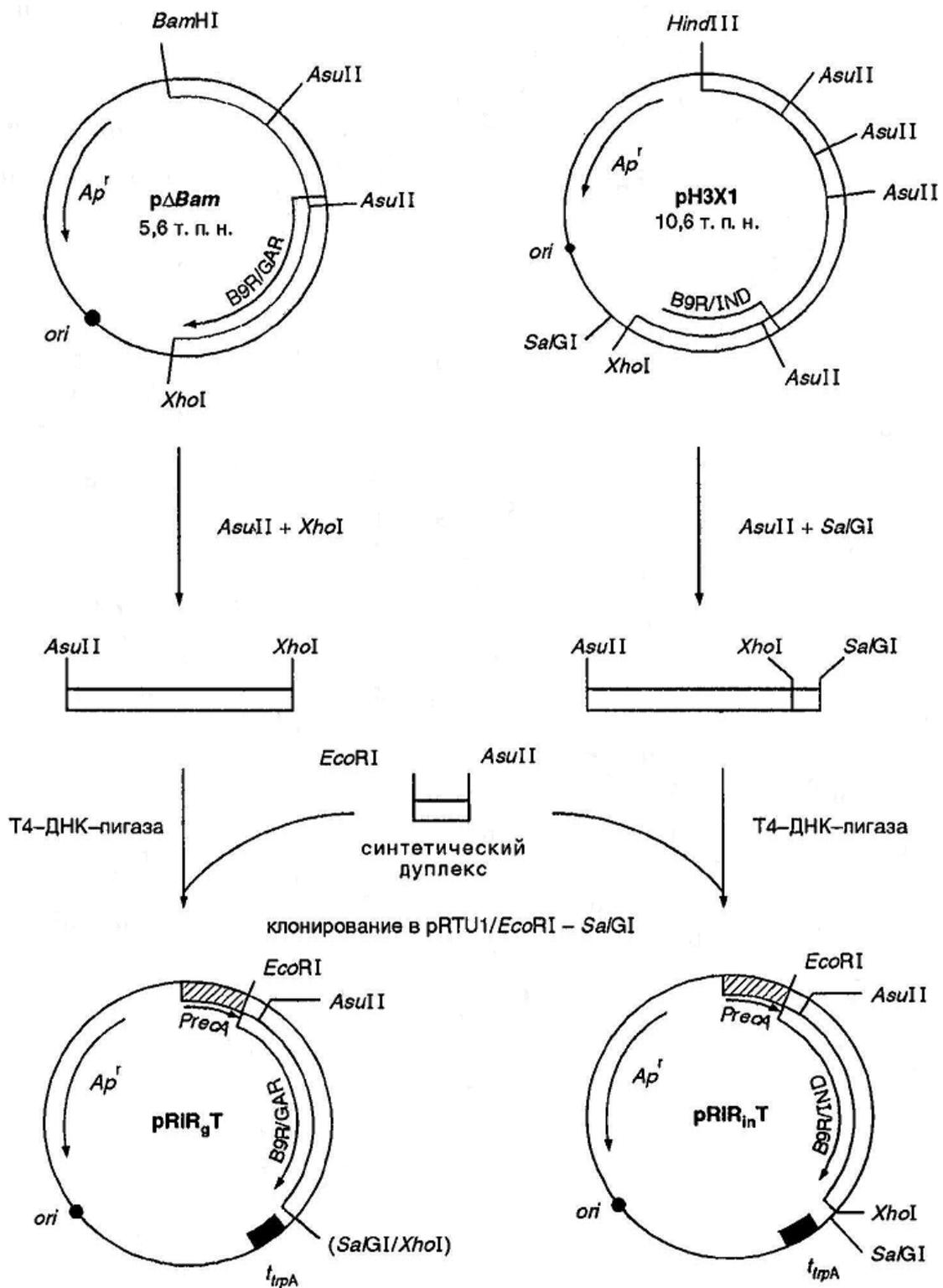
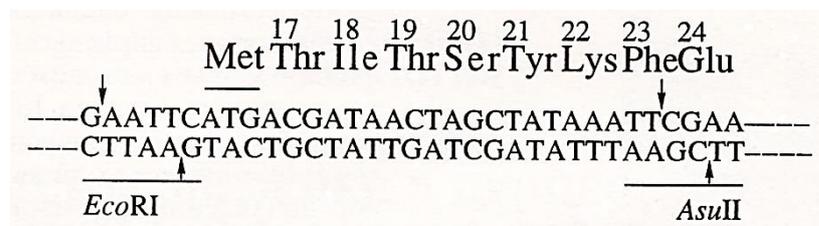


Рисунок 5.18 – Схема конструирования плазмид pRIR_gT и pRIR_{in}T (Серегин и др., 1996а)



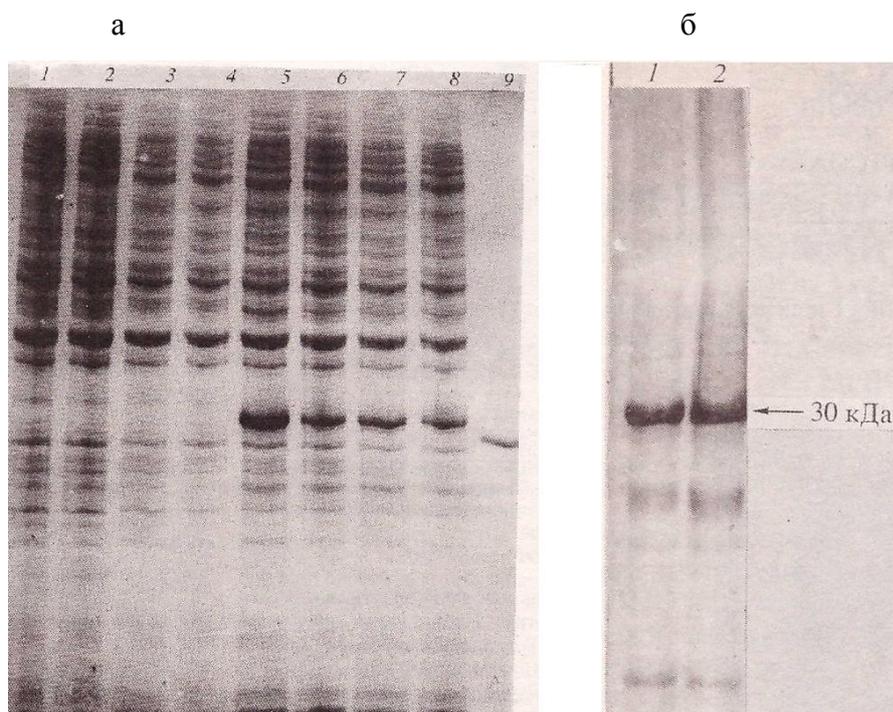
Синтетический дуплекс выделен вертикальными стрелками.

Рисунок 5.19 – Структура 5'-концевой области целевых вирусных генов в составе рекомбинантных плазмид pRIRgT и pRIRinT (Серегин и др., 1996б)

Таким образом, рекомбинантные вирусные белки-гомологи рецептора человеческого γ -IFN в малой степени подвержены внутриклеточному протеолизу, вероятно, благодаря тому, что способны переходить в форму нерастворимых телец включений и в таком виде накапливаться в бактериальной клетке. Этот факт позволил разработать несложную методику выделения целевых вирусных белков из нерастворимой фракции, включающую поэтапную отмывку телец включений 2 М и 4 М растворами мочевины, солубилизацию рекомбинантных белков в 6 М мочеvine, гель-фильтрацию и диализ (рисунок 5.20б).

Эксперименты по изучению специфической (интерферон-нейтрализующей) активности в отношении подавления противовирусной активности γ -IFN *in vitro* показали, что рекомбинантные вирусные белки, гомологичные рецептору γ -IFN человека, обладают высокой интерферон-нейтрализующей активностью в отношении γ -IFN человека, но не α -IFN, что подтверждает их строгую специфичность.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эти белки ВНО могут играть ключевую роль в преодолении γ -IFN-составляющей иммунного барьера инфицированного организма, причем, следует особо отметить, что зависимости вирулентности штаммов ВНО от удельной активности вирусных белков, гомологичных рецептору γ -IFN, не обнаружено (Серегин и др., 1996а;б; Seregin *et al.*, 1996).



а: 1, 5, 7 – клетки, содержащие плазмиду pRIRgT; 2, 6, 8 - клетки, содержащие плазмиду pRIRinT; 3, 4 – клетки без плазмиды; 9 – маркерный белок 29 кДа; 1, 2 – без индукции; 3, 5, 6 – индукция митомицином С в течение 12 ч; 4, 7, 8 - индукция митомицином С в течение 6 ч;

б: выделенные целевые вирусные белки из клеточной биомассы штаммов-продуцентов: 1 - *E. coli* VL1222(pRIRinT); 2 – *E. coli* VL1222(pRIRgT).

Рисунок 5.20 – Продукция в клетках *E. coli* VL1222 рекомбинантных белков ВНО, гомологичных рецептору γ -IFN человека. Электрофореграмма. 15 % ПААГ (Серегин и др., 1996б)

Таким образом, с помощью сконструированного плазмидного экспрессионного вектора pRTU1 была успешно решена поставленная задача по получению белков ВНО, гомологичных рецептору γ -IFN человека, и изучению их биологической активности.

Однако следует отметить, что мы не пытались получить продукты экспрессии этих вирусных генов в других бактериальных системах, то есть с использованием иных экспрессионных векторов. Поэтому было бы преждевременно делать вывод о том, что полученная нами экспрессионная плазмида имеет неоспоримые преимущества перед другими. Для этого необходимо было поставить и решить

задачу получения в рекомбинантном виде с высоким уровнем синтеза в клетках *E. coli* какого-либо белка, получение которого с использованием других экспрессионных векторов оказалось проблематичным. Именно такая задача была поставлена и успешно решена на следующем этапе работы.

5.6 Экспрессия синтетического гена ангиогенина человека в клетках *Escherichia coli* с использованием векторной плазмиды pRTU1

5.6.1 Краткая характеристика ангиогенина

Ангиогенин представляет собой белковый фактор, индуцирующий образование и рост кровеносных сосудов, то есть он вовлечен в процесс ангиогенеза, особенно в опухолевых тканях, однако обнаруживается и в крови здоровых людей (Fett *et al.*, 1985; Shapiro *et al.*, 1987; Weiner *et al.*, 1987). Связавшись с актином на поверхности эндотелиальных клеток, ангиогенин подвергается эндоцитозу, затем транслоцируется в ядро, обеспечивая эндотелиальную инвазивность, необходимую для формирования кровеносных сосудов. В клетке ангиогенин может проявлять РНК-азную активность, в основном функционируя как тРНК-специфическая нуклеаза, снижая тем самым уровень синтеза белка (Lee and Vallee, 1989; Hu *et al.*, 1993; Moroianu and Riordan, 1994).

Помимо теоретического интереса ангиогенин приобретает огромную практическую значимость, прежде всего в связи с возможностью создания на его основе перспективных препаратов для лечения ожогов, язв и ран различной этиологии. Понятно, что для проведения исследований в этом направлении требуются достаточные количества препарата, в то же время выделение его из природных источников весьма затруднено и малоэффективно. Таким образом, задача получения ангиогенина в рекомбинантном виде крайне актуальна.

5.6.2 Эффективная экспрессия гена ангиогенина человека в клетках *E. coli*

К моменту начала настоящей работы в литературе были представлены результаты по экспрессии в клетках *E. coli* как природного гена ангиогенина человека, полученного в виде кДНК (Kurachi *et al.*, 1988), так и его синтетических аналогов (Denèfle *et al.*, 1987; Shapiro *et al.*, 1988). Однако проблему прямой экспрессии, то есть синтеза белка в чистом виде, без дополнительных пептидных

фрагментов, нельзя было считать решенной. Так, например, в работе Шапиро с соавторами (Shapiro *et al.*, 1988) сообщалось об уровне экспрессии синтетического гена 2 мг рекомбинантного белка на 1 л культуральной среды. Этот уровень никак нельзя назвать высоким. По различным оценкам это составляет от 0,02 до 0,2 % от суммарного клеточного белка.

Наши коллеги предприняли ряд попыток получить продукт экспрессии синтетического гена ангиогенина в чистом виде в различных векторных системах под контролем ИПТГ-индуцибельных промоторов *lac*-оперона *E. coli* и сильного гибридного *tac*-промотора, однако их попытки не увенчались успехом (Чикаев Н.А., личное сообщение). Таким образом, ген ангиогенина человека являлся подходящим кандидатом для проверки эффективности сконструированного нами плазмидного вектора экспрессии pRTU1.

Для получения целевой рекомбинантной плазмиды, экспрессирующей ген ангиогенина, последний извлекали из двуцепочечной репликативной формы бактериофага M13mp8-ang (Коваленко и др., 1988) по участкам рестрикции *EcoRI* и *HindIII* и встраивали по этим же сайтам в векторную плазмиду pRTU1. В результате скрининга рекомбинантных клонов была получена целевая плазида pRTang, содержащая синтетический ген ангиогенина человека под контролем *recA*-промотора, структура которой схематично приведена на рисунке 5.21.

Оптимизацию условий культивирования и индукции, выбор штамма-хозяина проводили широкомасштабно, как это описано выше для других генов. В результате лучшим штаммом для наработки клеточной биомассы, содержащей целевой рекомбинантный белок, оказался штамм *E. coli* VL1222, хотя он и не имел неоспоримых преимуществ перед рядом других штаммов, таких как *E. coli* VL1201, *E. coli* BL21, *E. coli* JM103. Максимальный уровень синтеза целевого белка в этом штамме был несколько выше, чем в других (не менее 1,5 % от суммарного клеточного белка или 30 % суммарного белка грубого клеточного дебриса, представляющего собой нерастворимую фракцию клеточных белков, содержащую тельца включений с ангиогенином) и достигал 15 мкг/мл бактериальной культуры, что вполне достаточно не только для лабораторного, но и для промышленного производства.

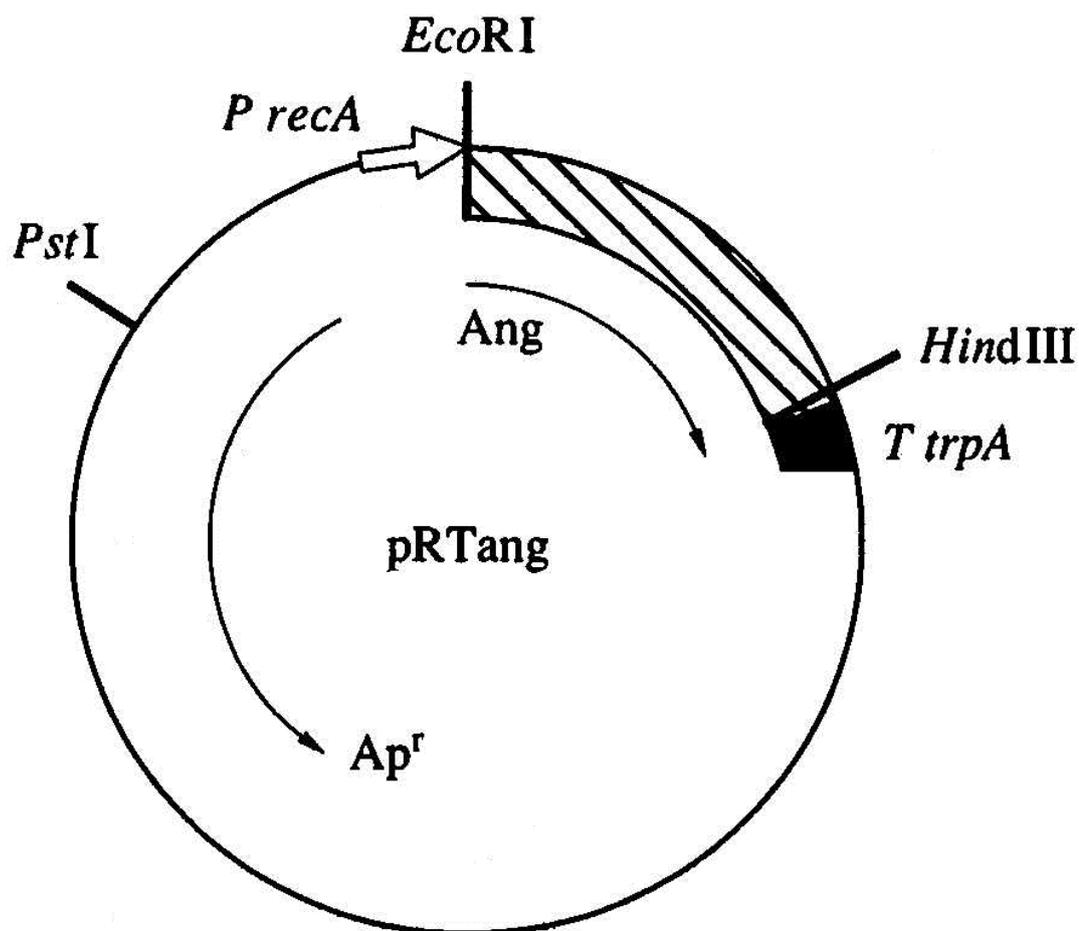
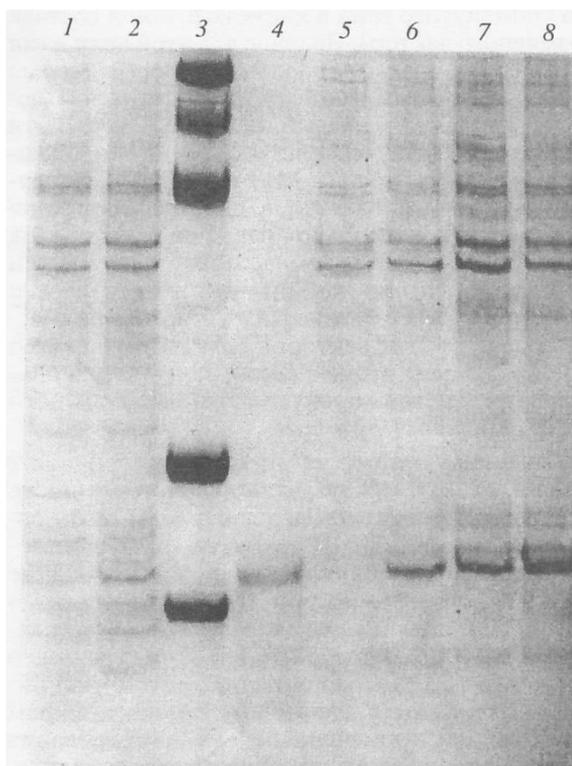


Рисунок 5.21 – Структура рекомбинантной плазмиды pRTang
(Никонова и др., 1996)

На рисунке 5.22 приведены результаты одного из экспериментов по индукции синтеза рекомбинантного ангиогенина человека и показано содержание целевого продукта в нерастворимой фракции клеток-продуцентов.

Иммуноспецифичность синтезируемого рекомбинантного белка была показана методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител к ангиогенину человека.

Таким образом, нам удалось добиться эффективной прямой экспрессии гена ангиогенина человека в клетках *E. coli* благодаря использованию нового плазмидного вектора pRTU1. Тот факт, что в других системах экспрессии результата достичь не удалось, а экспрессионный плазмидный вектор pRTU1 обеспечил достаточно высокий уровень синтеза рекомбинантного ангиогенина человека, позволяет сделать вывод о его перспективности и надежности.



- 1 – лизат клеток без индукции;
- 2 – лизат клеток после 6 ч индукции митомицином С;
- 3 – набор маркеров молекулярных масс: 132; 94; 66; 20,1; 13,7 кДа;
- 4 – ангиогенин («Ферментас», Вильнюс, Литва);
- 5 – нерастворимая белковая фракция – без индукции;
- 6 – то же после 2 ч индукции митомицином С;
- 7 – то же после 6 ч индукции;
- 8 – то же после 12 ч индукции.

Рисунок 5.22 – Экспрессия гена ангиогенина человека в клетках штамма-продуцента *E. coli* VL1222(pRTang). Электрофореграмма. 15 % ПААГ (Никонова и др., 1996)

Тем самым мы завершили серию экспериментов по созданию оригинальной векторной плазмиды, обеспечивающей удобство клонирования и высокий уровень экспрессии чужеродных генов в клетках *E. coli*. Нам удалось продемонстрировать эффективную экспрессию генов различного происхождения: как природных, так и искусственных, как нативных, так и мутантных, как индивидуальных, так и химерных, как бактериальных, так и вирусных, а также человеческих.

5.7 Конструирование рекомбинантных плазмид pBK-RSV-TCI и pcDNA-TCI, содержащих искусственный ген TCI, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, как кандидатных ДНК-вакцин

5.7.1 Общая характеристика искусственного иммуногена TCI

Успех создания эффективной вакцины против ВИЧ многие исследователи в последнее время связывают с получением искусственных ДНК-вакцинных конструкций, индуцирующих CTL-ответы на множественные специфические эпитопы вирусных белков (Hanke *et al.*, 1998a,b,c; Woodberry *et al.*, 1999; Livingston *et al.*, 2001). Как отмечалось ранее в разделе 3 «Обзор литературы», в ГНЦ ВБ «Вектор» под руководством С.И. Бажана был проведен дизайн искусственного Т-клеточного иммуногена TCI (T Cell Immunogen) – кандидата для использования в качестве ДНК-вакцины против ВИЧ-1. Общий дизайн TCI-иммуногена и структура входящих в него эпитопов также представлены на рисунке 3.19 и в таблицах 3.2 и 3.3 в разделе 3 «Обзор литературы».

Очевидно, что эффективная CTL-вакцина должна кодировать большое количество индивидуальных эпитопов определенной HLA-специфичности. К началу наших работ в этом направлении уже было идентифицировано достаточно много эпитопов, вовлеченных в индукцию ВИЧ-1-специфичных CTL-ответов у инфицированных людей. Для конструирования иммуногена TCI из базы данных *Los Alamos HIV Molecular Immunology Database* были выбраны эпитопы по следующим критериям.

- Эпитопы выбирались из основных вирусных белков-антигенов, индуцирующих CTL-ответы, Env, Gag, Pol и Nef, причем предпочтение отдавалось тем, которые индуцируют CTL, опознающие соответствующие естественно процессуемые эпитопы.
- Эпитопы индуцируют как CD8⁺ CTL, так и CD4⁺ Т-хелперы и являются высоко консервативными среди подтипов А, В и С ВИЧ-1, обнаруживаемых на территории России, США и многих европейских стран.
- В первую очередь выбирались оптимальные эпитопы, которые в исследованиях по титрованию перекрывающихся усеченных пептидов определены как

минимальные эпитопы, вызывающие наиболее эффективную сенсibilизацию CTL, специфичных к определенным молекулам МНС-I класса.

- Учитывались CD8⁺ CTL-эпитопы, которые в совокупности рестриктированы десятью различными, оптимально подобранными аллелями класса HLA-I. Как известно, этого достаточно, чтобы покрыть генетическое разнообразие антигенов МНС-I класса в популяции практически любого географического района (Lalvani *et al.*, 1994; Sidney *et al.*, 1996; Hanke *et al.*, 1998a). При этом в первую очередь выбирались эпитопы, специфичные к HLA-аллелям, которые наиболее распространены в популяции России (таблица 3.4 в разделе 3).
- И, наконец, из отобранных кандидатных эпитопов были исключены те, которые могут перекрестно реагировать с нормальными клеточными белками за счет локального сходства с белками человека (Максютов и др., 2002).

Таким образом, была получена виртуальная полипептидная цепь, состоящая из всех отобранных эпитопов, объединенных в порядке их картирования в геноме ВИЧ-1. Длина белка-иммуногена TCI составляет 392 а/к. Он содержит более восьмидесяти эпитопов (как CD8⁺ CTL, так и CD4⁺ Т-хелперы), многие из которых перекрываются и в совокупности рестриктированы десятью различными HLA-аллелями.

5.7.2 Получение искусственного гена TCI, кодирующего множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1

Отметим, что последовательность гена, кодирующая белок TCI (392 а/к), является достаточно протяженной и составляет 1176 п.н., поэтому химический синтез гена TCI является достаточно трудоемкой задачей. Мы приняли решение использовать альтернативный и более экономичный подход к синтезу гена TCI, который основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для амплификации фрагментов генома ВИЧ, кодирующих непрерывные районы белка TCI, в качестве матрицы в ПЦР мы использовали геномную кДНК, полученную из хронически инфицированной ВИЧ-1 культуры моноцитов человека U937 (Покровский и др., 2001), ввиду того, что последовательности а/к интересующих нас районов полностью идентичны таковым в белке TCI. Действительно, как уже отмечалось выше, CTL-иммуноген содержит фрагменты,

которые соответствуют достаточно протяженным и непрерывным а/к последовательностям нативных вирусных белков. Именно поэтому идея синтеза целевого гена ТСІ методом ПЦР является достаточно привлекательной, так как позволяет использовать для амплификации некоторых фрагментов целевого гена нативные последовательности генома ВИЧ-1.

Поскольку ТСІ-иммуноген состоит как из достаточно протяженных, так и коротких фрагментов, которые в белках ВИЧ-1 пространственно разнесены, то предложенная технология сборки целевого гена, основанная на ПЦР, состояла в использовании набора «гибридных» праймеров, позволяющих объединить эти разобщенные фрагменты генома ВИЧ-1 в одну непрерывную последовательность. В процессе синтеза трех блоков гена, на которые он был разбит в соответствии с разработанной нами схемой сборки полного гена, мы использовали комбинацию матричного и безматричного синтеза методом ПЦР (имеется в виду наличие или отсутствие в реакционной смеси кДНК ВИЧ-1 в качестве матрицы). Во втором случае короткие фрагменты целевого гена, кодирующие отдельные эпитопы, были включены в состав частично перекрывающихся праймеров для амплификации.

Таким образом, в соответствии с разработанной нами схемой сборки целевого гена его последовательность, кодирующая белок ТСІ, была разбита на три блока:

- блок 1 содержит фрагменты, кодирующие СТЛ-эпитопы гена *gag*;
- блок 2 – кодирует СТЛ-эпитопы гена *env*;
- блок 3 – кодирует СТЛ-эпитопы генов *pol* и *nef*.

В таблице 5.2 представлены все праймеры, использованные для получения целевых блоков гена искусственного иммуногена ТСІ в соответствии с разработанной схемой синтеза, приведенной ниже на рисунках 5.23 – 5.25. Далее в тексте вслед за рисунками приводятся подробные пояснения к ним, поскольку в подрисуночных подписях всю необходимую информацию поместить проблематично.

Таблица 5.2 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации фрагментов (блоков) гена TCI

№ блока	№ праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Длина (нукл.)	
Блок 1	7	CCCGGATCCATGAAAATTCGGTTAAGGCCAG	31	
	8	СТТСТГАТССАТТААСТГСГААТСГТТСТАГС	32	
	9	АТГСАТGGGTAAAAGTAGTAAATCCACСТАТСССAGTAGGA	41	
	10	ССССТСГАГТАГСТТГСТСГГСТСТТАГА	29	
	11	GGCCATATCACСТАGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAAAT	46	
	12	ТТАТАТААТАСAGTAGCAACCСТССAGGCCATATCACСТАGAACTTTA	48	
	13	АТGGATCAGAAGAACTTAGATCATТТАТАТААТАСAGTAGCAACCC	45	
	14	GCTAGAACGATTCGCAGTTAATGGATCAGAAGAACTTAGATCAT	44	
Блок 2	15	CCCGGATCCСТАCAGTСТАТТАТGGGGTACCTGT	33	
	16	ТААСАСАГАГТGGGGTTAATTTATATGCTTTAGCATCTGATGCA	44	
	17	ССТССАСААТТААААСТТАААСТААСАСАГАГТGGGGTTAATTT	44	
	18	GTTTTATTTCTGTAGAAAAATTCСССТССАСААТТААААСТТАААС	45	
	19	GGGGAATTTTTCTACAGAATAAAACAAATТТААААСАТGTGG	42	
	20	AGGAGCTGTTGATCCTTTAGGTATСТААТТТGTCCACTGATGGG	44	
	21	AAAGGATCAACAGCTCCTGAGCTTGCTCAATGCCACAG	38	
	22	CCCGTCGACCAGCCAGAGAGTGATTAGCAAAATCCTTTCCAAGCC	45	
	Блок 3	1	CCCGGATCCTGGCAACGACCCCTCGTCGAAATTTGTACAGAAATGGAAA	50
		2	TGCATCACCCACATCGAGTACTGTAGGCCCAATTTTTGAAAT	42
3		СТСГАТGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTTGGAAAGGATCACCAGCA	48	
4		GAGGTGTGACTGGAAACAAATCGTCCATGTATTGATAGAT	40	
5		CCCGTCGACTCATGGTAACCCTGGTACTAGCTTGTAGCACCAGCCAAAG	49	
6		TTGTTTCCAGTCACACCTCAGGTACC	26	

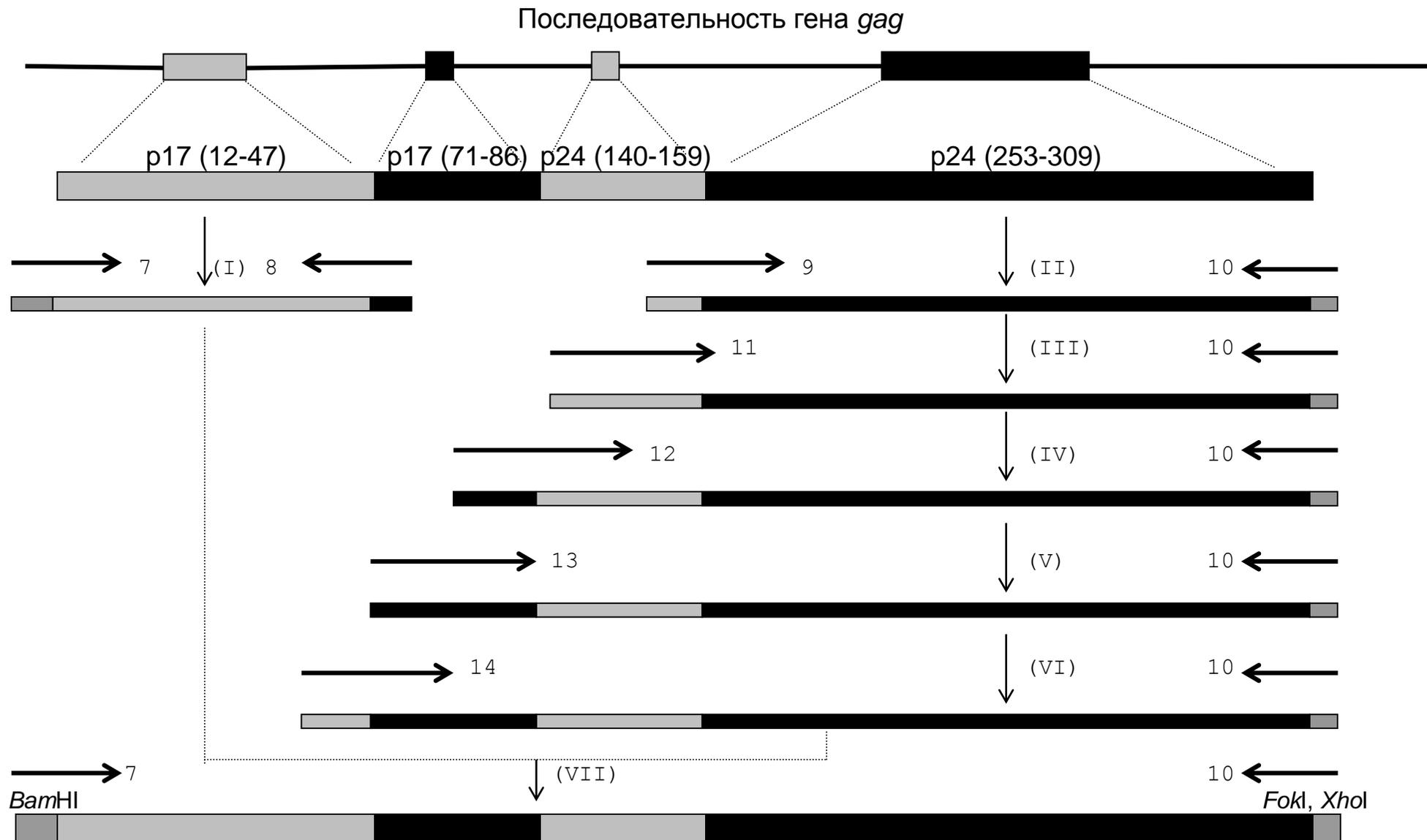


Рисунок 5.23 – Схема сборки блока 1 гена TCI (пояснения в тексте)

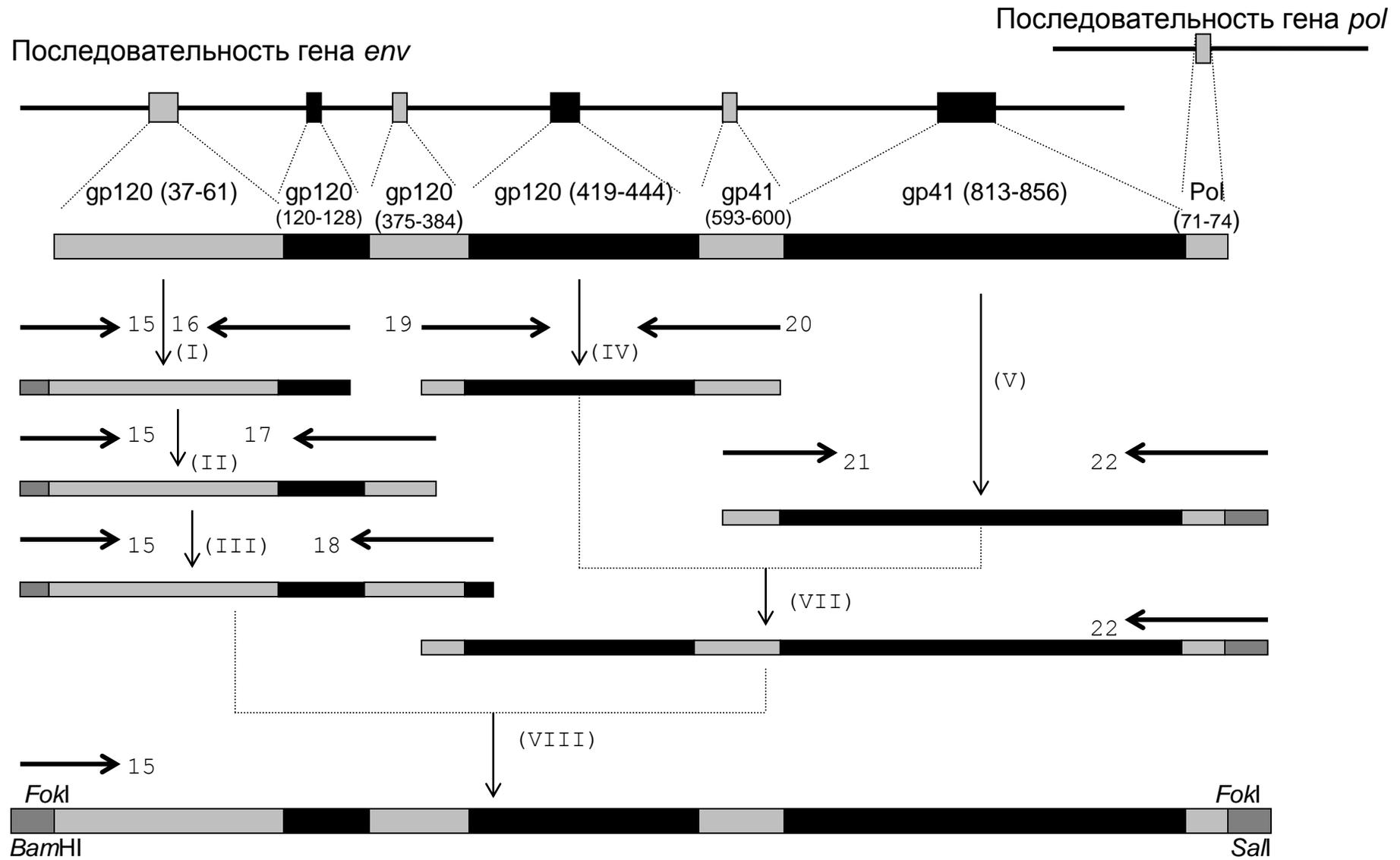


Рисунок 5.24 – Схема сборки блока 2 гена TCI (пояснения в тексте)

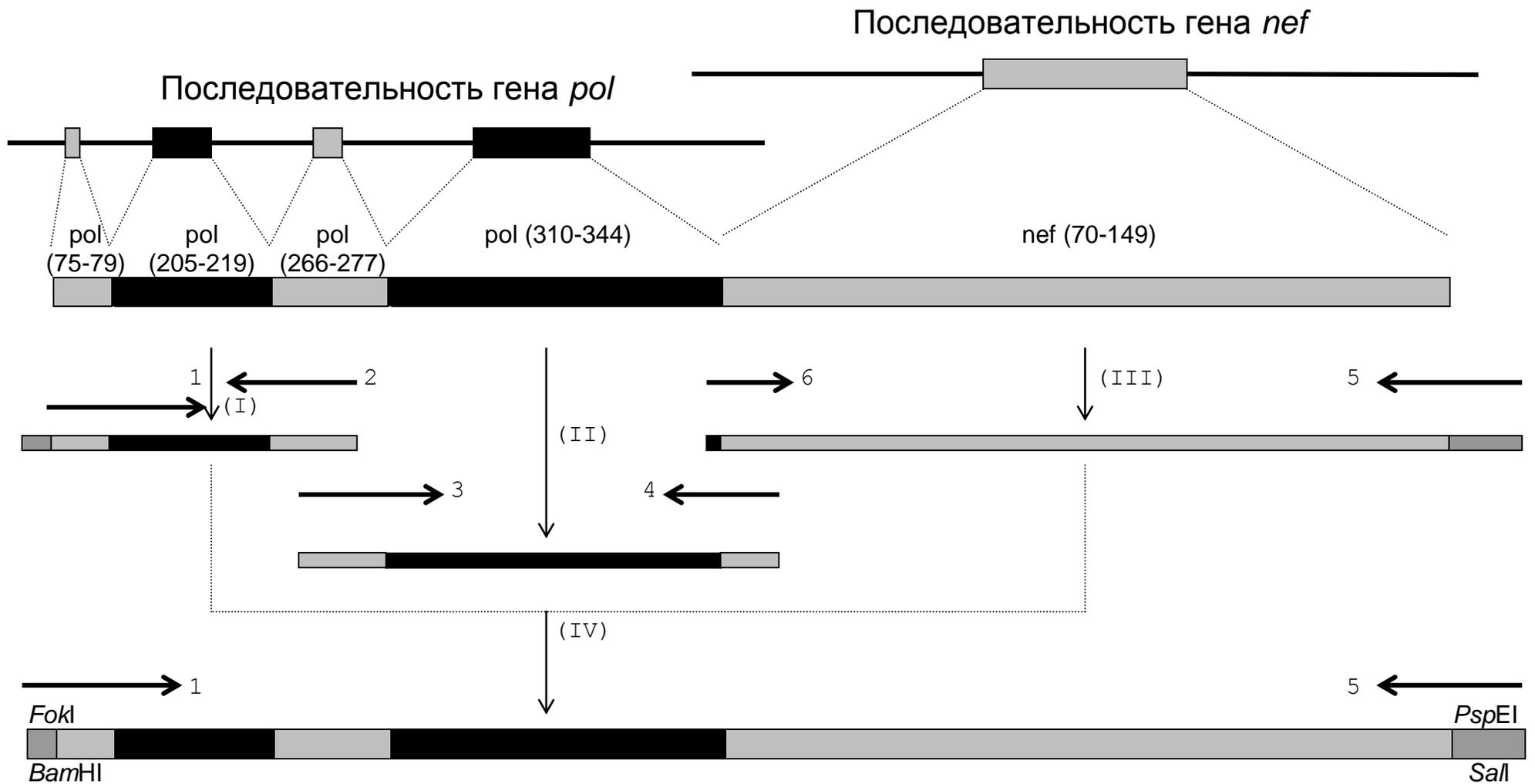


Рисунок 5.25 – Схема сборки блока 3 гена TCI (пояснения в тексте)

Этапы ПЦР (отмечены вертикальными стрелками) пронумерованы римскими цифрами. Олигонуклеотидные праймеры (горизонтальные стрелки) пронумерованы арабскими цифрами и идентичны номерам в таблице 5.2. Чередующиеся черные и серые прямоугольники внутри блоков гена TSI соответствуют последовательностям генома ВИЧ-1, кодирующим непрерывные районы белка TSI. В олигонуклеотиды 1, 7, 15 заложены сайты узнавания для рестриктаз *Bam*HI, в праймеры 5 и 22 - *Sal*I (в случае блока 1 – праймер 10 - *Xho*I) для клонирования в векторе pFH123, обозначенные внизу каждого рисунка, а в олигонуклеотиды 2, 3, 5 введены “молчащие” мутации, приводящие к исчезновению сайта узнавания для рестриктазы *Fok*I. Кроме того, в праймер 7 введен иницирующий кодон трансляции ATG, а в олигонуклеотид 5 – стоп-кодон трансляции TGA.

Для клонирования блоков 1-3 гена TSI в клетках *E. coli* использовалась ранее описанная векторная плаزمида pFH123 (Синяков и др., 1988а, Данилюк и др., 1991б). Эта плаزمида несет специфический полилинкер, содержащий сайты для SII-эндонуклеаз рестрикции (мы использовали рестриктазу *Fok*I), позволяющие получать клонированные фрагменты ДНК с запланированными уникальными «липкими» концами, что существенно облегчает сборку целевых генов из составляющих их фрагментов, как описано выше. Это обстоятельство обязало нас внести в нуклеотидную последовательность гена TSI ряд синонимичных замен нуклеотидов, приводящих к исчезновению участков узнавания для рестриктазы *Fok*I, так как этот фермент мы намеревались использовать для "вырезания" блоков, клонированных в плазмиде pFH123. Все три фрагмента были клонированы в составе вышеназванного плазмидного вектора по участкам рестрикции *Bam*HI и *Sal*I.

Использование плазмиды pFH123 для клонирования фрагментов гена целевого иммуногена обеспечило нам простую инвариантную сборку полноразмерного гена TSI. С этой целью блоки гена TSI были выделены из несущих их рекомбинантных плазмид (блок 1 в виде *Bam*HI-*Fok*I-фрагмента, блок 2 – *Fok*I-*Fok*I-фрагмента и блок 3 представлял собой *Fok*I-*Sal*I-фрагмент) и одновременно клонированы вновь в векторной плазмиде pFH123 по участкам

рестрикции *Bam*HI и *Sal*I, в результате чего была получена целевая рекомбинантная плазида рFH-TSI.

Рекомбинантные плазмиды, содержащие блоки и полную последовательность целевого гена TSI, были отобраны стандартными процедурами скрининга, используя ПЦР и рестрикционный анализ. Затем структура всех клонированных последовательностей подтверждалась секвенированием соответствующих фрагментов рекомбинантных плазмид. Исправление мутаций, введенных *Taq*-ДНК-полимеразой в процессе полимеразной цепной реакции, осуществлялось на основе ступенчатой амплификации последовательности гена TSI с использованием корректирующих мутационных праймеров. Таким образом, предложенная схема позволила синтезировать целевой ген, соответствующий заданной структуре, направляющий синтез искусственного рекомбинантного иммуногена TSI.

Каковы же преимущества разработанной нами блочной схемы получения искусственного гена TSI? Отметим основные из них:

- разработанная схема предполагает инвариантность сборки всех фрагментов ДНК, что существенно облегчает скрининг рекомбинантных клонов и отбор целевых плазмид;
- независимый синтез и клонирование трех разных фрагментов (блоков) гена TSI фактически обеспечивает получение трех разных СТL-иммуногенов, иммунобиологические свойства (протективность, иммуногенность) которых могут быть исследованы как индивидуально, так и в различных смешанных комбинациях;
- наличие отдельных блоков позволяет достаточно быстро синтезировать любой набор новых генов (в том числе и целевой ген TSI), причем каждый из блоков может быть легко модифицирован или заменен другим;
- в 3'-концевой части гена TSI организованы участки рестрикции (*Psp*EI перед терминирующим кодоном трансляции и *Sal*I сразу после него), позволяющие получать новые генетические конструкции путем добавления последовательностей, кодирующих другие эпитопы или иные иммуномодуляторы, с целью повышения эффективности вакцинных препаратов, создаваемых на основе рекомбинантных молекул ДНК.

5.7.3 Получение белка TCI в рекомбинантном виде и доказательство его иммунохимической, иммуногенной и антигенной специфичности

Для доказательства наличия эпитопов ВИЧ-1 в составе рекомбинантного белка, кодируемого геном TCI, последний был экспрессирован в клетках *E. coli* в виде химерных белков с тиоредоксином (TRN) и глутатион-S-трансферазой (GST) *Schistosoma japonicum*. С этой целью были сконструированы рекомбинантные плазмиды pET-TCI и pGEX-TCI, которые получали клонированием гена TCI (в виде *Bam*HI-*Sal*I-фрагмента плазмиды pFH-TCI) в векторных плаزمиде pET32a и pGEX-4T-1, соответственно. Структура одной из рекомбинантных плазмид (pGEX-TCI) представлена на рисунке 5.26.

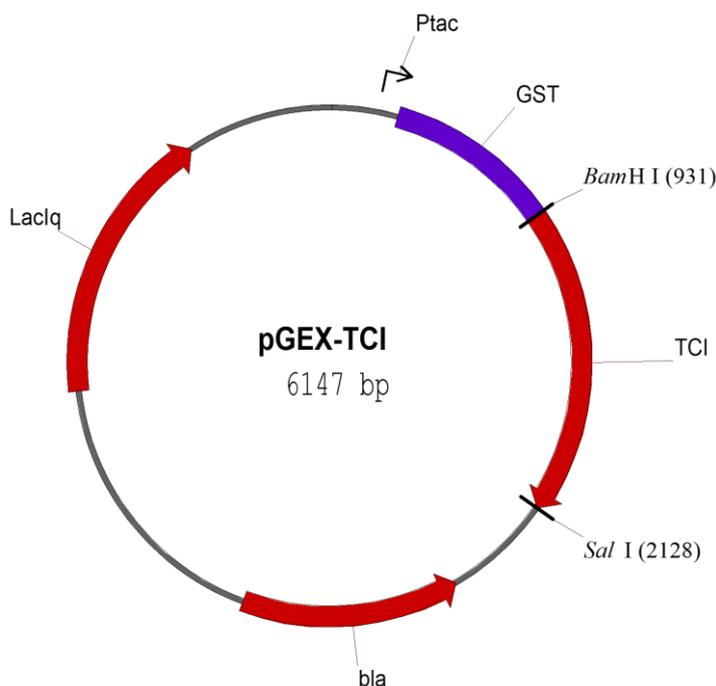
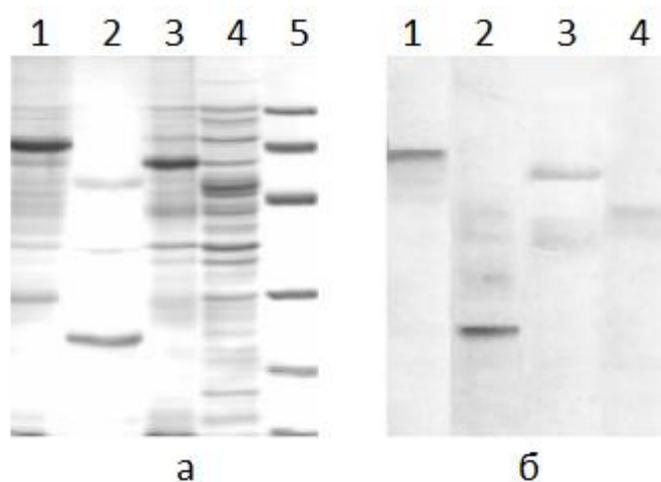


Рисунок 5.26 – Структура рекомбинантной плазмиды pGEX-TCI, направляющей в клетках *E. coli* синтез химерного белка GST-TCI

Целевые химерные белки TRN-TCI и GST-TCI в индуцированных клетках *E. coli* выявляли электрофоретическим разделением клеточных лизатов (рисунок 5.27). Выделение химерных белков TRN-TCI и GST-TCI из бактериальных клеток

проводили с использованием аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. ВИЧ-1-антигенные свойства искусственного иммуногена TCI в составе химерных белков были продемонстрированы в ИФА с использованием панели ВИЧ-1 позитивных сывороток и методом иммуноблоттинга с МКА 29F2 и 30А6, которые связываются с эпитопом EPFRDYVDRFYKTL, локализованным как в белке р24 ВИЧ-1, так и в белке TCI. Таким образом была доказана иммунохимическая специфичность продукта экспрессии синтезированного гена (рисунок 5.27).

Кроме того, была показана и специфическая иммуногенность рекомбинантного белка TRN-TCI: сыворотка кролика, иммунизированного этим белком, взаимодействовала не только с обоими рекомбинантными белками TRN-TCI и GST-TCI, но и с природным белком р24 ВИЧ-1 (Бажан и др., 2004а,б; Vazhan *et al.*, 2004).



- 1 – лизат индуцированных клеток *E. coli* XL1-blue(pGEX-TCI);
- 2 – очищенный белок р24 ВИЧ-1;
- 3 - лизат индуцированных клеток *E. coli* XL1-blue(pET-TCI);
- 4 – лизат клеток *E. coli* XL1-blue без плазмиды;
- 5 – маркерные белки: 97,4 кДа, 66,2 кДа, 45,0 кДа, 31,0 кДа, 21,5 кДа, 14,0 кДа.

Рисунок 5.27 – Анализ рекомбинантных химерных белков, содержащих TCI. 13 % ПААГ, электрофореграмма (а). Иммуноблоттинг с использованием МКА к белкам р24 ВИЧ-1 и TCI (б)

5.7.4 Клонирование гена TCI в векторных плаزمидах, обеспечивающих его экспрессию в эукариотических клетках: получение плазмид pBK-RSV-TCI и pcDNA-TCI

Совершенно необходимым условием создания ДНК-вакцины является способность целевого гена экспрессироваться в эукариотической системе. Поэтому дальнейшее продолжение работы заключалось в выборе оптимального вектора, способного обеспечить эффективную экспрессию иммуногена TCI в клетках эукариот, и конструирование на его основе рекомбинантной плазмиды (плазмид) для последующего использования в качестве кандидатной ДНК-вакцины против ВИЧ-1.

Как отмечалось в разделе 3 «Обзор литературы», самыми многообещающими векторами в этом плане являются вектора, направляющие экспрессию целевых генов под контролем промотора из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса (RSV LTR) либо предраннего промотора цитомегаловируса (CMV). Поэтому было принято решение получить обе плазмидные конструкции, содержащие под контролем вышеназванных промоторов синтезированный нами ген TCI.

Итак, последовательность гена TCI была клонирована в эукариотическом фагмидном векторе pBK-RSV (Stratagen, США), который позволяет экспрессировать ген TCI в эукариотических клетках. Как уже отмечалось, экспрессия гена TCI в составе вектора pBK-RSV направляется промотором LTR вируса саркомы Рауса, а эффективная терминация транскрипции и полиаденилирование обеспечивается наличием polyA-участка SV40.

Для того чтобы экспрессия целевого гена TCI была наиболее оптимальной, перед стартовым ATG-кодоном был сформирован консенсусный Kozak-мотив для оптимизации трансляции информационной РНК TCI. С этой целью векторную плазмиду обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *SalI* и выделяли векторную часть, синтетический ген TCI получали в виде *FokI-SalI*-фрагмента из ранее сконструированной плазмиды pFH-TCI и лигировали их совместно с коннектором, составленным из двух олигонуклеотидов (рисунок 5.28). Коннектор содержит Kozak-мотив и «липкие» концы, комплементарные таковым вектора и гена, полученным в результате действия рестриктаз *NheI* и *FokI*. Структура коннектора приведена на рисунке 5.28.

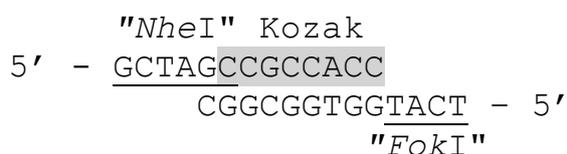


Рисунок 5.28 – Структура *NheI-FokI* коннектора для встройки гена TCI под контроль промотора RSV LTR

В результате скрининга бактериальных клонов была получена целевая рекомбинантная плазмида pBK-RSV-TCI. На рисунке 5.29 приведена полная нуклеотидная последовательность гена TCI с фланкирующими районами в составе этой плазмиды, а также а/к последовательность кодируемого этим геном белка. Отмечены границы блоков, на которые предварительно был разбит ген согласно разработанной схеме синтеза, выделены значимые участки рестрикции и другие структурные элементы. На рисунке 5.30 показана структура целевой рекомбинантной плазмиды pBK-RSV-TCI.

Получение альтернативной конструкции осуществляли параллельно с вышеописанным экспериментом по той же схеме. Следует подчеркнуть, что при таком способе клонирования был удален протяженный плазмидный фрагмент, содержащий ген *lacZ E. coli*, присутствие которого в целевой плазмиде лишено смысла. С этой целью мы предварительно в плазмиде pсDNA3.1/*myc-His(-)/lacZ* инвертировали *ApaI*-фрагмент, содержащий ген *lacZ* с прилегающими уникальными участками рестрикции. В результате получили сайты *NheI*, *ApaI*, *HindIII*, *BamHI* перед инвертированным геном *lacZ* и *NotI*, *XhoI*, *XbaI*, *ApaI* вслед за ним, что обеспечивает большой выбор вариантов клонирования целевых генов, причем независимо от удаления гена *lacZ* его экспрессия будет невозможной в эукариотических клетках. В этом эксперименте векторная часть инвертированной плазмиды pсDNA3.1/*myc-His(-)/lacZ* представляла собой *NheI-XhoI*-фрагмент, тогда как и ген TCI, и коннектор были теми же. Таким образом, одновременно была получена вторая целевая плазмида pсDNA-TCI, которая схематично представлена на рисунке 5.30.

NheI **Kozak**
gctagccgccacc

10 20 30 40 50 60

↓ ← **начало гена TCI (начало блока I)**
ATGAAAATTTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAAGAAAAATATAAAATTTAAAACATATAGTATGG
 fM K I R L R P G G K K K Y K L K H I V W
 GCAAGCAGGGAGSTAGAACGATTCGCAGTTAATGGATCAGAAGAACTTAGATCATTTATAT
 A S R E L E R F A V N G S E E L R S L Y
 AATACAGTAGCAACCCSTCCAGGCCATATCASCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTA
 N T V A T L Q A I S P R T L N A W V K V
 GTAATCCACSTATCCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTTAAAT
 V N P P I P V G E I Y K R W I I L G L N
 AAAATAGTAAGAATGTATAGCCSTACCAGCATTTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAAAGAA
 K I V R M Y S P T S I L D I R Q G P K E

конец блока I → ↓ ← **начало блока II**

CCSTTTAGAGACSTATGTAGACCGGTTTCTATAAAAACSTAAAGAGCCGAGCAAGCTACAGTC
P F R D Y V D R F Y K T L R A E Q A T V
 TATTATGGGGTACSTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTSTATTTTGTGCATCAGATGCT
 Y Y G V P V W K E A T T T L F C A S D A
 AAAGCATATAAATTAACCCCACTCTGTGTTAGTTTAAAGTTTAAATTTGTGGAGGAGAATTT
 K A Y K L T P L C V S L S F N C G G E F
 TTCTACAGAATAAAACAAATTATAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCC
 F Y R I K Q I I N M W Q E V G K A M Y A
 CCTCCCATCAGTGGACAAATTAGATACSTAAAGGATCAACAGCTCCTGAGCTTGCTCAAT
 P P I S G Q I R Y L K D Q Q L L S L L N
 GCCACAGACATAGCAGTAGCTGAGGGGACAGATAGGGTTATAGAAGTAGTACAAGGAGCT
 A T D I A V A E G T D R V I E V V Q G A
 TATAGCSTATTCCGCACATACSTAGAAGAATAAGACAGGGCTTGAAAGGATTTTGCTA
 Y R A I R H I P R R I R Q G L E R I L L

конец блока II → ↓ ← **начало блока III**

ATCACTCTCTGGCAACGACCCCTCGTTCGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGGAAA
 I T L W Q R P L V E I C T E M E K E G K
 ATTTCAAAAATTTGGGCTACAGTACTCGATGTGGGTGATGCATATTTTTCAGTTTGGAAA
 I S K I G P T V L D V G D A Y F S V W K
 GGATCACCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAAACAA
 G S P A I F Q S S M T K I L E P F R K Q
 AATCCAGACATAGTTATSTATCAATACATGGACGATTTGTTTCCAGTCACACCTCAGGTA
 N P D I V I Y Q Y M D D L F P V T P Q V
 CCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAG
 P L R P M T Y K A A V D L S H F L K E K
 GGGGGACTGGAAGGGSTAATTCACSTCCCAACGAAGACAAGATATCSTTGATCTGTGGATC
 G G L E G L I H S Q R R Q D I L D L W I
 TACCACACACAAGGCTACTTCCSTGATTGGCAGAACTACACACCAGGACCAGGGATCAGA
 Y H T Q G Y F P D W Q N Y T P G P G I R

конец гена TCI (конец блока III) → ↓

TATCCACTGACSTTTGGCTGGTGCTACAAGCTAGTACCAGGGTTACCAATGAgtcgac
 Y P L T F G W C Y K L V P **PspEI** stop **SalI**

EPFRDYVDRFYKTL – эпитоп белка p24 ВИЧ-1, содержащийся и в белке TCI, связывающийся с МКА 29F2 и 30A6.

Рисунок 5.29 – Нуклеотидная и кодируемая а/к последовательности гена (белка)

TCI в плаزمидах pBK-RSV-TCI и pсDNA-TCI с фланкирующими районами.

Пояснения в тексте

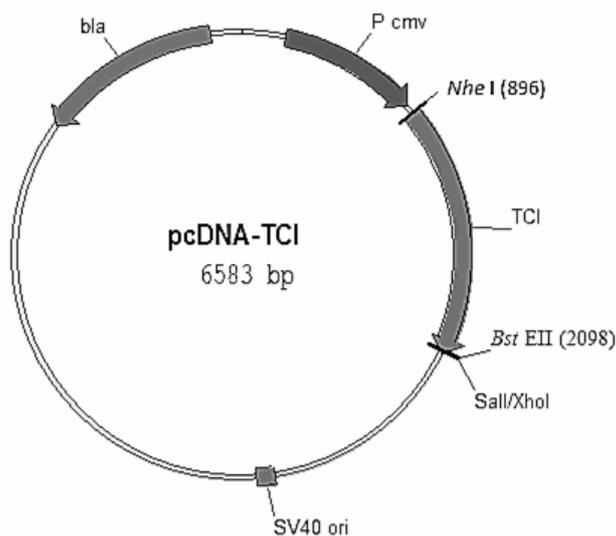
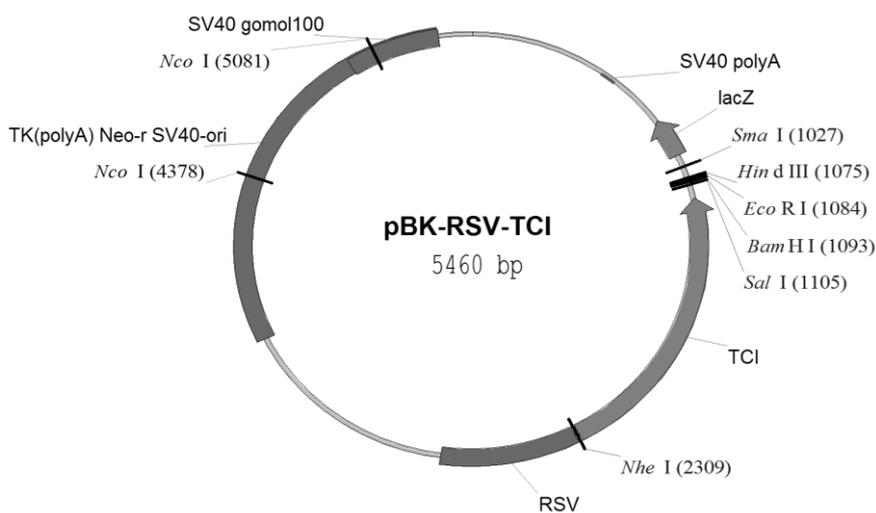


Рисунок 5.30 – Структура рекомбинантных плазмид pBK-RSV-TCI и pcDNA-TCI

Итак, мы оптимизировали рекомбинантные молекулы ДНК для эффективной экспрессии гена TCI в эукариотической системе, поставив ген под контроль сильных вирусных промоторов, снабдив их Kozak-последовательностью для оптимизации трансляции информационной РНК TCI и удалив нежелательные фрагменты бактериального генома.

Результаты наших совместных с коллегами работ в этом направлении защищены тремя патентами Российской Федерации (Бажан и др., 2002; Карпенко и др., 2003, 2006). Вакцина “КомбиВИЧвак”, содержащая В- и Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1, а также рекомбинантную плазмиду pcDNA-TCI в качестве

ДНК-вакцинного компонента, успешно прошла доклинические испытания, продемонстрировав неплохой вакцинный потенциал, затем I фазу клинических испытаний на добровольцах, по результатам которой допущена к проведению II фазы клинических испытаний.

5.8 Создание генетических конструкций с оптимизированной структурой генов полиэпитопных иммуногенов для высокоэффективной индукции CTL-ответов

5.8.1 Общий дизайн полиэпитопных иммуногенов. Краткая характеристика

Необходимо отметить, что, хотя при конструировании иммуногена TSI и использовались оптимально подобранные эпитопы, его структура не оптимизировалась. Поэтому следующая задача нашей работы состояла в разработке рациональных стратегий конструирования рекомбинантных ДНК, кодирующих полиэпитопные иммуногены, структура которых оптимизирована для индукции высоких уровней ответов CD8+ CTL с целью создания новых кандидатных эффективных и безопасных вакцин против ВИЧ-1.

Известно, что CD8+ CTL распознают вирусные белки-антигены, синтезируемые внутри клетки, не в виде полноразмерных белков, а в виде коротких пептидов длиной 9-12 а/к, ассоциированных с молекулами МНС-I класса. Эти короткие пептиды представляют собой антигенные эпитопы, появляющиеся из эндогенно синтезируемых вирусных белков в результате протеасом-опосредуемого процессинга. Затем они переносятся в просвет эндоплазматического ретикулума (ER) при помощи транспортных белков TAP (*transporter associated with antigen processing*), где связываются с вновь синтезированными молекулами МНС-I класса.

Для обеспечения высоких значений CD8+ CTL-ответов необходимо соблюдение некоторых условий, таких как высокий уровень экспрессии целевых генов, эффективный протеасом-опосредуемый процессинг кодируемых ими белков-иммуногенов, транспорт образовавшихся пептидных эпитопов в ER, эффективное представление антиген-презентирующими клетками (АПК) комплексов [эпитоп/МНС-I], образованных пептидами с молекулами МНС-I класса.

Для решения этой многофакторной задачи, во-первых, были отобраны эпитопы, обладающие высоким значением времени полужизни комплексов [эпитоп/МНС-I класса], во-вторых, при трансляции а/к последовательности в нуклеотидную были использованы кодоны высокоэкспрессируемых генов человека (Andre *et al.*, 1998; zur Megede *et al.*, 2000), в-третьих, для нацеливания на протеасому мы решили использовать слияние с целевым геном последовательности, кодирующей убиквитин (Ub), причем, в двух вариантах: как с 3'-конца гена полиэпитопной конструкции (Velders *et al.*, 2001), так и с 5'-конца этого гена (Varshavsky *et al.*, 2000), в-четвертых, для облегчения протеасомного расщепления было решено использовать соответствующие фланкирующие детерминанты а/к спейсеры (Ishioka *et al.*, 1999; Kuttler *et al.*, 2000; Livingston *et al.*, 2001) и мотивы узнавания для ТАР с целью эффективного транспорта в ER для связывания с молекулами МНС-I (Uebel *et al.*, 1999).

Таким образом, для надлежащей проверки вклада тех или иных факторов в вакцинный потенциал генетических конструкций необходимо было получить девять различных рекомбинантных плазмид в качестве кандидатных ДНК-вакцин. Рассмотрим иммуногены, которые должны кодировать эти плазмиды.

C1 (конструкция 1) – простое объединение эпитопов в "бусоподобную" структуру, когда СТЛ-эпитопы просто соединяются вместе без фланкирующих остатков;

C2 – разделение соседних эпитопов специфическими а/к, предназначенными для оптимизации протеасомного освобождения детерминант;

C3 – разделение соседних эпитопов а/к, формирующими мотивы распознавания для ТАР наряду с мотивами протеасомного процессинга.

Каждая из этих конструкций может быть генетически слита с геном Ub как с 3'-конца гена полиэпитопной конструкции, так и с его 5'-конца:

C1-Ub, C2-Ub, C3-Ub и Ub-C1, Ub-C2, Ub-C3.

Итак, совершенно очевидно, что простой синтез такого количества достаточно протяженных генетических конструкций является весьма трудоемкой, дорогостоящей и длительной процедурой. Мы приняли решение оптимизировать процесс получения целевых конструкций и разработать относительно простую и удобную схему решения поставленной задачи.

5.8.2 Общий дизайн, стратегия клонирования и кодирования рекомбинантных плазмид, направляющих синтез полиэпитопных СТЛ-иммуногенов

На первом этапе решения поставленной задачи нам следовало определиться с эукариотическим экспрессионным вектором, на основе которого надлежало получить целевые полиэпитопные генетические конструкции. Результаты, полученные нами ранее и описанные выше, по изучению вакцинного потенциала различных рекомбинантных плазмид, направляющих в эукариотических клетках синтез иммуногена ТС1, утвердили нас в мысли использовать для этого в качестве основы проверенную и хорошо себя зарекомендовавшую плазмиду pсDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ* (Invitrogen, США), подвергнутую вышеописанной реконструкции (глава 5.7.4).

Основная идея схемы конструирования рекомбинантных плазмид состояла в универсальности клонирования всех целевых генов, причем синтезировать необходимо лишь три генетические конструкции: С1, С2 и С3. Однако параллельно на базе вышеназванной плазмиды предстояло сконструировать три новые векторные плазмиды для клонирования этих искусственных генов. Универсальность в известной мере заключалась в использовании одних и тех же сайтов клонирования во всех генетических вариантах. Такая схема позволяла клонировать полученные искусственные гены в составе одного из векторов и, убедившись по результатам секвенирования в соответствии нуклеотидной последовательности генетических конструкций заданной, просто реклонировать соответствующие фрагменты ДНК в двух других векторах с получением целевого набора из девяти рекомбинантных плазмид, направляющих синтез полиэпитопных СТЛ-иммуногенов.

Таким образом, принимая во внимание нуклеотидные последовательности всех искусственных генов и исходной векторной плазмиды, составив их полные рестриктные карты, мы определились с участками узнавания для эндонуклеаз рестрикции, которые намеревались использовать для клонирования синтетических фрагментов ДНК как при конструировании серии векторных плазмид, так и целевых рекомбинантных плазмид, экспрессирующих гены полиэпитопных СТЛ-иммуногенов. При выборе участков узнавания для рестриктаз, кроме низкой частоты встречаемости в различных геномах, мы руководствовались также

надежностью гидролиза в случае, когда сайт находится на концах молекулы ДНК, и коммерческой доступностью фермента. Общие для всех генов вспомогательные элементы мы также решили включить в состав серии векторов.

Итак, на рисунках 5.31 – 5.33 подробно приведены нуклеотидные и кодируемые ими а/к последовательности встроенных в векторную плазмиду синтетических фрагментов по участкам рестрикции *HindIII-XhoI*. При этом были удалены протяженные фрагменты генома *E. coli*, как подробно изложено выше в случае конструирования рекомбинантной плазмиды pсDNA-TCI (глава 5.7.4). Таким образом, векторная часть всех описанных здесь плазмид практически идентична таковой плазмиды pсDNA-TCI. Этот факт позволял нам надеяться, что уровень экспрессии целевых иммуногенов будет достаточно высоким, как это было в случае искусственного гена TCI в составе вышеназванной плазмиды, обладающей хорошим вакцинным потенциалом.

Стратегия кодирования во всех векторных плазидах этой серии сходна: экспрессия генов направляется CMV-промотором, эффективная трансляция целевых информационных РНК обеспечивается сформированной нами консенсусной последовательностью Kozak, все они содержат последовательности, кодирующие НА- и Gag-эпитопы (на 5'- и 3'-конце генов полиэпитопных иммуногенов соответственно), для мониторинга экспрессии и метаболической стабильности целевых иммуногенов. Кроме того, плазмиды pV2 и pV3 содержат также Ub-кодирующую последовательность для генетически присоединяемого убиквитина к N- либо C-концу целевых полиэпитопных конструкций. Все рекомбинантные плазмиды содержат терминирующий кодон трансляции, обеспечивающий синтез строго заданной полипептидной цепи без каких-либо дополнительных а/к. Все гены полиэпитопных иммуногенов клонируются в любом векторе (pV1, pV2, pV3) по *KpnI-PspEI*-участкам рестрикции.

Таким образом, была разработана оптимальная схема получения большого набора рекомбинантных плазмид, обеспечивающих синтез различных вариантов иммуногенов с целью оценки некоторых аспектов их вакцинного потенциала, а именно для изучения влияния убиквитинзависимой презентации эпитопов по пути МНС-I класса, индуцирующей ответы CD8+ CTL, на иммуногенность.

5.8.3 Схемы конструирования экспрессионных векторных плазмид pV1, pV2 и pV3, предназначенных для клонирования полиэпитопных CTL-иммуногенов

Как было отмечено выше, базовой плазмидой, на основе которой проводилось конструирование всех экспрессионных векторов, являлась плазида pсDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ*, предварительно подвергнутая небольшой реконструкции, а именно: был инвертирован *ApaI*-фрагмент (глава 5.7.4).

На первом этапе конструировали векторную плазмиду pV2 путем клонирования синтетического ПЦР-фрагмента ДНК, который получали методом поэтапной достройки пяти пар перекрывающихся олигонуклеотидных праймеров в следующей последовательности (рисунок 5.34 и таблица 5.3):

- (V2-5F)+(V2-6R) – центральная часть целевого фрагмента;
- (V2-4F)+(V2-7R) – удлинение центрального фрагмента с обоих концов;
- (V2-3F)+(V2-8R) – второй этап удлинения фрагмента;
- (V2-2F)+(V2-9R) – третий этап удлинения фрагмента;
- (V2-1F)+(V2-10R) – завершающий этап – получение целевого фрагмента.

Целевой ПЦР-фрагмент подвергали действию рестриктаз *HindIII* и *XhoI* и клонировали, как отмечено выше, в составе вышеназванной плазмиды по участкам рестрикции *HindIII*-*XhoI*. Векторная плазида pV2 в дальнейшем служила матрицей в ПЦР для конструирования других плазмид этой серии – pV1 и pV3.

Для получения плазмиды pV1 на матрице плазмиды pV2 с помощью праймеров (V1-1F)+(V2-10R) методом ПЦР синтезировали целевой фрагмент ДНК, который затем гидролизовали и клонировали аналогично вышеописанному (рисунок 5.35).

Плазмиду pV3 получали, используя уже сконструированные плазмиды pV1 и pV2. Используя плазмиду pV2 в качестве матрицы и праймеры (V3-2F)+(V3-3R), методом ПЦР синтезировали и выделяли фрагмент ДНК длиной 279 п.н., кодирующий последовательность Ub и часть Gag-эпитопа (рисунок 5.36).

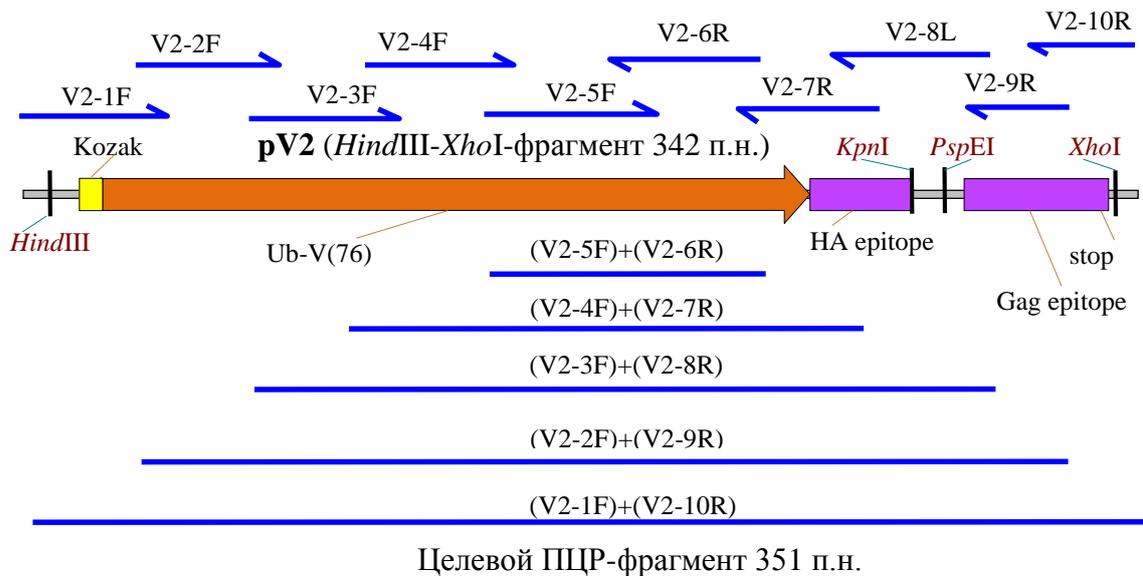


Рисунок 5.34 – Схема синтеза *Hind*III-*Xho*I-фрагмента векторной плазмиды pV2. Над физической и рестриктной картой фрагмента показано расположение пяти пар перекрывающихся праймеров. Под картой схематично изображено поэтапное удлинение ПЦР-фрагмента

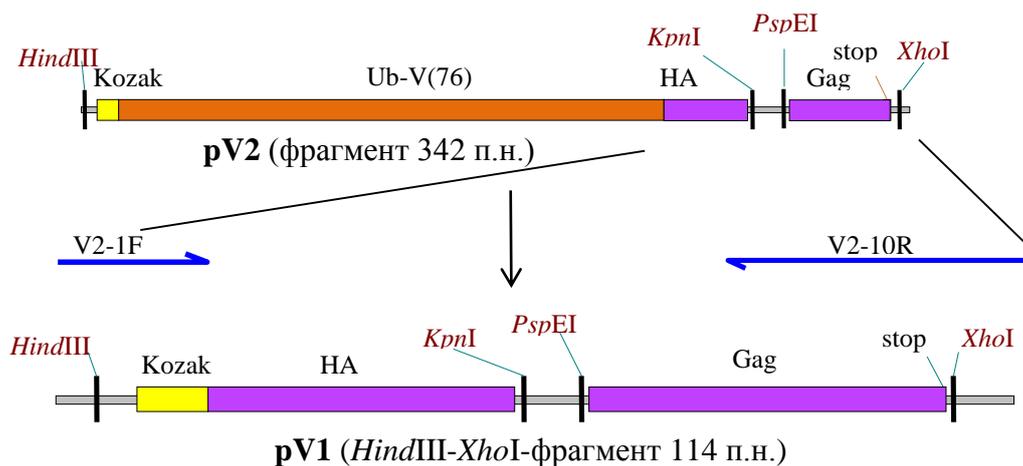


Рисунок 5.35 – Физическая и рестриктная карта, схема синтеза методом ПЦР *Hind*III-*Xho*I-фрагмента векторной плазмиды pV1 на матрице плазмиды pV2

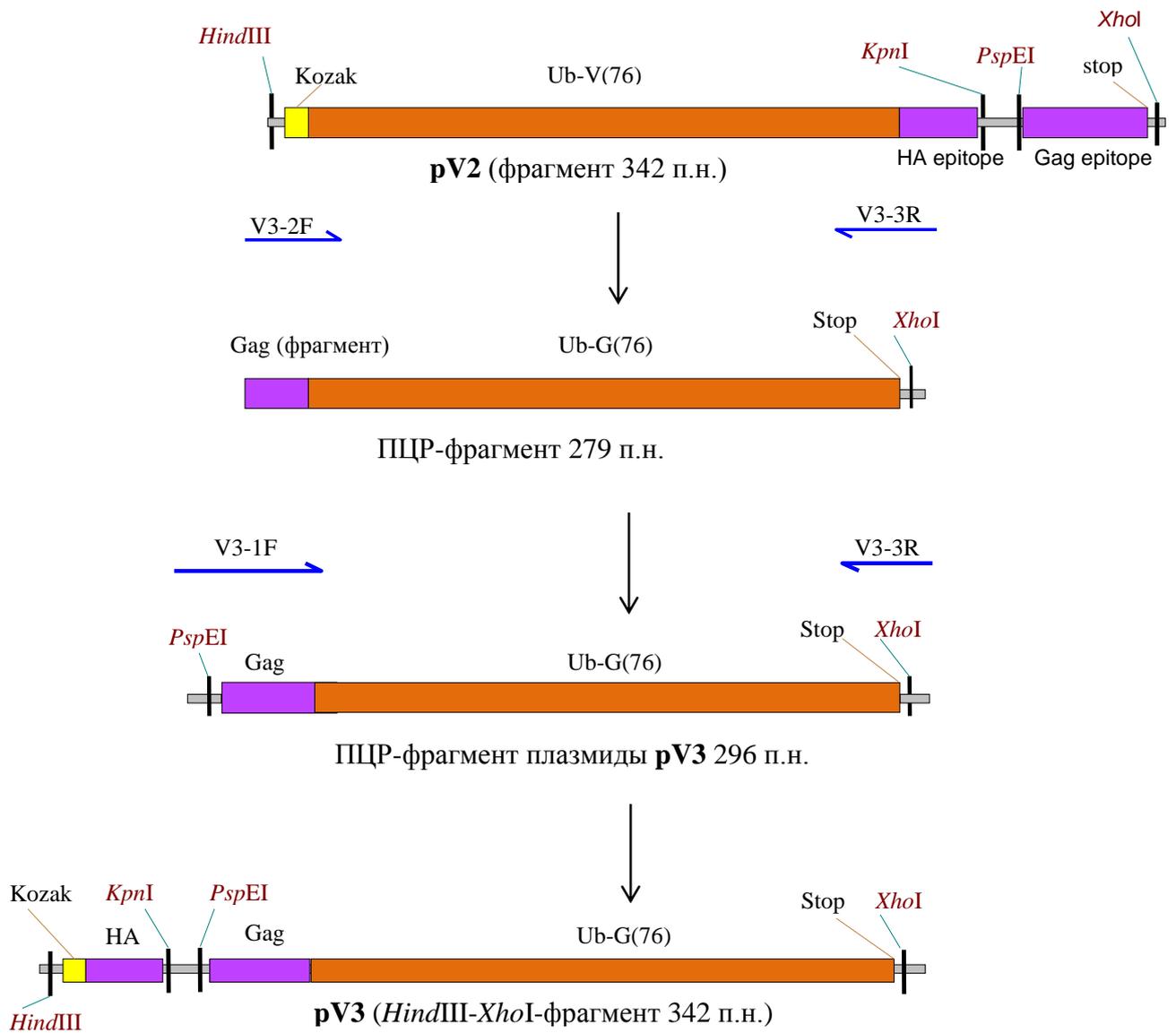


Рисунок 5.36 – Физическая и рестриктная карта *Hind*III-*Xho*I-фрагмента векторной плазмиды pV3 (внизу) и схема поэтапного синтеза методом ПЦР *Psp*EI-*Xho*I-фрагмента векторной плазмиды pV3 на матрице плазмиды pV2

Таблица 5.3 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для конструирования векторных плазмид pV1, pV2 и pV3

№	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Обозначение	Длина (нукл.)
1	CCCAAAGCTTGCCGCCACCATGTACCCCTACGACGTGCCCG	V1-1F	41
2	CCCAAAGCTTGCCGCCACCATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACCGGCAAGACC	V2-1F	55
3	ACCCTGACCGGCAAGACCATCACCCCTGGAGGTGGAGCCCTCCGACACCATCGAGA	V2-2F	55
4	CCCTCCGACACCATCGAGAACGTGAAGGCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGGCATCCC	V2-3F	56
5	AGGACAAGGAGGGCATCCCCCGACCAGCAGCGCCTGATCTTCGCCGGCAAGCAG	V2-4F	56
6	ATCTTCGCCGGCAAGCAGCTGGAGGACGGCCGCACCCTGTCCGACTACAACATCC	V2-5F	55
7	GGCGCAGCACCAGGTGCAGGGTGGACTCCTTCTGGATGTTGTAGTCGGACAGGGT	V2-6R	55
8	GTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGCGCACGCCGCGCAGGCGCAGCACCAGGTGC	V2-7R	55
9	GGAAGGGCTCGGTCACCTGCAGCCAGGTACCAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGG	V2-8R	55
10	GTAGAAGCGGTCCACGTAGTCGCGGAAGGGCTCGGTCACCT	V2-9R	41
11	AAGGGCTCGAGTTACAGGGTCTTGTAGAAGCGGTCCACGTAGTCG	V2-10R	45
12	CTGCAGGTGACCGAGCCCTTCCGCGACTACGTGGACCGCTTCTACAAGACCCTGATG	V3-1F	57
13	TTCTACAAGACCCTGATGCAGATCTTCGTGAAGACCC	V3-2F	37
14	AAGGGCTCGAGTTAGCCGCCGCGCAGGCGCAGCACC	V3-3R	36

Примечание: V1, V2, V3 – праймеры для синтеза векторных плазмид pV1, pV2 и pV3 соответственно (праймер V2-10R использовался при сборке векторов pV1 и pV2). F – прямые (верхние) праймеры; R – обратные (нижние).

Затем этот фрагмент служил матрицей следующего этапа ПЦР с праймерами (V3-1F)+(V3-3R), вследствие чего он был удлинен с 5'-конца с получением целевого фрагмента, который гидролизовали рестриктазами *PspEI* и *XhoI* и клонировали в векторе pV1 по этим же участкам рестрикции. В результате была получена плаزمида pV3.

Таким образом, благодаря оптимизации схемы получения набора векторных плазмид, после конструирования плазмиды pV2 с помощью 10 рассчитанных перекрывающихся праймеров для получения на ее основе плазмиды pV1 нам понадобился всего один дополнительный праймер, для создания плазмиды pV3 – три праймера. Полный список использованных для этой цели праймеров приведен в таблице 5.3.

5.8.4 Синтез и клонирование генов полиэпитопных CTL-иммуногенов в экспрессионных векторных плаزمидях pV1, pV2 и pV3

После разработки детальной схемы конструирования целевых рекомбинантных плазмид, мы определились не только с дизайном полипептидных цепей иммуногенов, но и утвердили окончательную структуру кодирующих их генов. Результаты этого этапа работы приведены на рисунке 5.37.

Кроме набора отобранных CTL-детерминант, все полиэпитопные иммуногены содержат так называемый универсальный пептид 'PADRE' (AKFVAAWTLKAAA), предназначенный для усиления CD8+ CTL-ответов благодаря способности вызывать ответы CD4+ Т-клеток в ассоциации с множественными HLA-DR алломорфами, а также с молекулами I-Ab, которые экспрессируются у трансгенных мышей (Alexander *et al.*, 1994). Эпитоп SIINFEDL из овальбумина был включен в состав полиэпитопных как С-концевой эпитоп конструкций для мониторинга экспрессии и иммуногенности вакцинных конструкций с помощью антител 25-D1.16, специфичных к комплексам [Kb-SIINFEDL] (Porgador *et al.*, 1997).

В соответствии с разработанной нами схемой все целевые гены, кодирующие HLA-A2-рестриктированные поли-CTL-эпитопные конструкции С1, С2 и С3, синтезировались с использованием частично перекрывающихся олигонуклеотидов-праймеров методом ПЦР, дизайн которых и был проведен на следующем этапе работы (рисунок 5.38, таблица 5.4).

Полиэпитопная конструкция C1 – простое объединение пептидов в "бусоподобную" структуру

YPYDVPDYAWYLAKFVAAWTLKAAASLYNTVATLALVEICTEMVIYQYMDDLILKEPVHGVQMHEDIISLKLTPLCVTLRLRDLILLIVVLEWRFDSRLRILQQL
LFIVLAEAMSQVRGPGRAFVTIISIINFEKLQVTEPFRDYVDRFYKTL

Структура гена C1

KpnI

TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC**GGTACC**TGGCCAAGTTCGTGGCCGCCTGGACCCTGAAGGCCGCCGCCTCCCTGTACAACACCGTGGCCACCCTGGC
CCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGTGATCTACCAGTACATGGACGACCTGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGCAGATGCACGAGGACATCATCTCCC
TGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGACCCTGCGCCTGCGCGACCTGCTGCTGATCGTGGTGTGCTGGAGTGGCGCTTCGACTCCCGCCTGCGCATCCTGCAGCAGCTG
CTGTTTCATCGTGCTGGCCGAGGCCATGTCCCAGGTGCGCGGCCCGGCCGCGCCTTCGTGACCATCTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGCA**GGTGACC****GAGCC**
CTTCCGCGACTACGTGGACCGCTTCTACAAGACCCTG *PspEI*

Полиэпитопная конструкция C2 – Разделение соседних пептидов а/к для оптимизации протеасомного освобождения детерминант

YPYDVPDYAWYLFKFLAKFVAAWTLKAAAADSLYNTVATLALVEICTEMADVIYQYMDDLA¹ILKEPVHGVAD²QMHEDIISLKLTPLCVTLRLRDLILLIVAD³VLE
WRFDSRLRILQQLLFI⁴AVLAEAMSQVAD⁵RGPGRAFVTIISIINFEKLQVTEPFRDYVDRFYKTL

Структура гена C2

KpnI

TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC**GGTACC**TGAAGTTCCTGGCCAAGTTCGTGGCCGCCTGGACCCTGAAGGCCGCCGCCGACTCCCTGTACAACAC
CGTGGCCACCCTGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGCCGACGTGATCTACCAGTACATGGACGACCTGGCCATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGG
CCGACCAGATGCACGAGGACATCATCTCCCTGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGACCCTGCGCCTGCGCGACCTGCTGCTGATCGTGGCCGACGTGCTGGAGTGG
CGCTTCGACTCCCGCCTGCGCATCCTGCAGCAGCTGCTGTTTCATCGCCGTGCTGGCCGAGGCCATGTCCCAGGTGGCCGACCGCGGCCCGGCCGCGCCTTCGT
GACCATCTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGCA**GGTGACC****GAGCCCTTCCGCGACTACGTGGACCGCTTCTACAAGACCCTG** *PspEI*

Полиэпитопная конструкция С3 – Разделение соседних пептидов алк, обеспечивающими мотивы распознавания для ТАР

YPYDVPDYA WYLKFLRQY AKFVAAWTLKAAA NIW SLYNTVATL RIW ALVEICTEM ADRIW VIYQYMDDL ADKQW ILKEPVHGV ADROW QMHEDIISL NIW KLT
PLCVTL RIW RLRDLLLLIV ADRIW VLEWRFD SRL ADNQY RILQQLLFI AKRW VLAEAMSQV ADNIW RGPGRFVTI NIYSIINFEKLQVTEPFRDYVDRFYKTL

Структура гена С3

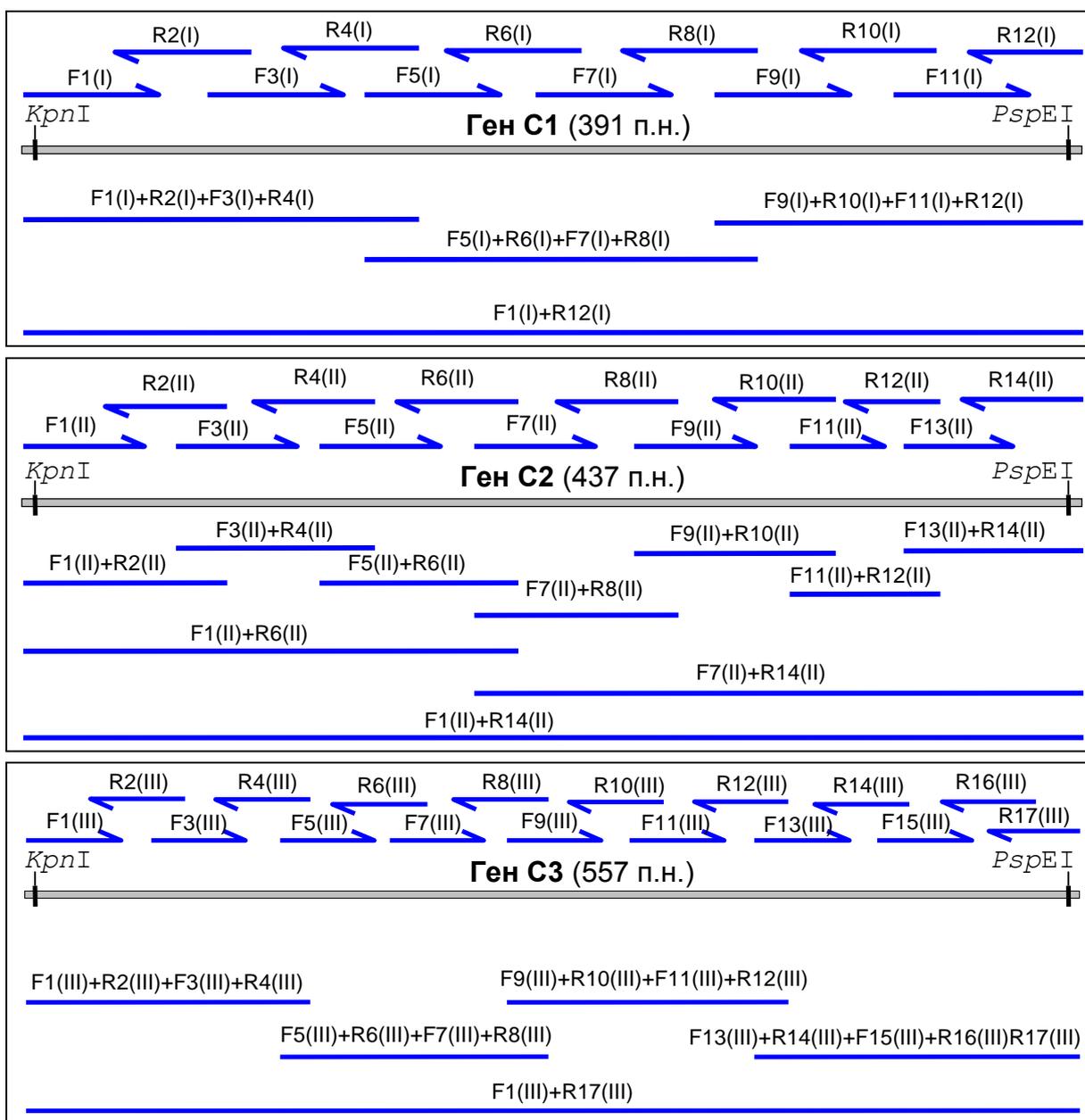
KpnI

TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC **GGTACC** TGAAGTTCCTGCGCCAGTACGCCAAGTTCGTGGCCGCCTGGACCCTGAAGGCCGCCCAACATCTGGTCCCTGTACAACACCGTGGCCACCCTGCGCATCTGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGCCGACCGCATCTGGGTGATCTACCAGTACATGGACGACCTGGCCGACAAGCAGTGGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGGCCGACCGCCAGTGGCAGATGCACGAGGACATCATCTCCCTGAACATCTGGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGACCCTGCGCATCTGGCGCCTGCGCGACCTGCTGCTGATCGTGGCCGACCGCATCTGGGTGCTGGAGTGGCGCTTCGACTCCCGCCTGGCCGACAAACAGTACCGCATCCTGCAGCAGCTGCTGTTTCATCGCCAAGCGCTGGGTGCTGGCCGAGGCCATGTCCCAGGTGGCCGACAACATCTGGCGCGCCCCGGCCCGCCCTTCGTGACCATCAACATCTACTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGCA **GGTGACC** GAGCCCTTCGCGACTACGTGGACCGCTTCTACAAGACCCTG

PspEI

Выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в генах участки узнавания для эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *PspEI*, по которым проводилась встройка генов в экспрессионные векторные плазмиды pV1, pV2, pV3. Последовательности, кодирующие HA-эпитоп (YPYDVPDYA) и Gag-эпитоп (EPFRDYVDRFYKTL), выделенные большими блоками с черной заливкой, включены в состав вышеназванных векторных плазмид. Эпитоп SIINFEKL (выделен большим блоком с серой заливкой) включен как С-концевой эпитоп для мониторинга экспрессии и иммуногенности вакцинных конструкций.

Рисунок 5.37 – Дизайн поли-CTL-эпитопных иммуногенов (С1, С2, С3) и кодирующих их генов



Для сборки гена C1 использовали 12 олигонуклеотидных праймеров, C2 – 14 праймеров, C3 - 17 праймеров. В структуре концевых олигонуклеотидов были сформированы сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *PspEI* на 5'- и 3'-концах соответственно, для клонирования в составе любой из векторных плазмид – pV1, pV2, pV3.

Рисунок 5.38 – Схема синтеза генов, кодирующих полиэпитопные конструкции C1, C2 и C3

Таблица 5.4 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для конструирования векторных плазмид pV1, pV2 и pV3

№	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Обозначение	Длина (нукл.)
Ген C1			
1	GCCTGGTACCTGGCCAAGTTCGTGGCCGCCTGGACCCCTGAAGGCCGCCGC	F1(I)	50
2	CAGGGCCAGGGTGGCCACGGTGTGTACAGGGAGGCGGCGCCCTTCAGGG	R2(I)	50
3	GGCCACCCTGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGTGATCTACCAGT	F3(I)	50
4	GGTCCTTCAGGATCAGGTCGTCCATGTACTGGTAGATCACCATCTCGGT	R4(I)	50
5	GACCTGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGCAGATGCACGAGGACAT	F5(I)	50
6	ACGCACAGGGGGTTCAGCTTCAGGGAGATGATGTCCTCGTGCATCTGCAC	R6(I)	50
7	CTGACCCCCCTGTGCGTGACCCCTGCGCCTGCGCGACCTGCTGCTGATCGT	F7(I)	50
8	GCAGGCGGGAGTCGAAGCGCCACTCCAGCACCACGATCAGCAGCAGGTCG	R8(I)	50
9	TTCGACTCCCGCCTGCGCATCCTGCAGCAGCTGCTGTTTCATCGTGCTGGC	F9(I)	50
10	GGCCGGGGCCGCGCACCTGGGACATGGCCTCGGCCAGCACGATGAACAGC	R10(I)	50
11	GTGCGCGGCCCGGCCGCGCCTTCGTGACCATCTCCATCATCAACTTCGA	F11(I)	50
12	GCTCGGTCACCTGCAGCTTCTCGAAGTTGATGATGGAGATGG	R12(I)	42
Ген C2			
13	CGCCTGGTACCTGAAGTTCCTGGCCAAGTTCGTGGCCGCCTGGACCCCTGA	F1(II)	50
14	ACGGTGTGTACAGGGAGTCGGCGGCGGCGGCCCTTCAGGGTCCAGGCGGC	R2(II)	50
15	CGACTCCCTGTACAACACCGTGGCCACCCTGGCCCTGGTGGAGATCTGCA	F3(II)	50
16	CATGTACTGGTAGATCACGTCGGCCATCTCGGTGCAGATCTCCACCAGGG	R4(II)	50
17	CCGACGTGATCTACCAGTACATGGACGACCTGGCCATCCTGAAGGAGCCC	F5(II)	50
18	TCCTCGTGCATCTGGTCGGCCACGCCGTGCACGGGCTCCTTCAGGATGGC	R6(II)	50
19	CGACCAGATGCACGAGGACATCATCTCCCTGAAGCTGACCCCCCTGTGCG	F7(II)	50
20	ACGATCAGCAGCAGGTCGCGCAGGCGCAGGGTCACGCACAGGGGGTTCAG	R8(II)	50
21	CGACCTGCTGCTGATCGTGGCCGACGTGCTGGAGTGGCGCTTCGACTCCC	F9(II)	50
22	CGATGAACAGCAGCTGCTGCAGGATGCGCAGGCGGGAGTCGAAGCGCCAC	R10(II)	50
23	CAGCAGCTGCTGTTTCATCGCCGTGCTGGCCGAGGCCATG	F11(II)	39
24	GGGCCGCGGTTCGGCCACCTGGGACATGGCCTCGGCCAGC	R12(II)	39
25	GGCCGACCGCGGCCCGGCCGCGCCTTCGTGACCATCTCCATCAT	F13(II)	45
26	GCTCGGTCACCTGCAGCTTCTCGAAGTTGATGATGGAGATGGTCACGAAG	R14(II)	50

Таблица 5.4 – (окончание)

№	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Обозначение	Длина (нукл.)
Ген С3			
27	CGCCTGGTACCTGAAGTTCCTGCGCCAGTACGCCAAGTTCGTGGCCGCCT	F1(III)	50
28	AGGGACCAGATGTTGGCGGCGGCCTTCAGGGTCCAGGCGGCCACGAACTT	R2(III)	50
29	CGCCAACATCTGGTCCCTGTACAACACCGTGGCCACCCTGCGCATCTGGG	F3(III)	50
30	CGGTCGGCCATCTCGGTGCAGATCTCCACCAGGGCCCAGATGCGCAGGGT	R4(III)	50
31	CCGAGATGGCCGACCGCATCTGGGTGATCTACCAGTACATGGACGACCTG	F5(III)	50
32	GCTCCTTCAGGATCCACTGCTTGTTCGGCCAGGTCGTCCATGTACTGGTAG	R6(III)	50
33	GCAGTGGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGGCCGACCGCCAGTGGC	F7(III)	50
34	CAGATGTTTCAGGGAGATGATGTCCTCGTGCATCTGCCACTGGCGGTTCGGC	R8(III)	50
35	ACATCATCTCCCTGAACATCTGGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGACCCCTG	F9(III)	50
36	GATCAGCAGCAGGTCGCGCAGGCGCCAGATGCGCAGGGTCACGCACAGGG	R10(III)	50
37	CGCGACCTGCTGCTGATCGTGGCCGACCGCATCTGGGTGCTGGAGTGGCG	F11(III)	50
38	GCGGTACTGGTTGTTCGGCCAGGCGGGAGTCGAAGCGCCACTCCAGCACCC	R12(III)	50
39	GCCGACAACCAGTACCGCATCCTGCAGCAGCTGCTGTTTCATCGCCAAGCG	F13(III)	50
40	CCACCTGGGACATGGCCTCGGCCAGCACCCAGCGCTTGGCGATGAACAGC	R14(III)	50
41	GGCCATGTCCCAGGTGGCCGACAACATCTGGCGCGGCCCCGGCCGCGCCT	F15(III)	50
42	AAGTTGATGATGGAGTAGATGTTGATGGTCACGAAGGCGCGGCCGGGGCC	R16(III)	50
43	GCTCGGTCACCTGCAGCTTCTCGAAGTTGATGATGGAGTAGATGTTGA	R17(III)	48

Во всех случаях предложена и реализована единообразная многоступенчатая схема блочной сборки целевых генов (рисунок 5.38). В структуру концевых праймеров в каждом гене введены сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *PspEI* на 5'- и 3'-концах соответственно, для клонирования в составе любой векторной плазмиды (pV1 – pV3). Для обеспечения надежности сборки набора из 9 целевых рекомбинантных плазмид вначале генные конструкции C1, C2 и C3 были клонированы в составе вектора экспрессии pV2, правильность структуры встроенных генов подтверждали секвенированием, после чего целевые гены были реклонированы в составе двух других экспрессионных векторов – pV1 и pV3.

Специфическая активность полученных ДНК-вакцинных конструкций оценивалась как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* (Bazhan *et al.*, 2010). Было показано, что плазида, кодирующая иммуноген UbC3 (с Ub на N-конце химерной белковой молекулы), оказалась наиболее иммуногенной, так как она вызывала максимальную экспрессию комплексов [пептид-молекула МНС-I класса] на поверхности трансфицированных клеток, а также индуцировала ответы CD8+ CTL на большее количество пептидов по сравнению с другими плазидами. Клетки, трансфицированные плазидами, кодирующими химерные белки C2, C3, UbC2 и C3Ub проявляли средний уровень экспрессии комплексов. Плазмиды, кодирующие белки UbC1, C1Ub и C2Ub, экспрессировали комплексы на низком уровне. Что касается плазмиды, кодирующей полиэпитопный иммуноген C1, экспрессия комплексов [пептид-молекула МНС-I класса] была на уровне отрицательного контроля. Сравнительный анализ иммуногенности спроектированных рекомбинантных плазмид показал статистически значимые различия между конструкциями, содержащими иммуногены C1, C2 и C3. При этом все конструкции, содержащие эти иммуногены, по иммуногенности были ранжированы как C3 > C2 > C1. Полученные результаты поддерживают концепцию, согласно которой убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопной конструкции на протеасому, а также ее оптимизация путём использования спейсерных последовательностей, содержащих сайты протеасомного расщепления и мотивы для связывания эпитопов с TAP, обеспечивает рациональный дизайн полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, нацеленный на повышение их иммуногенности.

5.9 Разработка различных методов диагностики и подходов к вакцинопрофилактике Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ)

5.9.1 Краткая характеристика ККГЛ

Изучение возникающих и вновь возвращающихся вирусных инфекций является крайне актуальной проблемой современной вирусологии. В условиях появления в каком-либо регионе заболеваний с тяжелыми клиническими проявлениями особенно важным является быстрая идентификация возбудителя и определение путей его распространения, а также разработка современных эффективных средств вакцинопрофилактики.

Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (ККГЛ) представляет собой острое инфекционное вирусное заболевание, сопровождающееся интоксикационным и геморрагическим синдромом и высокой летальностью (при тяжелых формах летальность может достигать 70 %). Это заболевание характеризуется частыми эпидемическими вспышками и спорадическими случаями, которые возникают во многих странах мира, включая Российскую Федерацию (Casals, 1969; Hoogstraal, 1979; Rodriguez *et al.*, 1997; Аристова и др., 2001; Колобухина и др., 2001).

Основным резервуаром вируса в природе и источником инфекции являются различные виды иксодовых клещей, передающих вирус своему потомству трансовариально и по ходу метаморфоза. Временным резервуаром вируса служат животные (крупный рогатый скот, козы, овцы), на которых эти клещи паразитируют. Локальные вспышки заболевания ККГЛ происходят ежегодно, причем периоды активизации заболевания, как правило, связаны с увеличением численности клещей-переносчиков.

Инфицирование человека происходит через укусы клещей, при прямом контакте с больными и через кровь инфицированных животных (при забое и разделке туш).

Вирус ККГЛ относится к семейству *Bunyaviridae*, роду *Nairovirus*. Геном вируса ККГЛ представлен 3 фрагментами одноцепочечной кольцевой (за счет наличия комплементарных концов, связанных водородными связями) РНК отрицательной полярности. Фрагменты генома вируса ККГЛ имеют размеры около 12200 (L-сегмент), 5360 (M-сегмент), и 1670 нуклеотидов (S-сегмент) и кодируют

соответственно РНК–полимеразу, гликопротеины G_n и G_c (ранее именовавшиеся в литературе G₂ и G₁ соответственно), нуклеокапсидный белок N, иногда называемый NP (Mariott *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 2002; Whitehouse, 2004).

Нуклеотидная последовательность всего генома вируса ККГЛ определена как минимум для 15 штаммов вируса ККГЛ, и установлены полные и/или частичные последовательности L-, M- и S-сегментов генома десятков штаммов и изолятов вируса (Rodriguez *et al.*, 1997; Papa *et al.*, 2002; Яшина и др., 2002а,б; Петрова и др., 2003; Yashina *et al.*, 2003а,б; Hewson *et al.*, 2004а,б; Honig *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2004; Seregin *et al.*, 2004; Серегин и др., 2004, 2006; Whitehouse, 2004; Deyde *et al.*, 2006; Туманова и др., 2006; Meissner *et al.*, 2006а,б,с; Olschläger *et al.*, 2011).

Необходимо отметить, что в последние годы изучение вируса ККГЛ, в особенности строения генома различных его штаммов и изолятов, заметно активизировалось (Kinsella *et al.*, 2004; Deyde *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2006а,б,с; Mild *et al.*, 2010; Olschläger *et al.*, 2011; Chinikar *et al.*, 2013), что может служить доказательством не только научной значимости этого направления исследований, но и его практических аспектов.

Данные по генотипированию всегда лежат в основе разработки современных эффективных средств диагностики, вакцинопрофилактики и лечения. Кроме того, важно отметить, что вирус ККГЛ отнесен к агентам, которые имеют биотеррористический потенциал, вследствие его высокой вирулентности и способности передаваться от человека к человеку (Онищенко и др., 2003; Deyde *et al.*, 2006). В этой связи огромное значение приобретает разработка методов относительно простого и быстрого генотипирования вируса ККГЛ и создание современных вакцинных препаратов, позволяющих избежать широкого распространения этого опасного заболевания.

Использование для масштабного мониторинга стандартной схемы с конечным секвенированием ПЦР-фрагментов и филогенетическим анализом является непростым и достаточно дорогостоящим мероприятием.

Надежных средств вакцинопрофилактики ККГЛ, которые нашли бы широкомасштабное применение, до настоящего времени не существует.

Соответственно, дальнейшие цели нашей работы были определены следующим образом:

- разработка современных высокоспецифичных и чувствительных методов лабораторной диагностики ККГЛ с возможностью генотипирования, то есть проведения четкой дифференциации генотипов вируса ККГЛ, характерных для определенной территории (в первую очередь России), от нехарактерных, в том числе завозных, биовариантов данного вируса;

- конструирование рекомбинантных плазмид, направляющих экспрессию генов вируса ККГЛ, как кандидатных ДНК-вакцин, предназначенных для разработки новых средств вакцинопрофилактики на их основе, обладающих максимальным вакцинным потенциалом, прежде всего, на территории РФ.

5.9.2 Методы и проблемы диагностики ККГЛ

Лабораторная диагностика ККГЛ основана на выявлении вируса и (или) его структурных компонентов, а также вирусоспецифических антител. Принято выделять три группы методов: вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические (Львов и др., 1989).

Главным вирусологическим методом является выделение вируса ККГЛ из клинического материала. Для этого исследователи используют метод интрацеребрального заражения новорожденных белых мышей или крыс биологическим материалом, а также метод адаптации вируса, зачастую весьма длительной, к некоторым культурам клеток животного происхождения (Бутенко, 1970; Львов и др., 1989; Burt *et al.*, 1994; Смирнова, 2003). Безусловно, данные методы являются наиболее достоверными, однако они же наиболее дорогостоящие и длительные, поэтому не могут конкурировать с методами экспресс-анализа, которые крайне необходимы для мониторинга природных очагов инфекции (Львов и др., 1989; Вышемирский и др., 2001). Кроме того, вирусологические исследования требуют специально оборудованных лабораторных помещений с высокой степенью биологической защиты и высококвалифицированного персонала, что ограничивает использование этих методов несколькими лабораториями в стране.

Иммунологические методы в лабораторной диагностике ККГЛ используют для выявления антител и антигенов в биологических образцах – сыворотках крови людей и животных, их тканях и органах, а также для характеристики полученных

штаммов вируса ККГЛ. Для этого чаще всего используют электронно-микроскопические исследования, реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) и иммуноферментный анализ (ИФА). Для выявления антигена в настоящее время применяют метод флуоресцирующих антител, РНГА и ИФА. Следует отметить, что сравнительный анализ современных и классических серологических методов показал, что по чувствительности ИФА существенно превосходит последние (Тишкова, 1996, Батырова и др., 2005).

В последнее время для диагностики ККГЛ и генетической характеристики полученных изолятов и выделенных штаммов применяют молекулярно-генетические методы, основанные на проведении реакции обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией – ОТ-ПЦР (Rodriguez *et al.*, 1997; Pava *et al.*, 2002; Смирнова, 2003; Yashina *et al.*, 2003b). Данный метод позволяет выявлять вирусную РНК в течение первых дней заболевания, когда серологические методы не могут дать положительного результата, поскольку иммунный ответ в должной степени еще не сформирован (Карань и др., 2003; Смирнова, 2003). Более того, данный метод позволяет провести предварительное генотипирование биовариантов вируса путем прямого определения нуклеотидной последовательности полученных ПЦР-фрагментов его генома, при условии, что выбранный район позволяет это адекватно осуществить.

Таким образом, нам представляется крайне актуальной задачей усовершенствование методов экспресс-диагностики ККГЛ, особенно в плане мониторинга ситуаций с возможными вспышками этого опасного заболевания в эндемичных по ККГЛ районах, прежде всего в южных регионах Российской Федерации и сопредельных территориях.

5.9.3 Получение белков вируса ККГЛ в рекомбинантном виде и исследование их антигенных свойств

Одним из главных компонентов ИФА-диагностикомов, предназначенных для выявления антител к любому инфекционному агенту, является его антиген. Обычно используется два вида антигенов: лизатный либо рекомбинантный. Лизатный антиген, как правило, обладает высокой чувствительностью и достаточной специфичностью (Батырова и др., 2005), однако, как упоминалось

выше, получение подобного антигена в случае вируса ККГЛ связано с работами в условиях повышенной биоопасности и сопряжено с риском заражения персонала. Поэтому разработка подходов к получению антигенов вируса ККГЛ в рекомбинантном виде – одно из приоритетных направлений в плане решения поставленной задачи. Самым надежным, безопасным и относительно дешевым способом получения рекомбинантных антигенов опасных патогенов является получение продуктов экспрессии их генов в гетерологичных системах, самой простой из которых следует признать бактериальную систему экспрессии, в частности, с использованием различных штаммов *E. coli*.

Известно, что инфицированный организм вырабатывает большое количество антител к нуклеокапсидному (N или NP) белку вируса ККГЛ, кодируемому S-сегментом генома, в меньшей степени – к поверхностному гликопротеину Gc и совсем в незначительной – к другому гликопротеину Gn, кодируемому M-сегментом (Whitehouse, 2004). Поэтому выбор генов для экспрессии в клетках *E. coli* не вызывал особых сомнений.

Для оценки антигенных свойств N-белка нами была проведена серия экспериментов по его экспрессии в различных вариантах. В качестве матрицы мы использовали две рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты кДНК S-сегмента генома вируса ККГЛ китайского штамма С68031 (Mariott *et al.*, 1994), любезно предоставленные доктором Мариоттом (А. С. Mariott). Были рассчитаны и синтезированы праймеры, позволяющие получить и клонировать в различных экспрессионных векторах как фрагмент ДНК, кодирующий 1-359 а/к-фрагмент N-белка, так и полный N-белок (1-482 а/к).

В результате нами была получена серия рекомбинантных плазмид, направляющих в клетках *E. coli* синтез следующих рекомбинантных белков: вышеназванного антигеннозначимого фрагмента N-белка как в чистом виде, так и в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST) *Schistosoma japonicum* и β-галактозидазой *E. coli*, а также полного N-белка, слитого с N-концевым фрагментом β-галактозидазы.

Проведенные эксперименты по взаимодействию рекомбинантных вариантов вирусного N-белка с сыворотками больных ККГЛ в ИФА показали невысокую специфичность и чувствительность. Лучшие результаты были получены при

использовании в качестве антигена рекомбинантного белка, состоящего из N-концевого фрагмента β -галактозидазы *E. coli* (около 40 кДа) и полного N-белка вируса ККГЛ, экспрессируемого в составе модифицированного вектора pUBEX.

Учитывая вышеназванное обстоятельство, а также обнаруженную нами вариабельность в а/к последовательности N-белка вируса ККГЛ между штаммами, изолированными в Азии и европейской части России (Яшина и др., 2002а,б; Петрова и др., 2003; Серегин и др., 2004, 2006), мы получили аналогичный рекомбинантный белок штамма STV/HU29223, изолированного в Ставрополе от больного. Таким же образом была сконструирована плазмида pG1, направляющая в клетках *E. coli* синтез протяженного антигеннозначимого 1510-1670 а/к-фрагмента оболочечного белка-предшественника (входит в состав зрелого белка Gc) вируса ККГЛ штамма STV/TI28985 (изолирован от клеща).

На рисунке 5.39 представлена структура рекомбинантной плазмиды pN1. Все другие описанные здесь плазмиды имеют аналогичную структуру, за исключением того, что по участкам рестрикции *BglII/SalI* встроены соответствующий ген или фрагмент гена (N2, Gc).

Получение рекомбинантных белков вируса ККГЛ осуществляли в клетках *E. coli* RRI, трансформированных одной из целевых плазмид (pN1, pN2, pG1) путем активации термоиндуцибельного промотора P_R фага λ сдвигом температуры культивирования с 30 °С до 42 °С. Было установлено, что все рекомбинантные белки накапливаются в составе нерастворимого осадка телец включений, который последовательно промывали растворами 2 М и 4 М мочевины, растворяли в 8 М мочеvine и стандартизовали по концентрации – 0,5 мг/мл. В качестве примера на рисунке 5.40 приведена электрофореграмма некоторых фракций полученных рекомбинантных белков вируса ККГЛ.

Далее была проведена оценка антигенных свойств методом ИФА следующих полученных нами рекомбинантных белков:

- N1 – полный N-белок китайского штамма C68031;
- N2 – полный N-белок штамма STV/HU29223 (Россия);
- G1 – 1510-1670 а/к-фрагмент оболочечного белка-предшественника штамма STV/TI28985 (Россия), входящего в состав гликопротеина Gc.

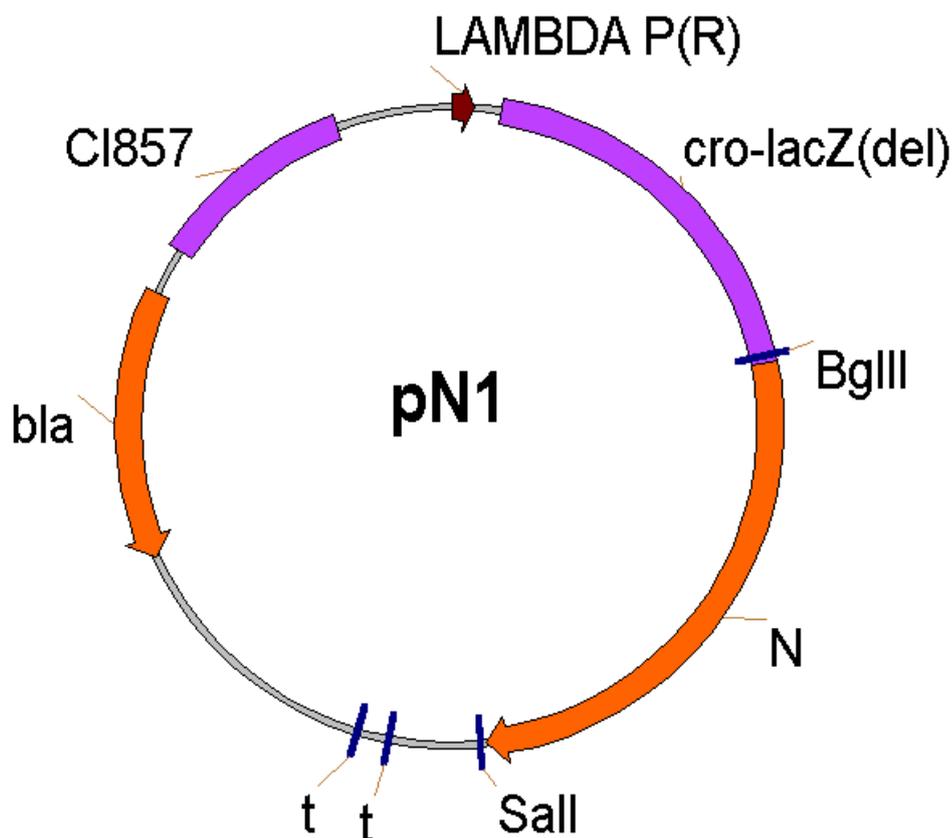
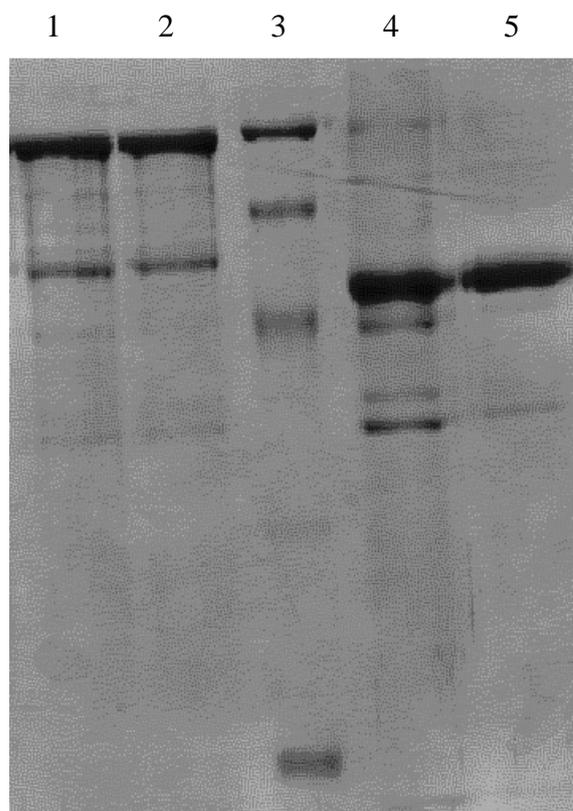


Рисунок 5.39 – Структура рекомбинантной плазмиды pN1

В качестве отрицательного контрольного антигена был взят рекомбинантный белок p24 ВИЧ-1, полученный нами в той же системе экспрессии и выделенный из клеточной биомассы аналогичным образом.

В эксперименте проводили определение антител класса IgG с использованием 16 положительных сывороток на ККГЛ. Белок N1 выявил как положительные 4 из них, белок N2 – 5, G1 – 2, p24 ВИЧ-1 – 1. Для определения специфичности мы взяли случайную выборку из сывороток 48 здоровых доноров. Из них по 3 сыворотки оказались ложноположительными для всех белков вируса ККГЛ (для p24 – 1). Положительное взаимодействие (+) нами определялось по формуле: $OD^+/OD^- > 2$, где OD^+ – значение оптической плотности при A_{490} для тестируемой сыворотки, OD^- – среднее значение оптической плотности 3 контрольных отрицательных сывороток.



1 – N1 (8М мочевины); 2 – N2 (8М мочевины); 3 – маркерные белки: 97,4 кДа, 66,2 кДа, 45,0 кДа, 31,0 кДа, 21,5 кДа; 4 – G1 (4М мочевины); 5 – G1 (8М мочевины).

Целевые белки представлены мажорными полосами в каждой из дорожек геля: около 94 кДа для N1 и N2 (дорожки 1 и 2), около 57 кДа для G1 (дорожки 4 и 5).

Рисунок 5.40 – Получение рекомбинантных белков вируса ККГЛ.

Электрофореграмма. 12 % ПААГ (Серегин и др., 2013)

Таким образом, полученный рекомбинантный белок G1 следует признать неантигенным, то есть неспособным выявлять антитела к вирусу ККГЛ в сыворотках больных методом ИФА. Вероятно, антигенные свойства этого белка в значительной степени модулируются в результате его гликозилирования, отсутствующего в бактериальной клетке, а также определяются его конформационными эпитопами, формирующимися на поверхности вирусных частиц.

Несколько лучшие результаты были получены при использовании белка N, причем белки азиатского и российского штаммов отличались по взаимодействию с сыворотками больных ККГЛ, однако крайне низкая чувствительность (менее 30 %)

при недостаточном показателе специфичности (около 90 %) ставит под сомнение возможность создания диагностической тест-системы для выявления антител к вирусу ККГЛ методом ИФА с использованием полученных рекомбинантных вирусных белков в качестве антигенов.

Для того чтобы получить целевой антиген более высокой степени очистки, мы в плазмиде рN2 организовали перед кодоном терминации трансляции так называемый «гистидиновый хвост», состоящий из шести кодонов гистидина. Это позволило нам провести аффинную очистку белка на Ni-NTA-агарозе, однако заметного повышения антигенных свойств обнаружить не удалось.

Тот факт, что рекомбинантный N-белок, полученный в бакуловиральной системе экспрессии либо в других эукариотических системах, обладает достаточными антигенными свойствами для выявления антител к вирусу ККГЛ (Mariott *et al.*, 1994; Saijo *et al.*, 2002, 2005 Tang *et al.*, 2003) может свидетельствовать о том, что конформационно он близок нативному вирусному белку. Вполне возможно, что основные антигенные детерминанты имеют конформационную структуру, которая нарушается при солюбилизации белка в растворе мочевины, а процесс ренатурации и рефолдинга не может в должной степени ее восстановить.

Ведь, в самом деле, основное преимущество эукариотических систем экспрессии перед прокариотическими состоит в возможности получать гликопротеины благодаря наличию системы гликозилирования белков, тогда как нативный вирусный N-белок не является гликопротеином.

Следует отметить, что недавно в литературе появились сообщения об успешном использовании рекомбинантного N-белка и его фрагментов, полученных из клеток штамма-продуцента *E. coli*, в качестве антигенов для выявления антител к вирусу ККГЛ в сыворотках крови больных и реконвалесцентов методом ИФА и иммуноблоттинга (Samudzi *et al.*, 2012; Burt *et al.*, 2013). Авторы использовали экспрессионный вектор, позволяющий получать рекомбинантный вирусный N-белок слитый с триггер-фактором TF (*Trigger Factor*), повышающим растворимость химерного рекомбинантного белка, но, несмотря на это, целевой белок концентрировался в составе нерастворимых телец включений, из которых он

выделялся аналогично полученному нами рекомбинантному N-белку, слитому с фрагментом β -галактозидазы.

Обращает на себя внимание тот факт, что многие положительные сыворотки не демонстрировали существенного превышения над фоновыми значениями, которые были достаточно низкими. В нашем же случае мы выставили довольно жесткие критерии положительности, при этом имея достаточно высокие показатели фоновых значений отрицательных сывороток, что, вероятно, и привело к тому, что лишь 5 из 16 положительных сывороток были признаны в результате таковыми.

Учитывая высокий уровень синтеза рекомбинантных белков вируса ККГЛ, обеспечиваемый сконструированными нами плазмидами, и нереализованные возможности по совершенствованию процесса их выделения, ренатурации и рефолдинга, а также возможности использования для тестирования антигенных свойств этих белков современной панели сывороток, можно ожидать получения более обнадеживающих результатов, аналогичных представленным авторами цитируемых выше работ.

Кроме того, полученные рекомбинантные антигены вируса ККГЛ находят применение в решении других важных научных и практических задач, связанных с получением и использованием высокоспецифичных МКА к белкам вируса ККГЛ. Рекомбинантные нуклеокапсидные белки служат инструментом для отбора МКА, специфичных к этому вирусному белку, и могут быть надежным положительным контролем в диагностических тест-системах по выявлению антигена вируса ККГЛ методом ИФА либо методом флуоресцирующих антител. Подобные МКА наряду с рекомбинантными вирусными белками могут служить удобным инструментом для выявления антигена вируса ККГЛ в биологических образцах. Работы в этом направлении в настоящее время проводятся нами совместно с нашими коллегами из других научных организаций России (Храпова и др., 2015), и их результаты уже защищены тремя патентами РФ на изобретения (Антонов и др., 2014а,б,в).

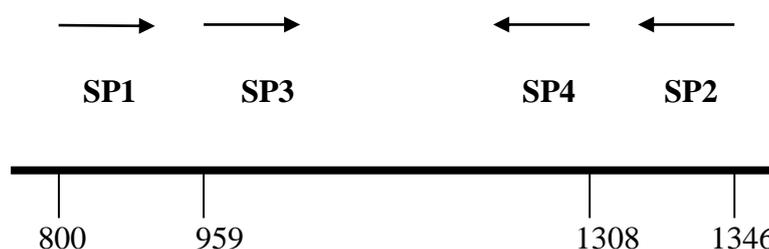
Вместе с тем мы продолжили нашу работу по созданию надежной системы экспресс-диагностики ККГЛ в других направлениях, используя альтернативные подходы.

5.9.4 Разработка диагностической тест-системы для выявления РНК вируса ККГЛ в биологических образцах методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

Одним из наиболее перспективных альтернативных подходов к созданию тест-системы для выявления ККГЛ является ОТ-ПЦР-диагностика. Данный метод применяется для диагностики ККГЛ уже более 15 лет во многих странах мира (Schwarz *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1997; Papa *et al.*, 2002; Карань и др., 2003; Смирнова, 2003; Yashina *et al.*, 2003b; Онищенко и др., 2005а,б;), однако быстрое накопление результатов изучения генетического разнообразия вируса неизбежно ставит задачи совершенствования существующих и создания новых тест-систем на основе ОТ-ПЦР. Принципиально предложенные системы детекции можно разделить на однораундовые (используется одна пара праймеров) и двухраундовые (используют две пары праймеров, причем вторая пара является вложенной (полностью или частично) внутрь ПЦР-фрагмента первого раунда). Каждый подход имеет свои преимущества и недостатки, которые определяются, прежде всего, теми целями, которые разработчики считают приоритетными. Для нас главными целями при разработке являлись максимальные чувствительность и специфичность, а также информативность амплифицируемого фрагмента, т.е. возможность провести предварительное генотипирование по результатам его прямого секвенирования.

Таким образом, предложенный нами метод основан на использовании двух пар праймеров, фланкирующих консервативный кодирующий участок S-сегмента РНК вируса ККГЛ (рисунок 5.41 и таблица 5.5), при проведении двухраундовой амплификации. Показано, что в условиях двухраундовой амплификации повышается специфичность и чувствительность определения РНК вируса ККГЛ в пробах различного происхождения. Специфичность реакции мы подтверждали прямым секвенированием ПЦР-продуктов, по результатам которого проводили надежное генотипирование изолятов вируса ККГЛ (Yashina *et al.*, 2003b; Онищенко и др., 2005а,б; Туманова и др., 2006). Необходимо отметить, что предложенный набор праймеров был разработан на основе рассчитанного нами ранее аналогичного набора (Петров и др., 2001) и большого массива новых данных по генетической вариабельности вируса ККГЛ, полученных нами на его основе и появившихся в литературе.

Таким образом, предложенный набор праймеров для детекции РНК вируса ККГЛ в биологических образцах (клинических, полевых) является в известной степени универсальным, учитывающим особенности строения геномов всех известных генетических вариантов вируса. Причем особое внимание было уделено надежности выявления представителей основной европейской генетической группы, к которой относятся все биоварианты вируса ККГЛ, изолированные на территории Российской Федерации.



Цифрами обозначены позиции 5'-концевых нуклеотидов праймеров. Структура всех праймеров приведена ниже в таблице 5.5, условия проведения ОТ-ПЦР приведены в разделе 4.2.

Рисунок 5.41 – Схема расположения праймеров для амплификации участка S-сегмента генома вируса ККГЛ (Серегин и др., 2005)

Таблица 5.5 – Структура набора праймеров для выявления РНК вируса ККГЛ

Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Наименование	Положение на S-сегменте, нукл.
GAAGCCAA (A, G) AAGAC (T, C) GT (A, G) GAGGCTC	SP1	800 - 824
CAATTGTCTTGGC (A, G) CA (T, C) GGATT	SP2	1325 - 1346
GCACAGATTGACAC (T, C) (G, C) CTTTCAGC	SP3	959 - 982
GTCCG (T, A) AGGTT (A, G) AGAATGGACTTGGT	SP4	1283 - 1308

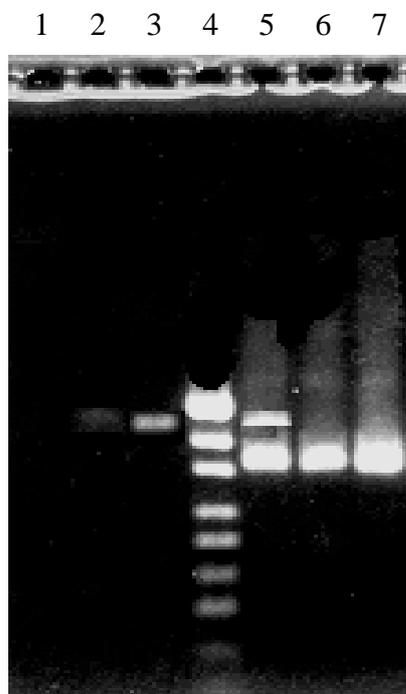
И, наконец, хотелось бы особо подчеркнуть, что условия ОТ-ПЦР разработаны с использованием ферментов и прибора для амплификации отечественного производства (ТП4-ПЦР-01-«Гердик», АО ДНК-Технология, Москва), что является важным обстоятельством, так как зарубежные наборы для

ОТ-ПЦР и приборы для амплификации чрезвычайно дорогостоящи и не всегда доступны. Особую актуальность наш подход приобретает в связи со сложной политической ситуацией, накладывающей отпечаток и на международное экономическое и научно-техническое сотрудничество.

При скрининге образцов на наличие генетического материала вируса ККГЛ необходимо быть уверенным, что в каждой пробирке ПЦР проходит адекватно. Для этого обычно применяют так называемый внутренний контроль реакции, который представляет собой альтернативную матрицу (ДНК для ПЦР или РНК для ОТ-ПЦР), позволяющую получить ПЦР-фрагмент с использованием тех же специфических праймеров, но отличающийся по длине от целевого фрагмента. Такая матрица вносится в исследуемый образец в предельном разведении, позволяющем детектировать появление контрольного фрагмента.

Для этой цели нами сконструирована рекомбинантная плазмида, позволяющая получить ПЦР-фрагмент длиной 475 п.н. при использовании праймеров серии SP в двухраундовой реакции амплификации, тогда как целевой специфический фрагмент имеет длину 350 п.н. Эта генетическая конструкция получена путем встройки *Hind*III-фрагмента ДНК фага λ длиной 125 п.н. по *Hind*III-участку рестрикции в кДНК S-сегмента вируса ККГЛ штамм UZBEK/TI10145, ранее клонированного нами в векторе pGEM-T (Петрова и др., 2003). В результате была получена целевая плазмида, названная pS λ . Данная плазмида может применяться как внутренний контроль ПЦР, так и в качестве положительного контроля, позволяющего легко и просто выявлять возможные случаи контаминации исследуемых образцов, что значительно облегчает правильную интерпретацию результатов исследования. На рисунке 5.42 приведен пример использования полученной плазмиды, из которого видно, что чувствительность разработанной нами тест-системы составляет не менее 100 молекул ДНК в реакционной смеси (25 мкл) первого раунда ПЦР. При необходимости использовать данную конструкцию на стадии синтеза кДНК (стадия обратной транскрипции) можно получить целевой РНК-транскрипт *in vitro* под контролем сильных промоторов РНК-полимераз фагов T7 и (или) SP6, которые в плазмиде pS λ фланкируют вставку S-сегмента вируса ККГЛ с фрагментом ДНК фага λ .

В результате проведенных исследований и научно-практических разработок нами было получено два патента РФ на изобретение (Петров и др., 2001; Серегин и др., 2005) и тест-система была успешно внедрена в производство.



- 1 – отрицательный контроль реакции ОТ-ПЦР (без матрицы);
- 2 и 3 – матрица pSλ в количестве 10 ± 5 и 100 ± 50 молекул плазмидной ДНК в реакционной смеси (25 мкл) на стадии 1-го раунда ПЦР, соответственно;
- 4 – маркер длин фрагментов ДНК (гидролизат плазмиды pUC19/*Msp* I);
- 5 и 6 – матрицей служила РНК антиген-положительного пула клещей с добавлением 1000 ± 500 молекул плазмидной ДНК pSλ в реакционную смесь (25 мкл) на стадии 1-го раунда ПЦР либо без добавления, соответственно;
- 7 – положительный (вирусодержащий) контрольный лабораторный образец.

Рисунок 5.42 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных в двухраундовой реакции при использовании набора праймеров серии SP и различных матриц.

1,5 % агарозный гель (Серегин и др., 2013)

В связи с нашими разработками нельзя не упомянуть о работах по созданию тест-систем нового поколения, основанных на проведении ПЦР в режиме реального времени (Yapar *et al.*, 2005; Duh *et al.*, 2006, 2007; Garrison *et al.*, 2007; Wölfel *et al.*, 2007). Несомненно, такие диагностикумы будут все более

востребованы, поскольку имеют огромное преимущество перед традиционными в виде возможности точной количественной оценки генетического материала возбудителя в исследуемых образцах (вирусная нагрузка), однако с их помощью нельзя решить все задачи, поставленные в данной работе.

Таким образом, нами разработана и совместно с сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест» (Кольцово Новосибирской обл.) всесторонне проверена и внедрена в производство ОТ-ПЦР-тест-система для выявления РНК вируса ККГЛ в биологических образцах.

5.9.5 Дифференциация геновариантов вируса ККГЛ путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), полученных в результате ОТ-ПЦР

В настоящее время вирус ККГЛ подразделяется на 7 генотипов, которые кластеризуются на филогенетическом дереве в основном по географическому принципу (Hewson *et al.*, 2004a,b; Deyde *et al.*, 2006), причем 2 из них имеют по одному представителю (в Европе – штамм AP92 из Греции, и в Африке – штамм 3010, выделенный в Конго). Это касается филогенетических деревьев, построенных по нуклеотидным последовательностям S- и M-сегментов. Следует отметить, что филогенетический анализ на основе нуклеотидной последовательности L-сегмента вирусного генома выявляет 5 генетических групп за счет объединения двух азиатских групп в одну и двух африканских (за исключением вышеназванного штамма из Конго) тоже в одну (Deyde *et al.*, 2006). Здесь важно подчеркнуть, что при анализе любого из сегментов генома, причем как полноразмерных последовательностей, так и частичных в Европе (включая Турцию) выявляется два генотипа вируса ККГЛ: мажорный, который можно назвать Европа 1, как было предложено ранее (Hewson *et al.*, 2004б), и минорный, Европа 2, представленный лишь вышеназванным штаммом из Греции.

Следует отметить, что при анализе M-сегмента генома, географическая привязка ветвей филогенетического дерева нарушается, и этот факт принято расценивать как результат реассортации сегментов генома вируса ККГЛ, при котором в основном (либо исключительно) происходит обмен именно этим сегментом РНК (Hewson *et al.*, 2004б; Deyde *et al.*, 2006). Таким образом, в природе циркулирует вирус ККГЛ, представляющий собой геноварианты, исключительно

характерные для данного региона, либо его реассортанты, возникшие в результате обмена средним сегментом РНК. Не исключена также и возможность трансконтинентального переноса вируса ККГЛ, о чем мы сообщали ранее (Туманова и др., 2006). Хотя следует отметить, что среди представителей генетической группы Европа 1 реассортантов не обнаружено, что, однако, не исключает наличия таковых в природе.

Исходя из вышесказанного, для корректного генотипирования необходимо использовать S- или L-сегмент, либо их фрагменты, хотя для более полной молекулярно-генетической характеристики изолятов вируса ККГЛ в дальнейшем необходимо и изучение структуры М-сегмента вирусного генома. Для решения поставленной задачи мы провели анализ нуклеотидных последовательностей этих сегментов на наличие сайтов рестрикции, по которым можно было бы надежно генотипировать вирус ККГЛ, прежде всего, с целью выявления нетипичных представителей в ареале вируса ККГЛ генотипа Европа 1, основной территорией которого является Европейская часть России. Как мы и предполагали ранее, исходя из результатов филогенетического анализа, выполненного на основе всех известных последовательностей L-сегмента (Meissner *et al.*, 2006a,b,c), самым перспективным в этом плане оказался обнаруженный нами вариабельный район L-сегмента, фланкированный праймерами в прилегающих консервативных областях (Meissner *et al.*, 2006b).

Для получения целевого фрагмента L-сегмента генома вируса ККГЛ, содержащего вариабельный участок, использовалась пара праймеров:

VFnew: 5'-GT(A,G)GTGAGCATTCAATAGAG-3' (pos. 2290-2309);

VRnew: 5'-CACCATCT(A,G)TCTGG(C,T)GGTGT-3' (pos. 2680-2661).

Таким образом, длина фрагмента составляет 391 п.н.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей данного фрагмента для различных штаммов было выполнено с целью выявления идентичных. Всего в работе использовали 39 нуклеотидных последовательностей 35-ти различных штаммов, из них 16 являются представителями генетической группы Европа 1 (для некоторых штаммов доступно несколько последовательностей, определенных в разное время различными группами исследователей), для которых были построены рестрикционные карты для

эндонуклеаз рестрикции, сайты узнавания которых встречались неоднократно у представителей более двух генетических групп (Серегин и др., 2011). Таким образом, были отобраны 7 ферментов: *AluI* (AGCT), *HaeIII* (GGCC), *HpaII* (CCGG), *TaqI* (TCGA), *Kzo9I* (GATC), *Sse9I* (AATT), *Tru9I* (TTAA).

Дальнейший анализ показал, что использование одного фермента не позволяет решить поставленную задачу. Следовательно, нам необходимо было выбрать наиболее перспективный вариант рестрикционных картин всех нуклеотидных последовательностей и попытаться дополнить его таким образом, чтобы на следующем этапе рестрикции достичь максимально точного результата. Поскольку наша главная цель: отличить штаммы вируса ККГЛ генетической группы Европа 1 от других; мы выбрали вариант рестрикционной картины наиболее характерный для всех представителей этой группы и нехарактерный для других. Этому условию соответствуют эндонуклеазы рестрикции *AluI* и *HaeIII*.

Разработанная нами схема генотипирования представлена на рисунке 5.43. Однако необходимо к ней дать некоторые пояснения и комментарии. Суть предложенной схемы основана на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) после проведения ОТ-ПЦР.

Обнаружение фрагмента ДНК расчетной длины после проведения ОТ-ПЦР с вышеназванными праймерами указывает на наличие РНК вируса ККГЛ в исследуемом образце. По результатам *AluI*-рестрикционного анализа можно определить, что данный образец содержит вирус ККГЛ, отличающийся от известных на сегодняшний день геновариантов, принадлежащих к генотипу Европа 1. Об этом свидетельствует рестрикционная картина, отличная от присущей представителям этой генетической группы, для которых характерно наличие фрагментов ДНК после электрофореза в агарозном геле, длина которых оценивается как 215, 80+80 п.н. (либо 215, 80, 70 п.н., что характерно для штамма BUL/HU517 из Болгарии, либо 220, 80, 70 п.н., как у штамма Kosova Noti). Здесь и далее мы приводим оценочные длины фрагментов с округлением до 5 п.н., т.к. речь идет о визуальной оценке длин рестрикционных фрагментов, и именно поэтому фрагменты ДНК длиной менее 40 п.н. мы опускаем при рассмотрении рестрикционных картин. У представителей других генетических групп *AluI*-рестрикционные картины заметно отличаются за исключением китайского

штамма С68031 и штамма Oman, у которых они идентичны штаммам из России, и трех африканских штаммов, обнаруживающих картину, совпадающую с таковой для штамма из Болгарии. Однако *Hae*III-рестрикционная картина позволяет отличить эти штаммы от штаммов, представляющих генетическую группу Европа 1, хотя при этом наблюдается единственное исключение. Для большинства штаммов рассматриваемой европейской группы эта картина выглядит так: 245, 145 п.н., тогда как вышеназванные азиатские штаммы (и большинство штаммов других генетических групп) не имеют сайта рестрикции в данном фрагменте ДНК, а штаммы из Африки, о которых идет речь, демонстрируют совершенно другую картину рестрикции: 320, 70 п.н., что позволяет дифференцировать данные генотипы вируса ККГЛ. Исключением, о котором шла речь выше, является штамм Drosdov из России, который также обнаруживает отсутствие сайта рестрикции *Hae*III. Однако необходимо отметить, что данный штамм выделен около полувека назад, и это не позволяет отнести его к современному генотипу вируса ККГЛ, циркулирующему на территории Европы. Вместе с тем обнаружение подобного геноварианта в природе в настоящее время было бы не менее интересно, чем выявление нехарактерных генотипических представителей вируса ККГЛ. Именно по результатам предлагаемого рестрикционного анализа можно отбирать образцы для проведения более подробного изучения с помощью секвенирования и филогенетического анализа на основе различных сегментов генома вируса ККГЛ с целью наиболее точного установления происхождения данного геноварианта вируса и в дальнейшем определения путей и способов его проникновения на территорию Европы.

Таким образом, с помощью анализа ПДРФ можно с большой степенью вероятности дифференцировать вирус ККГЛ основного европейского генотипа от других генетических вариантов и обнаружить генотип вируса, не относящийся к генотипу Европа 1, а тем более нехарактерный циркулирующему в последние десятилетия вирусу на территории России. Предложенная нами схема относительно простого и быстрого скрининга образцов, потенциально содержащих вирус ККГЛ, может помочь исследователям в проведении мониторинга с целью выявления нехарактерных геновариантов вируса на территории РФ и других европейских стран.

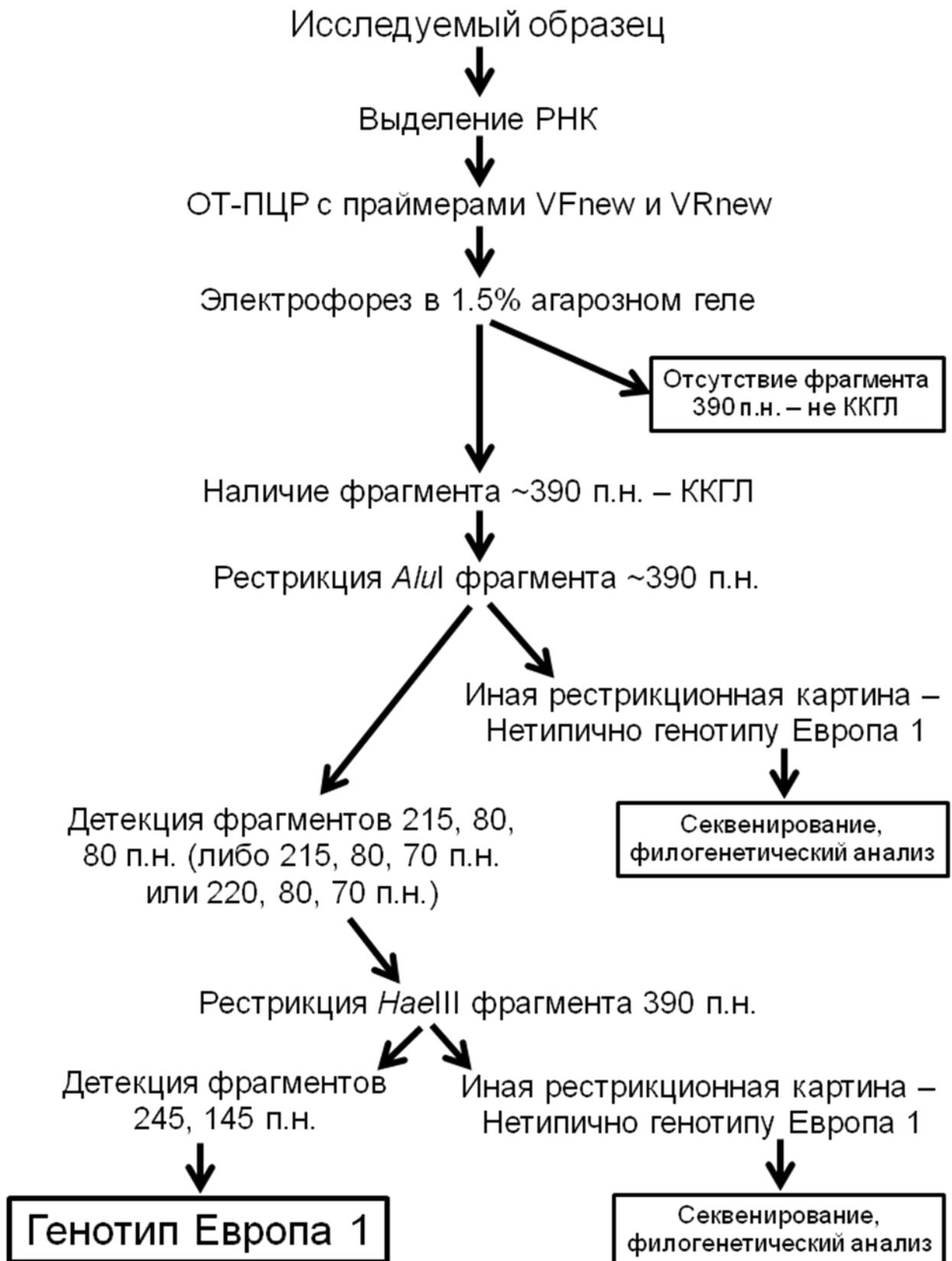


Рисунок 5.43 – Схема генотипирования вируса ККГЛ методом ПДРФ, позволяющая дифференцировать вирус основного европейского генотипа (Европа 1) от других, нехарактерных для Европы, генетических вариантов вируса (Серегин и др., 2011, 2013)

5.9.6 Разработка подходов к вакцинопрофилактике ККГЛ: конструирование рекомбинантных плазмид в качестве кандидатных ДНК-вакцин против ККГЛ

В последние годы во многих странах мира, прежде всего расположенных на материках Африка и Евразия, вспышки ККГЛ регистрируются все чаще и, к сожалению, наблюдается тенденция к быстрому расширению очагов инфекции (Morikawa *et al.*, 2007). Это в полной мере касается и территории Российской Федерации, а именно ее европейской части. Летальность во время вспышек ККГЛ обычно колеблется в пределах 10-50 %, однако имеются единичные сообщения об уровне летальности 70 % и более (Hoogstraal *et al.*, 1979; Yu-Chen *et al.*, 1985; Schwarz *et al.*, 1997; Whitehouse, 2004).

Вакцина для профилактики заболевания, вызываемого вирусом ККГЛ, была разработана и применялась в 1970-е годы в Советском Союзе и в Болгарии (Vasilenko *et al.*, 1973; Hoogstraal, 1979). Она представляет собой инактивированную вакцину, полученную на основе лизата мозгов мышечных сосунков, зараженных вирусом ККГЛ. В конце прошлого столетия на фоне ее применения в Болгарии удалось добиться снижения уровня заболеваемости ККГЛ в эндемичных районах. Однако иммунобиологические свойства этой вакцины до последнего времени не были в должной мере исследованы.

Недавно были опубликованы результаты такого исследования болгарской вакцины (Mousavi-Jazi *et al.*, 2012), свидетельствующие о существенной активации Т-клеточного звена иммунитета, направленного против вируса ККГЛ, которая возрастала на порядок при четырехкратной иммунизации по сравнению с однократной. В то же время добиться появления высокого уровня вируснейтрализующих антител не удалось, хотя общий уровень антивирусных иммуноглобулинов был достаточно высоким уже после первой иммунизации.

Учитывая опасность наличия остаточной вирулентности в препаратах вакцин такого типа и возможность серьезных осложнений в результате их применения, в первую очередь, в виде аллергических реакций на чужеродный белок, она не нашла широкого применения. На постсоветском пространстве, в том числе и в России, эта вакцина не применяется, в Болгарии ее использование ограничено группами риска в эндемичных по ККГЛ районах. Кроме того, производство подобной вакцины имеет свои ограничения, связанные с необходимостью проведения работ на

высоком уровне биологической безопасности (BSL-4), что значительно затрудняет её выпуск в количествах, достаточных для вакцинации больших групп населения. Таким образом, перспективы крупномасштабного производства подобных вакцин в свете действующих современных стандартов выглядят невероятными (Whitehouse, 2004).

В связи с вышеизложенным, совершенно очевидно, что актуальность разработок по созданию безопасных вакцин против ККГЛ представляется несомненной.

Одним из приоритетных направлений в этой области является конструирование кандидатных ДНК-вакцин. Анализ литературных данных показал, что такие попытки предпринимались, однако их нельзя признать успешными. Так, например, Спик и соавторы получили серию рекомбинантных плазмид, направляющих синтез поверхностных гликопротеинов ряда вирусов, в том числе и вируса ККГЛ (Spik *et al.*, 2006). И этот подход следует признать совершенно оправданным. Авторы справедливо отмечают, что роль пептидных фрагментов, образующихся в результате сложного процессинга и созревания поверхностных гликопротеинов Gn и Gc в морфогенезе и патогенезе вируса неизвестна, поэтому они экспрессировали под контролем предраннего CMV-промотора ген белка-предшественника этих гликопротеинов, расположенный в М-сегменте генома вируса ККГЛ. Было установлено, что синтезируемый предшественник подвергается правильному процессингу в эукариотических клетках, однако вируснейтрализующие антитела обнаруживались лишь у половины мышей, которых иммунизировали этой кандидатной ДНК-вакциной, причем картина была сходной в случае применения отдельно ДНК-вакцины против ККГЛ либо в смеси с другими ДНК-вакцинами (против хантавирусной инфекции, лихорадки долины Рифт, клещевого энцефалита). Авторы пришли к выводу, что, возможно добиться усиления ДНК-вакцинного потенциала за счет индивидуальной экспрессии генов зрелых поверхностных гликопротеинов, с чем нельзя не согласиться.

Вместе с тем изучение внутриклеточной локализации гликопротеинов Gn и Gc выявило ряд сложных взаимодействий между ними в клетке в процессе созревания (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2005), что привело нас к мысли о

целесообразности их совместного использования при конструировании кандидатных ДНК-вакцин, несмотря на низкую иммуногенность белка Gn по сравнению с Gc (Whitehouse, 2004; Spik *et al.*, 2006). Тем более что результаты тестов по нейтрализации *in vitro*, проведенные с помощью МКА к двум гликопротеинам (Gn и Gc), не коррелировали с уровнем защиты животных от летальных доз вируса ККГЛ: МКА к Gn лучше защищали мышей, чем МКА к Gc, в то время как *in vitro* был получен прямо противоположный результат (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2005).

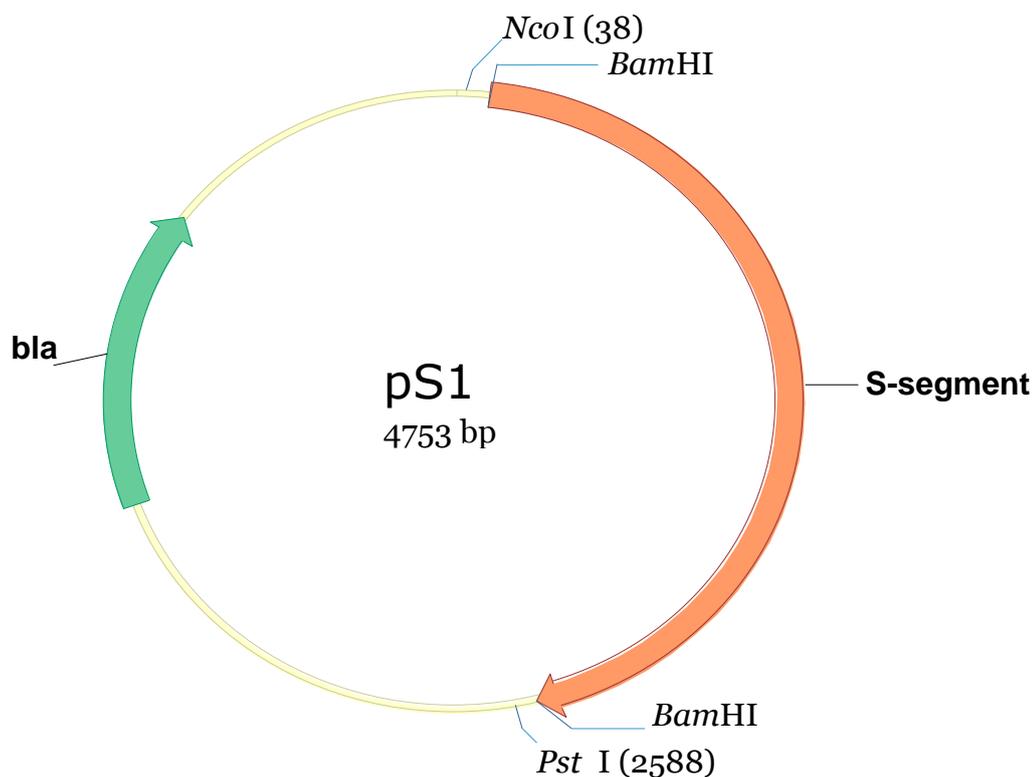
Мы, к сожалению, не знаем какая составляющая иммунитета играет ключевую роль в защите от вируса ККГЛ, однако логично предположить, что клеточное звено иммунной системы инфицированного организма, особенно, активация СТЛ-ответов, играет далеко не последнюю роль в этом процессе. На наш взгляд, об этом свидетельствуют результаты, полученные другими авторами и описанные выше: при введении цельного вирусного антигена, обладающего хорошим вакцинным потенциалом, резко активизируется клеточный иммунитет (Mousavi-Jazi *et al.*, 2012); ДНК-вакцина, основанная на экспрессии гена предшественника поверхностных белков, полученная Спиком с соавторами, была неспособна вызывать эффективную наработку вируснейтрализующих антител (Spik *et al.*, 2006).

Таким образом, анализ литературных данных и накопленный нами опыт работы в этом направлении укрепили нас в мысли получить, как минимум, три рекомбинантные плазмиды: две, кодирующие зрелые белки Gn и Gc, и плазмиду, направляющую синтез нуклеокапсидного (N) белка вируса ККГЛ, с целью изучения их вакцинного потенциала в различных сочетаниях.

Учитывая сконструированную нами ранее и описанную выше (см. главу 5.8.3) серию экспрессионных векторных плазмид pV1, pV2 и pV3, предназначенных для оценки некоторых аспектов вакцинного потенциала любых генетических конструкций, а также успешный опыт применения этих плазмид (Bazhan *et al.*, 2010), мы приступили к разработке схемы экспериментов по получению рекомбинантных плазмид, направляющих в эукариотических клетках синтез всех трех основных иммуногенов – поверхностных гликопротеинов Gn и Gc и N-белка вируса ККГЛ.

К моменту начала работы по получению кандидатных ДНК-вакцинных конструкций против ККГЛ нами уже было установлено, что на территории Российской Федерации вирус ККГЛ представлен очень близкими биовариантами, относящимися к основной европейской генетической группе – Европа 1, тогда как в азиатских странах СНГ (Казахстан, Узбекистан, Таджикистан, Туркменистан) доминирует вирус, представленный одним из типичных азиатских генотипов (Яшина и др., 2002а,б; Петрова и др., 2003; Yashina *et al.*, 2003а,б; Kuhn *et al.*, 2004; Seregin *et al.*, 2004; Серегин и др., 2004, 2006; Туманова и др., 2006; Meissner *et al.*, 2006а,б,с). Нами были определены нуклеотидные последовательности всех сегментов генома вируса для ряда штаммов, причем для некоторых был расшифрован полный геном (Петрова и др., 2003; Seregin *et al.*, 2004; Серегин и др., 2006; Meissner *et al.*, 2006а,с). При этом ряд вирусных сегментов был нами получен в рекомбинантном виде в результате клонирования фрагментов кДНК в составе плазмидных векторов в клетках *E. coli* (Петрова и др., 2003; Seregin *et al.*, 2004).

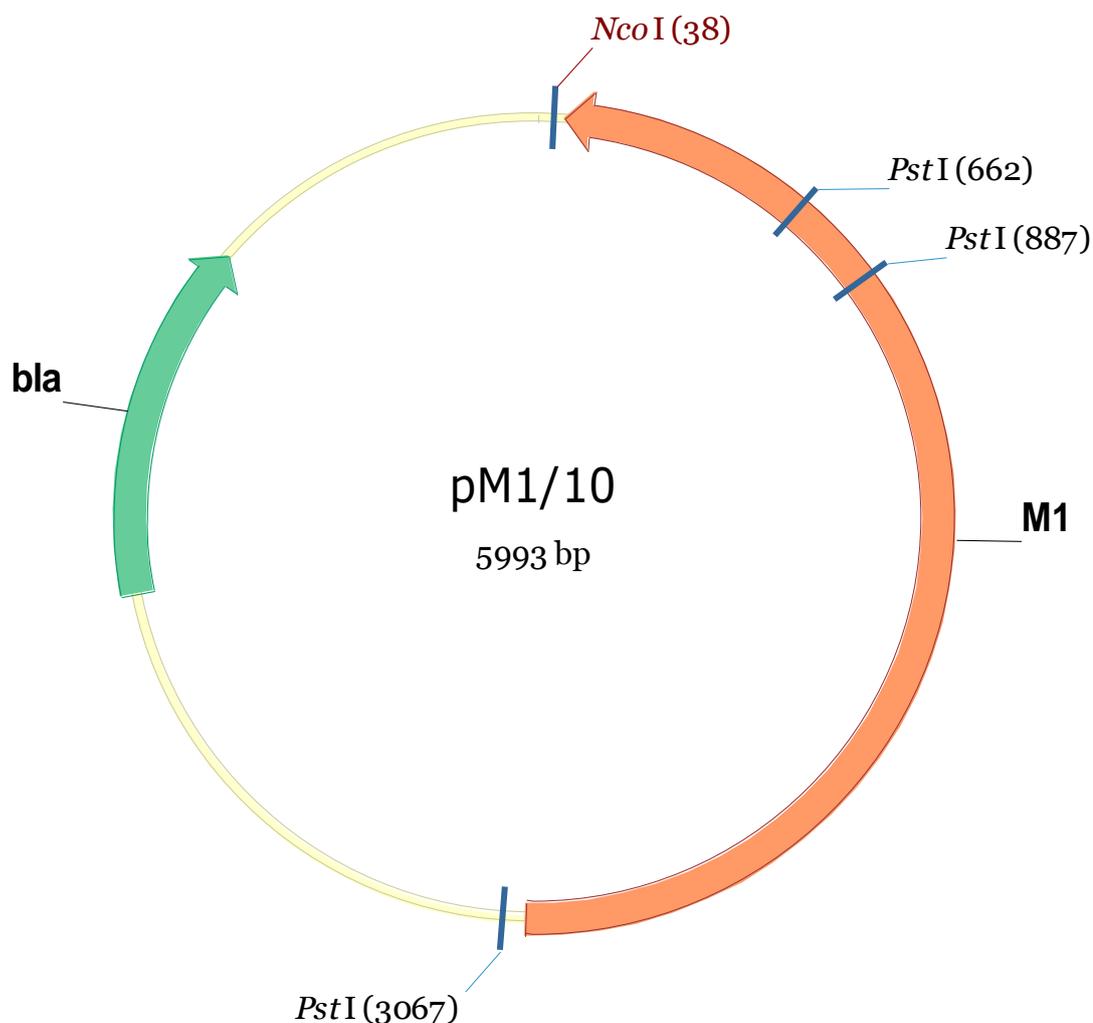
Несмотря на то что по антигенному составу вирус ККГЛ достаточно консервативен, мы остановили свой выбор на плазмидных конструкциях, содержащих фрагменты генома штаммов вируса ККГЛ, типичных для территории России и выделенных относительно недавно в южных регионах страны (рисунки 5.44 – 5.46) и, что немаловажно, не имеющих длительной пассажной истории. Тем самым мы стремились создать варианты кандидатных ДНК-вакцин, способных обеспечить максимальный уровень защиты в первую очередь для населения нашей страны.



Источник ДНК – вирус ККГЛ, штамм STV/HU29223, кДНК геномного S-сегмента вируса, кодирующая N-белок, полноразмерная копия (1–1674 п.н.). Номер регистрации в GenBank: AF481802. Размер фрагмента (вставки) – 1690 п.н. с введенными по концам участками рестрикции *Bam*HI для удобства скрининга. Вектор для клонирования – pGEM-T (Promega, США). Клонирование осуществлялось по выступающим T-концам вектора в клетках *E. coli* XL1-blue.

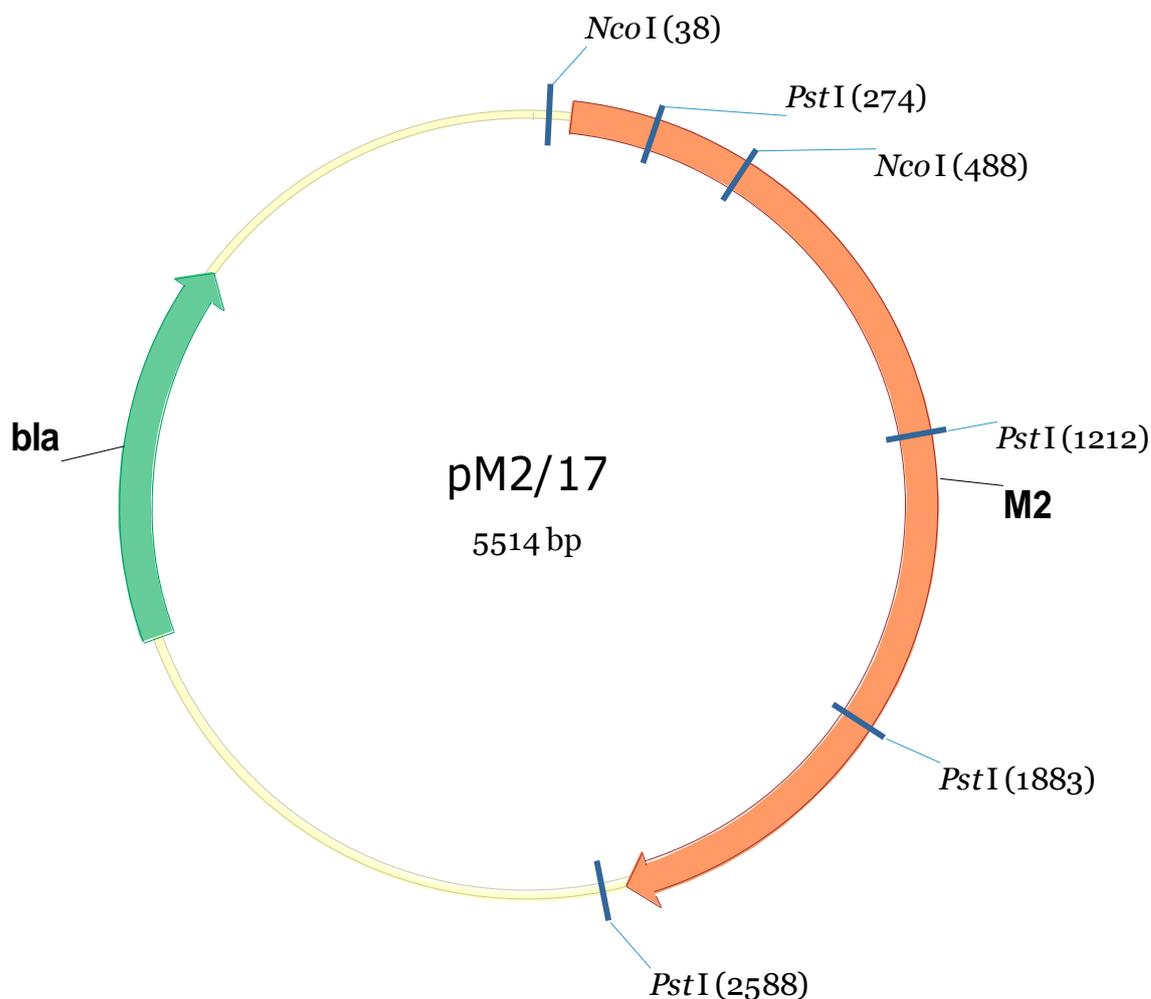
Рисунок 5.44 – Структура плазмиды pS1, содержащей кДНК S-сегмента вируса ККГЛ

В случае S-сегмента – это STV/HU29223, выделенный в 2000 г. от больного в Ставрополе (прошел 1 пассаж на культуре клеток SW-13). В случае M-сегмента – это штамм VLG/TI29414, также изолированный в 2000 г. от клеща *Hyalomma marginatum* в Волгограде (прошел 2 пассажа на клеточной культуре SW-13).



Источник ДНК – вирус ККГЛ, штамм VLG/TI29414, 5'-концевая половина кДНК геномного М-сегмента вируса, кодирующая поверхностный гликопротеин Gp. Координаты фрагмента – 1–2954 п.н. Номер регистрации в GenBank: AY179961. Размер фрагмента (вставки) – 2954 п.н. Вектор для клонирования - pGEM-T Easy (Promega, США). Клонирование осуществлялось по выступающим Т-концам вектора в клетках *E coli* XL1-blue.

Рисунок 5.45 – Структура плазмиды pM1/10, содержащей 5'-концевую половину кДНК геномного М-сегмента вируса ККГЛ



Источник ДНК – вирус ККГЛ, штамм VLG/TI29414, 3'-концевая половина кДНК геномного М-сегмента вируса, кодирующая поверхностный гликопротеин Gc. Координаты фрагмента – 2886–5336 п.н. Номер регистрации в GenBank: AY179961. Размер фрагмента (вставки) – 2451 п.н. Вектор для клонирования - pGEM-T Easy (Promega, США). Клонирование осуществлялось по выступающим Т-концам вектора в клетках *E. coli* XL1-blue.

Рисунок 5.46 – Структура плазмиды pM2/17, содержащей 3'-концевую половину кДНК геномного М-сегмента вируса ККГЛ

Для получения фрагментов М-сегмента, кодирующих зрелые белки Gp и Gc (будем условно их называть генами) на первом этапе клонировали два перекрывающихся фрагмента кДНК, амплифицированных методом ОТ-ПЦР и позволяющих реконструировать полную нуклеотидную последовательность геномного М-сегмента вируса ККГЛ. Причем, плаزمида pM1/10 содержала ген,

кодирующий Gn, а плаزمида pM2/17 – Gc. Подробное описание плазмид дано в подписях к рисункам 5.45 и 5.46.

Описанные рекомбинантные плазмиды, содержащие копии фрагментов генома вируса ККГЛ, мы использовали в качестве матриц в реакции ПЦР для получения генов, кодирующих основные вирусные иммуногены: нуклеокапсидный белок N, поверхностные гликопротеины Gn и Gc. Для этого были рассчитаны праймеры, в структуру которых мы заложили участки узнавания рестриктаз *KpnI* и *PspEI* для клонирования в любой из векторных экспрессионных плазмид, сконструированных ранее и описанных выше – pV1, pV2, pV3 (см. раздел 5.8.3). Все праймеры суммированы в таблице 5.6, сайты узнавания рестриктаз выделены жирным шрифтом, первые буквы в наименовании праймеров указывают на целевой ген, последние обозначают положение (F – прямой, или верхний; R – обратный, или нижний).

Таблица 5.6 – Структура праймеров для получения генов белков N, Gn и Gc вируса ККГЛ

Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Наименование	Длина, нукл.
GCCT GGTACCT GATGGAAAACAAGATCGAGGTGA	NF	34
GCTC GGTCACCT GGATGATGTTGGCACTGGTGG	NR	33
GCCT GGTACCT GTCCGAGGAGCCAGGTG	GnF	28
GCTC GGTCACCT GC AATAGCTTTCTGACATTCCA	GnR	34
GCCT GGTACCT GTTCTTAGACAGTATAGTTAAAGGCA	GcF	37
GCTC GGTCACCT GACCAATGTGTGTTTTTCGTGGA	GcR	34

На этапе клонирования нам предстояло определиться с векторной плазмидой, которая будет использована первой для получения кандидатных ДНК-вакцинных конструкций против ККГЛ. Очевидно, что в идеале было бы правильно проверить все возможные варианты развития иммунного ответа, которые могут обеспечить девять рекомбинантных плазмид. Однако такой объем экспериментальной работы с лабораторными животными представляется длительным и дорогостоящим.

Поэтому целесообразно выбрать одну экспрессионную векторную плазмиду, основываясь на определенных критериях, и после получения результатов по изучению иммуногенности этих кандидатных ДНК-вакцин скорректировать дальнейший ход исследований.

Векторная плазида pV1 оптимизирована для эффективной экспрессии целевых генов, однако не несет никаких элементов, способствующих протеасом-опосредованному освобождению из рекомбинантных белков эпитопов, ответственных за индукцию CTL-ответов. Иными словами, этот плазмидный вектор более подходит для экспрессии генов, продукты которых призваны активировать гуморальное звено иммунитета либо направлять его по пути Т-хелперов через взаимодействие с молекулами МНС-II класса.

Две другие векторные плазмиды обеспечивают генетическое присоединение к целевым иммуногенам последовательности убиквитина (Ub), который может способствовать транспорту такого химерного иммуногена в протеасому для специфического процессинга с образованием коротких пептидов, играющих роль индукторов CTL-ответов после их презентации на поверхности АПК в комплексе с молекулами МНС-I класса, то есть являющихся, по сути, CTL-иммуногенами (Varshavsky *et al.*, 2000; Velders *et al.*, 2001). Все свойства, схемы конструирования и апробация этой серии векторных плазмид подробно изложены выше в главе 5.8.

Отличие между плазмидными векторами pV2 и pV3 состоит в расположении кодирующей последовательности Ub относительно целевого гена (см. главы 5.8.2 и 5.8.3). Первые результаты по использованию этих векторных плазмид показали, что с указанной функцией лучше справляется Ub, будучи расположенным на N-конце (плазида pV2) химерного иммуногена (Bazhan *et al.*, 2010), тогда как его С-концевое расположение (плазида pV3) в меньшей степени обеспечивает протеасом-опосредованное освобождение CTL-эпитопов.

Поскольку хотелось бы создать конструкции, обеспечивающие в равной, желательно высокой, степени активацию и клеточного, и гуморального звена иммунитета, на первом этапе мы приняли решение клонировать гены вируса ККГЛ в составе плазмидного вектора pV3, чтобы избежать слишком активного протеасомного расщепления иммуногенов, которое может направить иммунный

ответ исключительно по Т-клеточному пути с превалированием СТЛ-ответов в ущерб развитию гуморального иммунитета.

Все три гена целевых вирусных иммуногенов были успешно клонированы в составе векторной плазмиды pV3, как это подробно описано выше для полиэпитопных иммуногенов, индуцирующих СТЛ-ответы против ВИЧ-1 (см. главу 5.8.4). Целевые рекомбинантные плазмиды, являющиеся кандидатными ДНК-вакцинами против ККГЛ, получили наименования: pV3N, pV3Gc и pV3Gn.

Первые эксперименты по изучению иммуногенного потенциала кандидатных ДНК-вакцин, проведенные на мышах линии Balb/c, показали обнадеживающие результаты. Как и предполагалось, совместное введение рекомбинантных плазмид обеспечивает более высокие показатели как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. В настоящее время подготовлен пакет документов, выпущена и заложена на хранение опытная серия кандидатной ДНК-вакцины против ККГЛ.

Таким образом, предложенный здесь подход к созданию кандидатных ДНК-вакцин против ККГЛ, основанный на использовании сконструированной нами универсальной серии векторных экспрессионных плазмид, продемонстрировал обнадеживающие результаты, однако научно-поисковые работы в этом направлении, безусловно, требуют своего продолжения.

6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возникновение, развитие и совершенствование методов генетической инженерии открыло новые горизонты в биологических и медицинских науках. Одним из главных, вполне осязаемых, достижений можно считать получение многих биологически-активных веществ (БАВ) в рекомбинантном виде. К ним относятся гормоны, цитокины и другие белковые факторы, которые обеспечивают согласованность действия различных систем организма человека как в нормальных условиях, так и в патологических. Получение таких белков в рекомбинантном виде зачастую является единственным способом создания на их основе новых медицинских препаратов для диагностики, профилактики заболеваний и лечения различных патологических состояний.

Решение таких задач напрямую связано с разработкой новых и усовершенствованием существующих систем клонирования и экспрессии генетического материала, оптимизацией рекомбинантных молекул ДНК, разработкой эффективных методов выделения целевых белков из клеточной биомассы продуцентов.

В данной работе была поставлена и успешно решена задача создания надежных экспрессионных векторных плазмид и их использования для получения ряда бактериальных штаммов-продуцентов белков-иммуномодуляторов различного происхождения, перспективных для нужд современной медицины. Была сконструирована оригинальная векторная плазида pRTU1, содержащая эффективные транскрипционные элементы и обеспечивающая клонирование и высокий уровень экспрессии различных генов в клетках *E. coli*. Этот эффект достигается за счет наличия сильного индуцибельного промотора гена *recA* *Proteus mirabilis*, *trpA*-терминатора *E. coli* и протяженного полилинкерного участка с большим набором уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз рестрикции.

С использованием векторной плазмиды pRTU1 были получены бактериальные штаммы-продуценты ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: IL-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы; анафилатоксина C5a человека;

ангиогенина человека; белка вируса натуральной оспы, гомологичного рецептору γ -IFN человека, двух штаммов – высоковирулентного и слабовирулентного.

Некоторые из полученных рекомбинантных белков обладают очень хорошим иммунотерапевтическим и/или диагностическим потенциалом.

Отсутствие эффективных противовирусных препаратов оставляет вакцинопрофилактику едва ли не единственным специфическим средством сдерживания некоторых опасных вирусных инфекционных заболеваний, к которым можно отнести ВИЧ/СПИД и ККГЛ. Однако эффективные и безопасные вакцины против этих опасных инфекций до сих пор не разработаны, что предопределяет огромную актуальность этого направления научных исследований.

Перспективным решением поставленной задачи следует признать создание ДНК-вакцин – нового подхода к вакцинопрофилактике вирусных инфекционных заболеваний, основанного на достижениях генетической инженерии. Определяющую роль в создании таких вакцин играет усовершенствование существующих и разработка новых генетических конструкций, на основе которых возможно получение рекомбинантных молекул ДНК, обладающих желаемыми свойствами, обеспечивающими эффективную защиту от конкретных вирусных инфекций.

Совершенно очевидно, что для решения таких задач необходимо обладать знаниями о генетическом и антигенном разнообразии того или иного инфекционного агента, для чего желательно применять современные надежные методы его обнаружения в биологических образцах и генотипирования.

Таким образом, настоящая работа посвящена разработке подходов к созданию оригинальных методов диагностики и генотипирования вируса ККГЛ, основанных на ОТ-ПЦР и ПДРФ, а также конструированию серии экспрессионных векторов с целью получения на их основе ряда рекомбинантных плазмид, обладающих хорошим иммуногенным потенциалом в отношении ВИЧ-1 и ККГЛ.

В работе также приведены результаты по получению нуклеокапсидного белка N вируса ККГЛ европейского и азиатского штаммов в рекомбинантном виде, который обладает антигенными свойствами вируса и является перспективным кандидатом в качестве компонента различных тест-систем для диагностики ККГЛ. Результаты этих исследований защищены пятью патентами РФ на изобретения,

тест-система по выявлению РНК вируса ККГЛ была запущена в производство в ЗАО «Вектор-Бест» (п. Кольцово, Новосибирская область). Полученные результаты послужили основой для разработки кандидатных ДНК-вакцин против ККГЛ.

В процессе решения поставленных нами задач в настоящей работе осуществлено получение рекомбинантной плазмиды рсDNA-TCl, содержащей под контролем CMV-промотора искусственный ген TCl, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, который также был синтезирован в ходе выполнения данной работы. Эта генетическая конструкция в настоящее время успешно используется в ГНЦ ВБ «Вектор» для создания новых вакцинных препаратов против ВИЧ-1. Сама рекомбинантная ДНК и полученные на ее основе перспективные вакцинопрофилактические препараты защищены тремя патентами Российской Федерации на изобретения.

В продолжение ДНК-вакцинной тематики нами разработана и сконструирована серия оригинальных векторных плазмид (pV1, pV2, pV3) на основе рсDNA3.1-семейства, обеспечивающая эффективное получение набора кандидатных ДНК-вакцин с целью сравнительного изучения различных аспектов их вакцинного потенциала, в частности, для изучения влияния убиквитинзависимой презентации эпитопов иммуногенов по пути MHC-I класса, индуцирующей ответы CD8+ CTL, на иммуногенность.

На основе векторов pV1, pV2, pV3, получен набор рекомбинантных плазмидных ДНК, предназначенных для создания перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ-1 и ККГЛ, основанный на девяти искусственных генах полиэпитопных CTL-иммуногенов, обеспечивающих различные стратегии процессинга и презентации эпитопов ВИЧ-1, и трех генах структурных белков вируса ККГЛ, кодирующих нуклеокапсидный белок N и зрелые поверхностные гликопротеины Gp и Gc. Особо следует отметить, что потенциально кандидатные вакцины ориентированы на применение в Российской Федерации благодаря выбору генов, типичных для биовариантов ВИЧ-1 и вируса ККГЛ, циркулирующих на территории нашей страны в настоящее время.

7 ВЫВОДЫ

1. Обоснована и впервые подтверждена экспериментально возможность использования кассеты «промотор гена *recA P. mirabilis* – полилинкер – терминатор транскрипции *t_{trpA} E. coli*» для эффективной экспрессии чужеродных генов в клетках *E. coli*. С использованием данной кассеты сконструирована экспрессионная векторная плазмида pRTU1, на основе которой получены продуценты ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе:
 - интерлейкина-2 человека и двух его мутантных аналогов (уровень синтеза целевых рекомбинантных белков составил 45-55 мкг/мл бактериальной культуры);
 - двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы (5-6 мкг/мл для AIL и 30-40 мкг/мл для ILA);
 - белка вируса натуральной оспы, гомологичного рецептору γ -интерферона человека, двух штаммов – высоковирулентного (India-1967) и низковирулентного (Garcia-1966) с содержанием целевых рекомбинантных белков 30-40 мкг в 1 мл бактериальной культуры;
 - ангиогенина человека (до 15 мкг/мл);
 - анафилатоксина C5a человека (до 2 мкг/мл).
2. Разработана и реализована оригинальная блочная схема синтеза искусственного гена TCI, кодирующего множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1. Сконструированы рекомбинантные плазмиды pBK-RSV-TCI и pcDNA-TCI, обеспечивающие экспрессию этого гена в эукариотических клетках под контролем сильных вирусных промоторов (промотор из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса и предранний промотор цитомегаловируса соответственно). По результатам сравнительного изучения их иммуногенности была отобрана плазмида pcDNA-TCI для разработки кандидатных вакцин против ВИЧ-1.
3. На основе плазмиды pcDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ* осуществлен авторский дизайн и конструирование серии экспрессионных векторов (pV1, pV2, pV3), обеспечивающих универсальность клонирования целевых генов, для изучения

- влияния на иммуногенность полученных ДНК-вакцинных конструкций убиквитинзависимого процессинга синтезируемых антигенов и презентации генерируемых эпитопов CD8+ Т-лимфоцитам по пути МНС-I класса.
4. На основе векторов pV1, pV2, pV3 создан оригинальный набор рекомбинантных ДНК-вакцинных конструкций против ВИЧ-1 и ККГЛ, в том числе:
 - девять рекомбинантных плазмид, кодирующих структурные варианты полиэпитопных СТЛ-иммуногенов, обеспечивающих различные стратегии процессинга и презентации эпитопов ВИЧ-1;
 - три плазмиды, кодирующие структурные белки вируса ККГЛ (нуклеокапсидный белок N и зрелые поверхностные гликопротеины Gn и Gc), характерные для биовариантов, циркулирующих на территории России.
 5. Впервые разработана экспресс-диагностика ККГЛ, основанная на методах ОТ-ПЦР и ПДРФ, обеспечивающая надежное обнаружение вирусной РНК в биологических образцах и позволяющая проводить первичное генотипирование различных биовариантов вируса.
 6. Продемонстрировано, что полученный в работе рекомбинантный нуклеокапсидный белок N может быть использован в качестве положительного контрольного антигена при скрининге моноклональных антител к вирусу ККГЛ и как компонент диагностических тест-систем по обнаружению антигена вируса ККГЛ в клинических образцах методами ИФА и флуоресцирующих антител.

8 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

8.1 Работы, опубликованные в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Серегин С.В.**, Рябинин В.А., Синяков А.Н., Данилюк Н.К., Поздняков С.Г. Реконструкция синтетического гена интерлейкина-2 человека. // Биоорг. химия. – 1990. – Т. 16. – № 6. – С. 759-764.
2. Данилюк Н.К., **Серегин С.В.**, Синяков А.Н., Серпинский О.И., Бабкина И.Н., Урманова М.А., Рябинин В.А., Поздняков С.Г. Эффективный синтез и клонирование гена интерлейкина-2 человека и его аналога; экспрессия в клетках *E. coli* гена интерлейкина-2. // Биоорг. химия. – 1991. – Т. 17. – № 6. – С. 779-788.
3. **Серегин С.В.**, Синяков А.Н., Поздняков С.Г., Камынина Т.П., Козлов Ю.В., Сахно Л.В., Сандахчиев Л.С. Новые гибридные белки – потенциальные иммуносупрессорные агенты. // ДАН. – 1992. – Т. 325. – № 5. – С. 1081-1084.
4. **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Синяков А.Н., Камынина Т.П., Ильюкова Л.В., Сахно Л.В. Эффективная экспрессия в клетках *E.coli* генов интерлейкина-2 человека и его мутантных аналогов. // Молекул. биол. – 1993. – Т. 27. – № 1. – С. 72-80.
5. **Серегин С.В.**, Синяков А.Н., Поздняков С.Г., Козлов Ю.В., Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Номоконова Н.Ю. Получение гибридных белков, состоящих из интерлейкина-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы. // Молекул. биол. – 1993. – Т. 27. – № 4. – С. 763-772.
6. Бабкина И.Н., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Синяков А.Н., Гладкова С.Е., Поздняков С.Г. Химико-ферментативный синтез, клонирование и экспрессия гена аналога человеческого анафилотоксина С5а. // Биоорг. химия. – 1995. – Т. 21 – № 5. – С. 359-364.
7. **Seregin S.V.**, Babkina I.N., Nesterov A.E., Sinyakov A.N., Shchelkunov S.N. Comparative studies of gamma-interferon receptor-like proteins of variola major and variola minor viruses. // FEBS Lett. – 1996. – V. 382. – № 1-2. – P. 79-83.
8. **Серегин С.В.**, Бабкина И.Н., Нестеров А.Е., Синяков А.Н., Щелкунов С.Н. Продукция в клетках *E.coli* белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору гамма-интерферона человека. // Молекул. биол. – 1996. – Т. 30. – № 3. – С. 692-700.

9. **Серегин С.В.**, Бабкина И.Н., Нестеров А.Е., Синяков А.Н., Щелкунов С.Н., Сандахчиев Л.С. Вирус натуральной оспы кодирует белок, подавляющий противовирусную активность гамма-интерферона человека. // ДАН. – 1996. – Т. 346. – № 1. – С. 122-124.
10. Никонова А.А., **Серегин С.В.**, Чикаев Н.А., Мишин В.П., Бабкина И.Н., Мертвецов Н.П. Экспрессия синтетического гена ангиогенина человека в клетках E.coli. // Биоорган. химия. – 1996. – Т. 22. – № 12. – С. 891-893.
11. Яшина Л.Н., Петров В.С., Вышемирский О.И., Аристова В.А., Москвина Т.М., Львов Д.К., Петрова И.Д., Гуторов В.В., Тюнников Г.И., Кузина И.И., Самохвалов Е.И., **Серегин С.В.**, Нетесов С.В. Характеристика вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и республиках Средней Азии. // Вопр. вирусол. – 2002. – Т. 47. – № 3. – С. 11-15.
12. Яшина Л.Н., Петров В.С., Петрова И.Д., Гуторов В.В., Казаков С.В., Оспанов К.С., Каримов С.К., Тюнников Г.И., **Серегин С.В.**, Кузина И.И., Бабкин И.В., Нетесов С.В. Генетическая идентификация вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки во время эпидемической вспышки в Казахстане в 2000 г. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2002. – № 4. – С. 31-35.
13. Петрова И.Д., **Серегин С.В.**, Петров В.С., Вышемирский О.И., Кузина И.И., Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Яшина Л.Н., Нетесов С.В. Генетическая характеристика S-сегмента РНК двух штаммов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, изолированных на юге России и в Узбекистане. // Вопр. вирусол. – 2003. – Т. 48. – № 2. – С. 8-11.
14. Yashina L., Petrova I., **Seregin S.**, Vyshemirskii O., Lvov D., Aristova V., Kuhn J., Morzunov S., Gutorov V., Kuzina I., Tyunnikov G., Netesov S., Petrov V. Genetic variability of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia. // J. Gen. Virol. – 2003. – V. 84. – Pt 5. – P. 1199-1206.
15. Yashina L., Vyshemirskii O., **Seregin S.**, Petrova I., Samokhvalov E., Lvov D., Gutorov V., Kuzina I., Tyunnikov G., Tang Y.-W., Netesov S., Petrov V. Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia. // J. Clin. Microbiol. – 2003. – V. 41. – № 2. – P. 860-862.

16. **Seregin S.V.**, Samokhvalov E.I., Petrova I.D., Vyshemirskii O.I., Samokhvalova E.G., Lvov D.K., Gutorov V.V., Tyunnikov G.I., Shchelkunov S.N., Netesov S.V., Petrov V.S. Genetic characterization of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains isolated in Russia and Tajikistan. // *Virus Genes*. – 2004. – V. 28. – № 2. – P. 187-193.
17. **Серегин С.В.**, Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Петрова И.Д., Львов Д.К., Громашевский В.Л., Самохвалов Е.И., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Тишкова Ф.Х., Данияров О.А., Нетесов С.В., Петров В.С. Изучение генетической variability вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в странах Средней Азии. // *ДАН*. – 2004. – Т. 398. – № 5. – С. 705-708.
18. Kuhn J.H., **Seregin S.V.**, Morzunov S.P., Petrova I.D., Vyshemirskii O.I., Lvov D.K., Tyunnikov G.I., Gutorov V.V., Netesov S.V., Petrov V.S. Genetic analysis of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains involved in the recent outbreaks in Russia. // *Arch. Virol.* – 2004. – V. 149. – № 11. – P. 2199-2213.
19. Бажан С.И., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Бабкина И.Н., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Агафонов А.П., Игнатъев Г.М., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Конструирование искусственного иммуногена, кандидата ДНК-вакцины, кодирующей множественные CTL-эпитопы ВИЧ-1. // *ДАН*. – 2004. – Т. 395. – № 6. – С. 825-827.
20. Bazhan S.I., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryvaeva V.A., Aborneva I.V., Ilyichev A.A. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL epitopes of major HIV-1 antigens. // *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – № 13-14. – P. 1672-1682.
21. Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Ilyichev A.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Zaitsev B.N., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Babkina I.N., Bazhan S.I. Comparative analysis of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated *Salmonella* strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen. // *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – № 13-14. – P. 1692-1699.

22. Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Игнатъев Г.М., Агафонов А.П., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Бажан С.И. Использование различных систем доставки ВИЧ-1 ДНК-вакцины, кодирующей поли-CTL-эпитопный иммуноген. // Вестник РАМН. – 2005. – № 1. – С. 41-44.
23. Онищенко Г.Г., Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Kuhn J., **Серегин С.В.**, Тюнников Г.И., Петрова И.Д., Тишкова Ф.Х., Оспанов Х.С., Казаков С.В., Каримов С.К., Есмагамбетова А.С., Нетесов С.В., Петров В.С. Исследование вирусофортности иксодовых клещей в очагах Крымской-Конго геморрагической лихорадки Казахстана и Таджикистана. // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. – 2005. – № 1. – С. 27-31.
24. Онищенко Г.Г., Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Kuhn J., **Серегин С.В.**, Тюнников Г.И., Петрова И.Д., Тишкова Ф.Х., Оспанов Х.С., Казаков С.В., Каримов С.К., Есмагамбетова А.С., Нетесов С.В., Петров В.С. Исследование методами ИФА и ОТ-ПЦР вирусофортности иксодовых клещей, собранных в очагах Крымской-Конго геморрагической лихорадки Казахстана и Таджикистана в 2001-2002 гг. // Вопр. вирусол. – 2005. – Т. 50. – № 1. – С. 23-26.
25. **Серегин С.В.**, Туманова И.Ю., Петрова И.Д., Яшина Л.Н., Кузина И.И., Вышемирский О.И., Гуторов В.В., Серегин С.С., Тюнников Г.И., Самохвалов Е.И., Львов Д.К., Нетесов С.В., Петров В.С. Особенности S-сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и Болгарии. // Вопр. вирусол. – 2006. – Т. 51. – № 3. – С. 25-32.
26. Туманова И.Ю., **Серегин С.В.**, Вышемирский О.И., Гуторов В.В., Петрова И.Д., Тюнников Г.И., Оспанов К.С., Казаков С.В., Каримов С., Тишкова Ф.Х., Пиров А.П., Нетесов С.В., Петров В.С. Генетический мониторинг вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в Казахстане и Таджикистане в период 2001-2003 гг. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2006. – № 2. – С. 36-41.
27. Meissner J.D., Seregin S.S., **Seregin S.V.**, Vyshemieskii O.J., Yakimenko N.V., Netesov S.V., Petrov V.S. The complete genomic sequence of Strain

- ROS/HUVLV-100, a representative Russian Crimean Congo hemorrhagic fever virus strain. // *Virus Genes*. – 2006 – V. 33. – № 1. – P. 87-93.
28. Meissner J.D., Seregin S.S., **Seregin S.V.**, Vyshemirskii O.I., Samokhvalov E.I., Lvov D.K., Netesov S.V., Petrov V.S. A variable region in the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment distinguishes between strains isolated from different geographic regions. // *J. Med. Virol.* – 2006. – V. 78. – № 2. – P. 223-228.
29. Meissner J.D., Seregin S.S., **Seregin S.V.**, Vyshemirskii O.I., Samokhvalov E.I., Lvov D.K., Netesov S.V., Petrov V.S. Complete L segment coding-region sequences of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains from the Russian Federation and Tajikistan. // *Arch. Virol.* – 2006. – V. 151. – № 3. – P. 465-475.
30. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ерошкин А.М., Лебедев Л.Р., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Плясунова О.А., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Даниленко Е.Д., Зайцев Б.Н., Масычева В.И., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Вакцина “КомбиВИЧвак”, содержащая В- и Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1. // *ДАН*. – 2007. – Т. 413. – № 4. – С. 553-556.
31. Karpenko L.I., Plyichev A.A., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Zaitsev B.N., Danilenko E.D., Masicheva V.I., Bazhan S.I. Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine. Design, immunogenicity and toxicity studies. // *Vaccine*. – 2007. – V. 25. – № 21. – P. 4312-4323.
32. Bazhan S.I., Karpenko L.I., Plyicheva T.N., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Antonets D.V., Plyichev A.A. Rational design based synthetic polyepitope DNA vaccine for eliciting HIV-specific CD8+ T cell responses. // *Mol. Immunol.* – 2010. – V. 47. – № 7-8. – P. 1507-1515.
33. **Серегин С.В.**, Серегин С.С., Петров В.С., Тюнников Г.И., Якименко Н.В., Сергеев А.Н. Дифференциация генетических вариантов вирусов Крымской-Конго геморрагической лихорадки. // *Вопр. вирусол.* – 2011. – Т. 56. – № 1. – С. 30-33.
34. **Серегин С.В.**, Петров В.С., Гришаев М.П. Методы диагностики Крымской-Конго геморрагической лихорадки. // *Молекул. генетика, микробиол. и вирусол.* – 2013. – № 4. – С. 26-31.

35. Храпова Н.П., Антонов В.А., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Корсакова И.И., Голосеев Ю.А., Пьянков О.В., Пьянков С.А., **Серегин С.В.**, Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Получение моноклональных антител и перспективы их использования в качестве основы иммунодиагностических средств обнаружения вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки. // Пробл. особо опасных инфекций. – 2015. – Вып. 1. – С. 89-93.

8.2 Патенты

1. Петров В.С., Петрова И.Д., Тюнников Г.И., **Серегин С.В.**, Яшина Л.Н., Кузина И.И. Набор олигонуклеотидов-праймеров для идентификации РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2209830 от 20.08.2001.
2. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Некрасова Н.А., Белавин П.А., Данилюк Н.К., **Серегин С.В.**, Бабкина И.Н., Игнатъев Г.М., Агафонов А.П., Бойченко М.Н., Воробьев А.А., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Рекомбинантная плазмидная ДНК рсDNA-TСI, обеспечивающая экспрессию искусственного гена ТСI в клетках эукариот, и рекомбинантный аттенуированный штамм бактерий *Salmonella enteritidis* E-23/рсDNA-TСI как кандидат для конструирования живой ДНК-вакцины против вируса иммунодефицита человека. Патент РФ на изобретение № 2248396 от 17.04.2003.
3. Бажан С.И., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Бабкина И.Н., Данилюк Н.К., Сандахчиев Л.С. Искусственный белок-иммуноген ТСI, содержащий множественные СТL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, искусственный ген ТСI, кодирующий полиэпитопный белок-иммуноген ТСI. Патент РФ на изобретение № 2238946 от 27.10.2004.
4. **Серегин С.В.**, Петров В.С., Туманова И.Ю., Петрова И.Д., Тюнников Г.И. Набор олигонуклеотидных праймеров для идентификации РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в полевых и клинических образцах. Патент РФ на изобретение № 2294963 от 03.03.2005.
5. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Л., Некрасова Н.А., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Ерошкин А.М., Ильичев А.А. Рекомбинантная

вакцина против вируса иммунодефицита человека 1 типа. Патент РФ на изобретение № 2317107 от 10.01.2006.

6. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., **Серегин С.В.**, Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. ССНФV-Vd-1 – продуцент моноклонального антитела 4G₄/V₆ к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2535982 от 10.10.2013.
7. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., **Серегин С.В.**, Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. ССНФV-Vd-2 – продуцент моноклонального антитела 1E₂/E₅ к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2528868 от 10.10.2013.
8. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., **Серегин С.В.**, Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. ССНФV-Vd-3 – продуцент моноклонального антитела 3H₆/F₂ к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2528869 от 10.10.2013.

8.3 Работы, опубликованные в сборниках научных трудов, материалах конференций и других изданиях

1. **Серегин С.В.**, Поздняков С.Г. Получение, клонирование и экспрессия ген-эквивалентов аналогов человеческого интерлейкина-2. // Актуальные проблемы биотехнологии: Материалы 2 отрасл. конфер. молодых ученых. 25-27 апреля 1990 п. Кольцово. 1990. С. 8-10.
2. Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Daniliuk N.K., Babkina I.N., Eroshkin A.M., Bazhan S.I. Synthesis of gene coding the artificial immunogen, a candidate for

- CTL vaccine against HIV-1. // Russian Journal of HIV/AIDS and Related Problems. – 1999. – V. 3. – № 1. – P. 145.
3. Bazhan S.I., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Daniljuk N.K., Babkina I.N., Ivanisenko V.A., Eroshkin A.M. Design and construction of artificial CTL immunogen, a candidate in DNA vaccine against HIV-1. Reports of Advanced Research Workshop "Assessment of Sponsored Biological Research in Russia for the New Millennium" (Initiatives for Proliferation Prevention; International Science and Technology Center; Ministry of Science and Technologies of Russia; North Atlantic Treaty Organization. September 2-4 1999. SRC VB "Vector". Novosibirsk. Russia.
<http://www.vector.nsc.ru/conf0999/posters/bazhan/bazhan.htm>.
 4. Yashina L., Vishemirski O., Petrova I., Lvov D., Aristova V., **Seregin S.**, Netesov S., Petrov V. Genetic identification of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolates circulating in NIS countries. European Meeting on Viral Zoonoses. October 13-16 2001. St. Raphael. France. Abstr. book. 2001. P. 54.
 5. Petrov V., Petrova I., Yashina L., Vyshemirsky O., **Seregin S.**, Tyunnikov G., Aristova V., Kuhn J., Morzunov S., Goutorov V., Lvov D., Netesov S. Genetic Variability of Russian and Central Asian Virus Strains of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (C-CHF). XII-th International Congress of Virology. Paris. France. 27th July to 1st August 2002. Abstr. book. V. 947. P. 318.
 6. Вышемирский О.И., Петрова И.Д., Гришаева О.Н., **Серегин С.В.**, Тюнников Г.И., Нетесов С.В., Петров В.С. Диагностика Крымской-Конго геморрагической лихорадки методом обратной транскрипции–полимеразной цепной реакции. // Генодиагностика инфекционных заболеваний. 4-я Всерос. Науч.-практ. конф. Москва. 2002 г. Сб. тез. С. 272.
 7. **Серегин С.В.**, Петрова И.Д., Яшина Л.Н., Кузина И.И., Вышемирский О.И., Аристова В.А., Москвина Т.М., Львов Д.К., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Нетесов С.В., Петров В.С. Характеристика вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и странах СНГ. // Русский журнал ВИЧ, СПИД и родственные проблемы. – 2002. – Т. 6 – № 1. – С. 144.

8. Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Бажан С.И., Бабкина И.Н., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Игнатъев Г.М., Агафонов А.П., Нестеров А.Е., Рязанкин И.А., Поздняков С.Г., Щелкунов С.Н., Масычева В.И., Сизов А.А., Пустошилова Н.М., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д., Лебедев Л.Р., Кашперова Т.А., Терещенко Т.А., Одегов А.М., Литовченко Л.Л., Федосова Л.К., Афиногенова Г.Н., Михайлова В.И., Меламед Н.В., Веремейко Т.А., Хомякова С.Н., Некрасова Н.А., Савкин И.В., Воробьева М.С., Жучков А.В., Шекшеев Э.М., Сандахчиев Л.С. Разработка генно-инженерных вакцин против ВИЧ/СПИД на основе векторных систем, включающих искусственные гены, кодирующие актуальные антигенные детерминанты ВИЧ. // Аллергия, астма и клин. иммунол. – 2003. – № 9. – С. 121-125.
9. Туманова И.Ю., Серегин С.В., Тишкова Ф.Г., Гуторов В.В., Петрова И.Д., Тюнников Г.И., Оспанов К.С., Нетесов С.В., Петров В.С. Изучение генетических особенностей вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего на территории республик Центральной Азии. // Прогресс в фундаментальных и прикладных науках для здоровья человека. Междунар. междисциплинарный конгр. Науч. дискус. клуб. Судак. Крым. Украина. 10-21 июня 2004. С. 153.
10. Бажан С.И., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Бабкина И.Н., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Игнатъев Г.М., Агафонов А.П., Ильичев А.А. Синтетическая поли-СТЛ-эпитопная ДНК-вакцина против ВИЧ-1. // Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний: Междунар. конф. «Сосновка». Новосибирская обл. 8-10 сент. 2004. Новосибирск: ЦЭРИС. 2004. С. 235-236.
11. Петров В.С., **Серегин С.В.**, Петрова И.Д., Вышемирский О.И., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Туманова И.Ю., Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Аристова В.А., Оспанов К.С., Тишкова Ф.Х., Нетесов С.В. Изучение структуры генома изолятов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в странах СНГ. // Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний: Междунар.

- конф. «Сосновка». Новосибирская обл. 8-10 сент. 2004. Новосибирск: ЦЭРИС. 2004. С. 118.
12. Серегин С.С., Meissner J.D., **Серегин С.В.**, Вышемирский О.И., Нетесов С.В., Петров В.С. Анализ генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и странах СНГ. // Генодиагностика инфекционных болезней: Материалы Рос. науч.-практ. конф. «Сосновка». Новосибирская обл. 25-27 окт. 2005. Новосибирск: ЦЭРИС. 2005. С. 86-87.
13. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Левагина Г.М., Терещенко Т.А., Ужаченко Р.В., Ильичев А.А. Кандидатные вакцины против ВИЧ-1 на основе полиэпитопных белков. // Физико-химическая биология: Сб. трудов Междунар. конф., посвящ. 80-летию академика Д. Г. Кнорре. 30 июля – 3 авг. 2006. Новосибирск. С. 40.
14. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Веремейко Т.А., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Левагина Г.М., Терещенко Т.А., Ужаченко Р.В., Ильичев А.А. Кандидатные вакцины против ВИЧ-1 на основе полиэпитопных белков (инъекционная и суппозитарная формы). // Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера: Тез. докл. III Росс. науч. конф. с междунар. участием. Новосибирск. 27-29 сент. 2006. Новосибирск: ЦЭРИС. 2006. С. 71-72.
15. **Серегин С.В.**, Петрова И.Д., Вышемирский О.И., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Туманова И.Ю., Серегин С.С., Самохвалов Е.И., Яшина Л.Н., Львов Д.К., Казаков С.В., Оспанов К.С., Нетесов С.В., Кривуля С.Д., Петров В.С. Изучение генетической вариабельности штаммов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующих в России и странах Средней Азии. // Арбовирусы и арбовирусные инфекции: Материалы науч.-практ. конф. Астрахань. 17-20 окт. 2006. Москва: 2007. С. 52-56.
16. Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Лебедев Л.Р., Некрасова Н.А., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Левагина Г.М., Веремейко Т.А., Ужаченко Р.В., Даниленко Е.Д., Богрянцева М.П., Прокуда О.В., Бажан С.И.

- Инъекционная и суппозитарная формы кандидатных вакцин против ВИЧ-1, разрабатываемых в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Материалы IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. 26-27 апр. 2007. В 3 т. Т. 1. С. 68.
17. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Веремейко Т.А., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Даниленко Е.Д., Масычева В.И., Ильичев А.А. Дизайн, конструирование и доклинические испытания вакцины «КОМБИВИЧВАК», объединяющей полиэпитопные В- и Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1. Материалы IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. 26-27 апр. 2007. В 3 т. Т. 1. С. 68-69.
18. Bazhan S.I., Belavin P.A., Ilyicheva T.N., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Veremeiko T.A., Gashnikova N.M., Irvine K., Gibbs J., Bennink J.R., Yewdell J.W. Optimization of artificial polydeterminant DNA vaccines for eliciting high levels of HIV-specific CD8+ CTL responses. Workshop on Perspectives and Potential for HIV Vaccine Development. St. Petersburg. Russian Federation. June 1-2 2007.
19. Bazhan S.I., Belavin P.A., Ilyicheva T.N., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Karpenko L.I. Optimization of artificial polydeterminant DNA vaccine constructs for eliciting high levels of HIV-specific CD8+ CTL responses. Keystone Symposia Global Health Series. HIV Vaccines: Progress and Prospects. March 27 - April 1 2008. Banff. Alberta. Canada. Abstr. book (A 111). P. 83.
20. Белавин П.А., Ильичева Т.Н., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Карпенко Л.И. Оптимизация структуры искусственных полиэпитопных иммуногенов для индукции высоких уровней ВИЧ-специфических ответов цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+CTL). 2-я междунар. конф. по вопросам ВИЧ/СПИД в Восточной Европе и Центральной Азии (ЕЕСААС 2008). 3-5 мая 2008. Москва. Сб. тез. Москва. 2008. С. 18.
21. Бажан С.И., Белавин П.А., Ильичева Т.Н., **Серегин С.В.**, Карпенко Л.И. Оптимизация структуры искусственного поли-СТЛ-эпитопного иммуногена – кандидата ДНК-вакцины против ВИЧ-1. Биотехнология в Казахстане: Проблемы и перспективы инновационного развития: Междунар. науч.-

- практич. конф., посвящ. 50-летию науч.-исслед. ин-та пробл. биол. безопасности. Алматы. 19-21 мая 2008. Сб. тез. Алматы. 2008. С. 448-449.
22. Bazhan S., Belavin P., Ilyicheva T., Ilyichev A., **Seregin S.**, Karpenko L. Optimization of Artificial Polyepitope Immunogen for Eliciting High Levels of HIV-Specific CD8+CTL. AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES. Oct. 2008. V. 24. P. 94. Suppl. 1.
23. Bazhan S., Belavin P., Ilyicheva T., Ilyichev A., **Seregin S.**, Karpenko L. Optimization of Artificial Polyepitope Immunogen for Eliciting High of Levels of HIV-Specific CD8+ CTL Responses. AIDS Vaccine 2008. 13-16 Oct. 2008. Cape Town. South Africa. Abstr. book. P12-03. P. 166.
24. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Ужаченко Р.В., Козлова Н.С., Даниленко Е.Д., Богрянцева М.П., Масычева В.И., Ильичев А.А. «КомбиВИЧвак» – перспективная платформа для создания анти-ВИЧ-вакцин. Рабочее совещание по рассмотрению хода выполнения распоряжения Правительства РФ от 25 дек. 2007 г. № 1905-р. Новосибирск. 20-21 февр. 2009. Сб. докл. и материалов. Новосибирск: ЦЭРИС. 2009. С. 75-85.
25. Oreshkova S., Bazhan S., Belavin P., Ilyicheva T., **Seregin S.**, Ilyichev A., Karpenko L. Design of Artificial Polyepitope DNA Vaccine Constructs for Eliciting of HIV-Specific CD8+CTL Responses. ANTIVIRAL RESEARCH. May 2009. V. 82. Issue 2. P. A25-A28.
26. Bazhan S., Karpenko L., Ilyicheva T., Belavin P., **Seregin S.**, Antonets D., Ilyichev A. Promising strategies for designing poly-CD8+ T cell-epitope DNA vaccine. AIDS 2010 - XVIII International AIDS Conference. Vienna. Austria. July 18-23 2010. Abstr. №. TUAA0103.
27. **Серегин С.В.**, Петров В.С. Проблемы лабораторной диагностики Крымской–Конго геморрагической лихорадки. // Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Сборник статей, посвящённых 90-летию службы. Новосибирск. ООО «Альфа-Порте». 2012. С. 377-387.
28. Панова Т.А., Носарева О.В., Нестеров А.Е., **Серегин С.В.**, Петров В.С. Изучение иммуногенных свойств кандидатных ДНК-вакцин против вируса

- Крымской-Конго геморрагической лихорадки. 5-й ежегодный Всерос. конгр. по инфекционным болезням. Москва. 25–27 марта 2013. Москва. С. 307.
29. Panova T.A., Nosareva O.V., Nesterov A.E., **Seregin S.V.**, Petrov V.S. Investigation of the immunogenic properties of candidate DNA vaccines against CCHF. Intern. Jena Sympos. on Tick-borne Diseases, XII. Leonardo Hotel. Weimar. Germany. 21–23 March 2013. Abstr. book. P. 113.
30. Panova T.A., Nosareva O.V., Nesterov A.E., **Seregin S.V.**, Petrov V.S. Immunity induction of candidate DNA-vaccines against Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF): Vaccines and seroepidemiology. Europ. Congr. of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23rd. Berlin. Germany. 26 April – 2 May 2013. Abstr. P. 2450.
31. Nosareva O.V., Panova T., Nesterov A., **Seregin S.**, Petrov V. Influence DNA-vaccines encoding antigens of VCCHF on immune system in mice. Intern. Congr. of Immunology, 15th. 22–27 August 2013. Milan. Italy. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00765.

9 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: в трех томах. М.: Мир. – 1994. – Т. 1. – 517 с.
2. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., Серегин С.В., Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. ССНФV-Vd-1 – продуцент моноклонального антитела 4G4/B6 к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2535982 от 10.10.2013.
3. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., Серегин С.В., Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. ССНФV-Vd-2 – продуцент моноклонального антитела 1E2/E5 к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2528868 от 10.10.2013.
4. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., Серегин С.В., Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. ССНФV-Vd-3 – продуцент моноклонального антитела 3H6/F2 к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2528869 от 10.10.2013.
5. Аристова В.А., Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. Экология вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и особенности ее клиники на территории России и сопредельных стран. // *Вопр. вирусол.* – 2001. – № 4. – С. 7-14.
6. Бабкина И.Н., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Синяков А.Н., Гладкова С.Е., Поздняков С.Г. Химико-ферментативный синтез, клонирование и экспрессия гена аналога человеческого анафилотоксина C5a. // *Биоорган. химия.* – 1995. – Т. 21 – № 5. – С. 359-364.
7. Бажан С.И., Белавин П.А., Серегин С.В., Бабкина И.Н., Данилюк Н.К., Сандахчиев Л.С. Искусственный белок-иммуноген TCI, содержащий множественные СТL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, искусственный ген TCI, кодирующий полиэпитопный белок-иммуноген TCI. Патент РФ на изобретение № 2238946 от 27.10.2004а.
8. Бажан С.И., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Бабкина И.Н., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Агафонов А.П., Игнатьев Г.М., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Конструирование искусственного

- иммуногена, кандидата ДНК-вакцины, кодирующей множественные СТЛ-эпитопы ВИЧ-1. // ДАН. – 2004б. – Т. 395. – № 6. – С. 825-827.
9. Бажан С.И. Теоретическое исследование механизмов противовирусного иммунитета. Автореф. дис. докт. биол. наук. Кольцово. – 2008. – 50 с.
 10. Батырова Б.А., Юсупова С.М., Омарова Б.К., Асельдерова З.М., Фараджева А.З., Василенко Н.Ф. Сравнительная оценка чувствительности и специфичности методов серологической диагностики Крымской геморрагической лихорадки. // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. – 2005. – № 4 (приложение). – С. 32-34.
 11. Беклемишев А.Б., Иванов И.Д. Рекомбинантная плазмидная ДНК, обеспечивающая синтез иммунодоминантного белка *Borrelia garinii*, используемого для диагностики лайм-боррелиоза (варианты). Патент РФ на изобретение №:2260047 от 23.10.2003.
 12. Беклемишев А.Б. Использование методов молекулярной биологии и генной инженерии для конструирования вакцинных и диагностических препаратов: Дис. докт. биол. наук. Новосибирск. – 2004. – 413 с.
 13. Бутенко А.М. Материалы по изучению этиологии, лабораторной диагностики и иммунологии КГЛ: вопросы экологии вируса-возбудителя. Автореф. дис. докт. биол. наук. М. – 1970. – 24 с.
 14. Вышемирский О.И., Нешров В.А., Бутенко А.М., Жуков А.Н., Щелканов М.Ю., Краснова Е.М., Ильин Н.Н., Громашевский В.Л., Лазаренко В.В., Тихонов Н.Г., Хуторецкая Н.В., Львов Д.К. Выделение вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки от больного человека в Волгоградской области летом 2000 г. // Вопр. вирусол. – 2001. – Т. 46. – № 4. – С. 21-22.
 15. Гилева И.П. Рекомбинантные цитокины и цитокин-связывающие белки. Дис. докт. биол. наук. Кольцово. – 2011. – 312 с.
 16. Клонирование ДНК. Методы. Пер. с англ. Под ред. Д. Гловера. М: Мир. – 1988. – 538 с.
 17. Гудима Г.О., Николаева И.А., Коробова С.В., Горностаева Ю.А., Клименко Т.В., Шевалье А.Ф., Сеславина Л.С., Трубченинова Л.П., Трефильева Н.Ф., Горбунова З.А., Ищенко М.Е., Петрова Т.В., Трофимов Д.Ю., Пинегин Б.В., Черноусов А.Д., Ильина Н.И., Латышева Т.В., Алексеев Л.П., Карамов Э.В., Сидорович И.Г. Первые клинические испытания анти-ВИЧ/СПИД-вакцин в Российской Федерации: формирование когорт добровольцев. // РАЖ. – 2007. – № 3. – С. 320-321.
 18. Данилюк Н.К., Камынина Т.П., Кравченко В.В., Сандахчиев Л.С., Синяков А.Н. Рекомбинантная плазмидная ДНК рIL-2/21, кодирующая человеческий интерлейкин-2, способ ее конструирования и штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент человеческого интерлейкина-2. А.с. № 1440033. Приоритет от 1987 г. Патент СССР № 1761805 от 19.12.1990.

19. Данилюк Н.К., Серегин С.В., Синяков А.Н., Серпинский О.И., Бабкина И.Н., Урманова М.А., Рябинин В.А., Поздняков С.Г. Эффективный синтез и клонирование гена интерлейкина-2 человека и его аналога; экспрессия в клетках *E. coli* гена интерлейкина-2. // Биоорганическая химия. – 1991а. – Т. 17. – № 6. – С. 779-788.
20. Данилюк Н.К., Серпинский О.И., Синяков А.Н. Конструирование рекомбинантно-устойчивых плазмид серии рFN. // Биоорганическая химия. – 1991б. – Т. 17. – № 1. – С. 84-87.
21. Данилюк Н.К., Синяков А.Н., Серпинский О.И., Урманова М.А., Сандахчиев Л.С. Эффективный способ конструирования протяженных фрагментов ДНК. // ДАН. – 1990. – Т. 313. – № 2. – С. 487-491.
22. Данилюк Н.К., Ястребов С.Н., Артамонова Т.П., Попов С.Г. Улучшенный способ определения первичной последовательности ДНК. // Биоорганическая химия. – 1986. – Т. 12. – № 9. – С. 1185-1188.
23. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Сибирское университетское издательство. – 2003. – 480 с.
24. Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Игнатъев Г.М., Агафонов А.П., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Бажан С.И. Использование различных систем доставки ВИЧ-1 ДНК-вакцины, кодирующей поли-СТЛ-эпитопный иммуноген. // Вестник РАМН. – 2005. – № 1. – С. 41-44.
25. Карань Л.С., Шипулин Г.А., Платонов А.Е. Лабораторная диагностика КГЛ методом ПЦР. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – № 10. – С. 50-54.
26. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ерошкин А.М., Лебедев Л.Р., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Плясунова О.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Даниленко Е.Д., Зайцев Б.Н., Масычева В.И., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Вакцина “КомбиВИЧвак”, содержащая В- и Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1. // ДАН. – 2007. – Т. 413. – № 4. – С. 553-556.
27. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Л., Некрасова Н.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Ерошкин А.М., Ильичев А.А. Рекомбинантная вакцина против вируса иммунодефицита человека 1 типа. Патент РФ на изобретение № 2317107 от 10.01.2006.
28. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Некрасова Н.А., Белавин П.А., Данилюк Н.К., Серегин С.В., Бабкина И.Н., Игнатъев Г.М., Агафонов А.П., Бойченко М.Н., Воробьев А.А., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Рекомбинантная плазмидная ДНК рсDNA-TСI, обеспечивающая экспрессию искусственного гена ТСI в клетках эукариот, и рекомбинантный аттенуированный штамм бактерий *Salmonella enteritidis* E-23/рсDNA-TСI как кандидат для конструирования живой ДНК-вакцины против вируса иммунодефицита человека. Патент РФ на изобретение № 2248396 от 17.04.2003.
29. Коваленко С.П., Горн В.В., Каргинов В.А., Морозов И.В., Зарытова В.Ф., Мертвецов Н.П. Химико-ферментативный синтез и клонирование гена

- ангиогенина человека в фаге M13mp8. // Биоорган. химия. – 1988. – Т. 14. – № 7 – С. 910-915.
30. Козлов Ю.В., Кабишев А.А., Федченко В.И., Баев А.А. Клонирование и первичная структура генов токсина шигеллы. // ДАН. – 1987. – Т. 295. – № 3. – С. 740-748.
 31. Колобухина Л.В., Евченко Ю.М., Вышемирский О.И., Сысолятна Г.В., Громашевский В.Л., Алексеева О.И., Щелканов М.Ю., Петрова Е.С., Львов Д.К. Изоляция трех штаммов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки от больных в Ставропольском крае во время эпидемической вспышки в 2000 г. // Вопр. вирусол. – 2001. – Т. 46. – № 4. – С. 15-18.
 32. Колосов М.Н., Коробко В.Г., Добрынин В.Н., Северцова И.В., Чувпило С.А., Быстров Н.С., Берлин Ю.А., Каюшин А.А., Буткус В.В., Полякова И.А., Болдырева Е.В., Сандахчиев Л.С., Попов С.Г., Шубина Т.Н., Кравченко В.В., Серпинский О.И., Ямщиков В.Ф., Беликов С.И., Синяков А.Н., Сиволобова Г.Ф. Способ получения искусственного гена интерферона $\alpha 2$ и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим способом. А.с. № 1092176 СССР. // Б. И. – 1984 – № 18.
 33. Кравченко В.В., Ямщиков В.Ф., Плетнев А.А. Плазмидный вектор для контролируемой температурой экспрессии генов. // Биоорган. химия. – 1985. – Т. 11. – С. 523-533.
 34. Лавриненко И.А., Лавриненко В.А., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Создание биосенсорной тест-системы для детекции повреждений ДНК путем использования репортерного белка GFP. // Бюл. эксп. биол. мед. – 2006. – Т. 141. – № 1. – С. 38-40.
 35. Львов Д. К., Клименко С. М., Гайдамович С. Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.: Медицина. – 1989. – С. 236-239.
 36. Льюин Б. Гены. М.: Мир. – 1987. – 544 с.
 37. Максютов А.З., Бачинский А.Г., Бажан С.И. Поиск в белках ВИЧ-1 районов, локально сходных с белками человека. Применение к вакцинам. // Молекул. биол. – 2002. – Т. 36. – № 3. – С. 447-459.
 38. Максютов Р.А. Экспериментальная ДНК-вакцина против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека. Дис. канд. биол. наук. Кольцово. – 2010. – 109 с.
 39. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М: Мир. – 1984. – 480 с.
 40. Мурашев Б.В., Казеннова Е.В., Козлов А.А., Мурашева И.В., Духовлинова Е.Н., Галачьянц Ю.П., Дорофеева Е.С., Духовлинов И.В., Машарский А.Э., Климов Н.А. Конструирование, очистка и иммунологические свойства кандидатной ДНК-вакцины против ВИЧ-1. // Русский журнал "СПИД, рак и общественное здоровье". – 2007. – Т. 11. – № 1. – С. 90.

41. Никонова А.А., Серегин С.В., Чикаев Н.А., Мишин В.П., Бабкина И.Н., Мертвецов Н.П. Экспрессия синтетического гена ангиогенина человека в клетках *E. coli*. // Биооргани. химия. – 1996. – Т. 22. – № 12. – С. 891-893.
42. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. // Вестник РАН. – 2003. – Т. 73. – № 3. – С. 195-204.
43. Онищенко Г.Г., Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Kuhn J., Серегин С.В., Тюнников Г.И., Петрова И.Д., Тишкова Ф.Х., Оспанов Х.С., Казаков С.В., Каримов С.К., Есмагамбетова А.С., Нетесов С.В., Петров В.С. Исследование вирусофорности иксодовых клещей в очагах Крымской-Конго геморрагической лихорадки Казахстана и Таджикистана. // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. – 2005а. – № 1. – С. 27-31.
44. Онищенко Г.Г., Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Kuhn J., Серегин С.В., Тюнников Г.И., Петрова И.Д., Тишкова Ф.Х., Оспанов Х.С., Казаков С.В., Каримов С.К., Есмагамбетова А.С., Нетесов С.В., Петров В.С. Исследование методами ИФА и ОТ-ПЦР вирусофорности иксодовых клещей, собранных в очагах Крымской-Конго геморрагической лихорадки Казахстана и Таджикистана в 2001-2002 гг. // Вопр. вирусол. – 2005б. – Т. 50. – № 1. – С. 23-26.
45. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. М.: Наука. – 2004. – 530 с.
46. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. М.: Наука. – 2000. – 528 с.
47. Петрова И.Д., Серегин С.В., Петров В.С., Вышемирский О.И., Кузина И.И., Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Яшина Л.Н., Нетесов С.В. Генетическая характеристика S-сегмента РНК двух штаммов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, изолированных на юге России и в Узбекистане. // Вопр. вирусол. – 2003. – Т. 48. – № 2. – С. 8-11.
48. Петров В.С., Петрова И.Д., Тюнников Г.И., Серегин С.В., Яшина Л.Н., Кузина И.И. Набор олигонуклеотидов-праймеров для идентификации РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2209830 от 20.08.2001.
49. Покровский А.Г., Плясунова О.А., Гашникова Н.М., Мамаева О.А., Федюк Н.В. Хронически инфицированная ВИЧ-1 культура моноцитов человека U937 как модель для оценки эффективности анти-ВИЧ-препаратов. // Вопр. вирусол. – 2001. – Т. 46. – № 6. – С. 38-42.
50. Регужева А.Ю., Антонец Д.В., Максюттов Р.А., Волкова О.Ю., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Дизайн, конструирование и оценка экспрессии генов, кодирующих полиэпитопные Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1 в составе ДНК-вакцинных конструкций. // Вестник НГУ. – 2013. – № 2. – С. 5-12.
51. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир. – 2000. – 582 с.

52. Рябченко А.В., Лавриненко И.А., Беклемишев А.Б. Рекомбинантная плазмидная ДНК для обнаружения агентов, повреждающих генетический аппарат клетки (варианты). Патент РФ на изобретение № 2311459 от 14.11.2005.
53. Серегин С.В., Бабкина И.Н., Нестеров А.Е., Синяков А.Н., Щелкунов С.Н. Продукция в клетках *E. coli* белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору гамма-интерферона человека. // Молекул. биол. – 1996а. – Т. 30. – № 3. – С. 692-700.
54. Серегин С.В., Бабкина И.Н., Нестеров А.Е., Синяков А.Н., Щелкунов С.Н., Сандахчиев Л.С. Вирус натуральной оспы кодирует белок, подавляющий противовирусную активность гамма-интерферона человека. // ДАН. – 1996б. – Т. 346. – № 1. – С. 122-124.
55. Серегин С.В., Данилюк Н.К., Синяков А.Н., Камынина Т.П., Ильюкова Л.В., Сахно Л.В. Эффективная экспрессия в клетках *E.coli* генов интерлейкина-2 человека и его мутантных аналогов. // Молекул. биол. – 1993а. – Т. 27. – № 1. – С. 72-80.
56. Серегин С.В., Петров В.С., Гришаев М.П. Методы диагностики Крымской-Конго геморрагической лихорадки. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2013. – № 4. – С. 26-31.
57. Серегин С.В., Петров В.С., Туманова И.Ю., Петрова И.Д., Тюнников Г.И. Набор олигонуклеотидных праймеров для идентификации РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в полевых и клинических образцах. Патент РФ на изобретение № 2294963 от 03.03.2005.
58. Серегин С.В., Рябинин В.А., Синяков А.Н., Данилюк Н.К., Поздняков С.Г. Реконструкция синтетического гена интерлейкина-2 человека. // Биоорг. химия. – 1990. – Т. 16. – № 6. – С. 759-764.
59. Серегин С.В., Серегин С.С., Петров В.С., Тюнников Г.И., Якименко Н.В., Сергеев А.Н. Дифференциация генетических вариантов вирусов Крымской-Конго геморрагической лихорадки. // Вопр. вирусол. – 2011. – Т. 56. – № 1. – С. 30-33.
60. Серегин С.В., Синяков А.Н., Поздняков С.Г., Камынина Т.П., Козлов Ю.В., Сахно Л.В., Сандахчиев Л.С. Новые гибридные белки – потенциальные иммуносупрессорные агенты. // ДАН. – 1992. – Т. 325. – № 5. – С. 1081-1084.
61. Серегин С.В., Синяков А.Н., Поздняков С.Г., Козлов Ю.В., Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Номоконова Н.Ю. Получение гибридных белков, состоящих из интерлейкина-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы. // Молекул. биол. – 1993б. – Т. 27. – № 4. – С. 763-772.
62. Серегин С.В., Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Петрова И.Д., Львов Д.К., Громашевский В.Л., Самохвалов Е.И., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Тишкова Ф.Х., Данияров О.А., Нетесов С.В., Петров В.С. Изучение генетической variability вируса Крымской-Конго геморрагической

- лихорадки, циркулирующего в странах Средней Азии. // ДАН. – 2004. – Т. 398. – № 5. – С. 705-708.
63. Серегин С.В., Туманова И.Ю., Петрова И.Д., Яшина Л.Н., Кузина И.И., Вышемирский О.И., Гуторов., Серегин С.С., Тюнников Г.И., Самохвалов Е.И., Львов Д.К., Нетесов С.В., Петров В.С. Особенности S-сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и Болгарии. // Вопр. вирусол. – 2006. – Т. 51. – № 3. – С. 25-32.
 64. Синяков А.Н., Данилюк Н.К., Серпинский О.И. Вектор рFH123 для получения фрагментов ДНК с произвольными липкими концами и способ его конструирования: А.с. № 1563240 СССР. Приоритет от 3.03.1988а.
 65. Синяков А.Н., Данилюк Н.К., Серпинский О.И. Вектор рFH124 для получения фрагментов ДНК с произвольными липкими концами и способ его конструирования: А.с. № 1563240 СССР. Приоритет от 3.03.1988б.
 66. Синяков А.Н., Серпинский О.И., Данилюк Н.К., Чижиков В.Е., Дегтярев С.Х. Плазмиды рMB123 и рMB124 – векторы для получения субфрагментов ДНК с произвольными «липкими» концами. // Биоорган. химия. – 1989. – Т. 15. – № 5. – С. 638-647.
 67. Смирнова С.Е. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка: этиология, эпидемиология и лабораторная диагностика. Автореф. дис. докт. мед. наук. М. – 2003. – 121 с.
 68. Тишкова Ф.Х. Диагностика буньявирусных инфекций и идентификация буньявирусов в Таджикистане (1991-1995 гг.). Автореф. дис. канд. биол. наук. М. – 1996. – 22 с.
 69. Туманова И.Ю., Серегин С.В., Вышемирский О.И., Гуторов В.В., Петрова И.Д., Тюнников Г.И., Оспанов К.С., Казаков С.В., Каримов С., Тишкова Ф.Х., Пиров А.П., Нетесов С.В., Петров В.С. Генетический мониторинг вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в Казахстане и Таджикистане в период 2001-2003 гг. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2006. – № 2. – С. 36-41.
 70. Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. М.: Мир. – 1986. – 288 с.
 71. Храпова Н.П., Антонов В.А., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Корсакова И.И., Голосеев Ю.А., Пьянков О.В., Пьянков С.А., Серегин С.В., Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Получение моноклональных антител и перспективы их использования в качестве основы иммунодиагностических средств обнаружения вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки. // Пробл. особо опасных инфекций. – 2015. – Вып. 1. – С. 89-93.
 72. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск: Сибирское Университетское Издательство. – 2010. – 514 с.
 73. Яшина Л.Н., Петров В.С., Вышемирский О.И., Аристова В.А., Москвина Т.М., Львов Д.К., Петрова И.Д., Гуторов В.В., Тюнников Г.И., Кузина И.И., Самохвалов Е.И., Серегин С.В., Нетесов С.В. Характеристика вируса

- Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и республиках Средней Азии. // *Вопр. вирусол.* – 2002а. – Т. 47. – № 3. – С. 11-15.
74. Яшина Л.Н., Петров В.С., Петрова И.Д., Гуторов В.В., Казаков С.В., Оспанов К.С., Каримов С.К., Тюнников Г.И., Серегин С.В., Кузина И.И., Бабкин И.В., Нетесов С.В. Генетическая идентификация вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки во время эпидемической вспышки в Казахстане в 2000 г. // *Молекул. генетика, микробиол. и вирусол.* – 2002б. – № 4. – С. 31-35.
75. Acierno P.M., Schmitz J.E., Gorgone D.A., Sun Y., Santra S., Seaman M.S., Newberg M.H., Mascola J.R., Nabel G.J., Panicali D., Letvin N.L. Preservation of functional virus-specific memory CD8⁺ T lymphocytes in vaccinated, simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. // *J. Immunol.* – 2006. – V. 17. – № 9. – P. 5338-5345.
76. Ahlers J.D., Belyakov I.M. Lessons learned from natural infection: focusing on the design of protective T cell vaccines for HIV/AIDS. // *Trends Immunol.* – 2010а. – V. 31. – № 3. – P. 120-130.
77. Ahlers J.D., Belyakov I.M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. // *Blood.* – 2010b. – V. 115. – № 9. – P. 1678-1689.
78. Ahlers J.D., Belyakov I.M. New paradigms for generating effective CD8⁺ T cell responses against HIV-1/AIDS. // *Discov. Med.* – 2010с. – V. 9. – № 49. – P. 528-537.
79. Ahlers J.D., Dunlop N., Alling D.W., Nara P.L., Berzofsky J.A. Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. // *J. Immunol.* – 1997. – V. 158. – № 8. – P. 3947-3958.
80. Adis International Ltd. HIV gp120 vaccine - VaxGen: AIDSVAX, AIDSVAX B/B, AIDSVAX B/E, HIV gp120 vaccine - Genentech, HIV gp120 vaccine AIDSVAX - VaxGen, HIV vaccine AIDSVAX – VaxGen. // *Drugs R. D.* – 2003. – V. 4. – № 4. – P. 249-253.
81. Akbari O., Panjwani N., Garcia S., Tascon R., Lowrie D., Stockinger B. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189. – № 1. – P. 169-178.
82. Alexander J., Sidney J., Southwood J., Ruppert C., Maewal., Snoke K., Serra H.M., Kubo R.T., Sette A., Grey H.M. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. // *Immunity.* – 1994. – V. 1. – № 9. – P. 751-761.
83. Allen G.S., Zavialov A., Gursky R., Ehrenberg M., Frank J. The cryo-EM structure of a translation initiation complex from *Escherichia coli*. // *Cell.* – 2005. – V. 121. – № 5. – P. 703-712.

84. Alpert M.D., Harvey J.D., Lauer W.A, Reeves R.K., Piatak Jr. M., Carville A., Mansfield K.G., Lifson J.D., Li W., Desrosiers R.C., Johnson R.P., Evans D.T. ADCC develops over time during persistent infection with live-attenuated SIV and is associated with complete protection against SIV(mac)251 challenge. // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8. – № 8. – e1002890.
85. Altman A., Cardenas J.M., Houghten R.A., Dixon F.J., Theofilopoulos A.N. Antibodies of predetermined specificity against chemically synthesized peptides of human interleukin 2. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1984. – V. 81. – № 7. – P. 2176-2180.
86. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – № 17. – P. 3389-3402.
87. Amara R.R., Villinger F., Altman J.D., Lydy S.L, O'Neil S.P., Staprans S.I., Montefiori D.C., Xu Y., Herndon J.G., Wyatt L.S., Candido M.A., Kozyr N.L., Earl P.L., Smith J.M., Ma H.L., Grimm B.D., Hulsey M.L., McClure H.M., McNicholl J.M., Moss B., Robinson H.L. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. // *Vaccine.* – 2002. – V. 20. – № 15. – P. 1949-1955.
88. Andre S., Seed B., Eberle J., Schraut W., Bultmann A., Haas L. Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – № 2. – P. 1497-1503.
89. Anton L.C., Yewdell J.W., Bennink J.R. MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies. // *J. Immunol.* – 1997. – V. 158. – № 6. – P. 2535-2542.
90. Appay V., Nixon D.F., Donahoe S.M., Gillespie G.M., Dong T., King A., Ogg G.S., Spiegel H.M., Conlon C., Spina C.A., Havlir D.V., Richman D.D., Waters A., Easterbrook P., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – № 1. – P. 63-75.
91. Appleyard R.K. Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from Escherichia Coli K12. // *Genetics.* – 1954. – V. 39. – № 4. – P. 440-452.
92. Arechaga I., Miroux B., Runswick M.J., Walker J.E. Over-expression of Escherichia coli F1F(o)-ATPase subunit a is inhibited by instability of the uncB gene transcript. // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 547. – № 1-3. – P. 97-100.
93. de Arruda L.B., Chikhlikar P.R., August J.T., Marques E.T. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. // *Immunology.* – 2004. – V. 112. – № 1. – P. 126-133.

94. Atanasiu P., Cantarow A., Paschkis K. E. Production of neoplasms by fractions of mammalian neoplasms. // *Cancer Res.* – 1950. – V. 10. – P. 775-782.
95. Atanasiu P., Orth G., Rebiere J.P., Boiron M., Paoletti C. Production de tumeurs chez le Hamster par inoculation d'acide desoxyribonucleique extrait de cultures de tissus infectees par le virus du polyome. // *C R Hebd. Seances Acad. Sci.* – 1962. – V. 254. – P. 4228-4230.
96. Auer T., Landre P.A., Myers T.W. Properties of the 5'->3' exonuclease/ribonuclease H activity of *Thermus thermophiles* DNA polymerase. // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – № 15. – P. 4994-5002.
97. Balbás P., Soberón X., Merino E., Zurita M., Lomeli H., Valle F., Flores N., Bolivar F. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. // *Gene.* – 1986. – V. 50. – № 1-3. – P. 3-40.
98. Barouch D.H., Craiu A., Kuroda M.J., Schmitz J.E., Zheng X.X., Santra S., Frost J.D., Krivulka G.R., Lifton M.A., Crabbs C.L., Heidecker G., Perry H.C., Davies M.E., Xie H., Nickerson C.E., Steenbeke T.D., Lord C.I., Montefiori D.C., Strom T.B., Shiver J.W., Lewis M.G., Letvin N.L. Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – № 8. – P. 4192-4197.
99. Barouch D.H., Liu J., Li H., Maxfield L.F., Abbink P., Lynch D.M., Iampietro M.J., SanMiguel A., Seaman M.S., Ferrari G., Forthal D.N., Ourmanov I., Hirsch V.M., Carville A., Mansfield K.G., Stablein D., Pau M.G., Schuitemaker H., Sadoff J.C., Billings E.A., Rao M., Robb M.L., Kim J.H., Marovich M.A., Goudsmit J., Michael N.L. Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys. // *Nature.* – 2012. – V. 482. – № 7383. – P. 89-93.
100. Barouch D.H. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. // *Curr. Opin. HIV AIDS.* – 2010. – V. 5. – № 5. – P. 386-390.
101. Barouch D.H., Yang Z.Y., Kong W.P., Koriath-Schmitz B., Sumida S.M., Truitt D.M., Kishko M.G., Arthur J.C., Miura A., Mascola J.R., Letvin N.L., Nabel G.J. A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates. // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – № 14. – P. 8828-8834.
102. Bauer R., Scheiblhofer S., Kern K., Gruber C., Stepanoska T., Thalhamer T., Hauser-Kronberger C., Alinger B., Zoegg T., Gabler M., Ferreira F., Hartl A., Thalhamer J., Weiss R. Generation of hypoallergenic DNA vaccines by forced ubiquitination: preventive and therapeutic effects in a mouse model of allergy. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. – V. 118. – № 1. – P. 269-276.
103. Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryvaeva V.A., Aborneva I.V., Ilyichev A.A. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL epitopes of major HIV-1 antigens. // *Vaccine.* – 2004. – V. 22. – № 13-14. – P. 1672-1682.

104. Bazhan S.I., Karpenko L.I., Ilyicheva T.N., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Antonets D.V., Ilyichev A.A. Rational design based synthetic polyepitope DNA vaccine for eliciting HIV-specific CD8+ T cell responses. // *Mol. Immunol.* – 2010. – V. 47. – № 7-8. – P. 1507-1515.
105. Bazhan S.I., Karpenko L.I., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Belavin P.A., Eroshkin A.M., Ilyichev A.A. A synergistic effect of a combined bivalent DNA-protein anti-HIV-1 vaccine containing multiple T- and B-cell epitopes of HIV-1 proteins. // *Mol. Immunol.* – 2008. – V. 45. – № 3. – P. 661-669.
106. Belyakov I.M., Berzofsky J.A. Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines. // *Immunity.* – 2004. – V. 20. – № 3. – P. 247-253.
107. Belyakov I.M., Derby M.A., Ahlers J.D., Kelsall B.L., Earl P., Moss B., Strober W., Berzofsky J.A. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95. – № 4. – P. 1709-1714.
108. Belyakov I.M., Isakov D., Zhu Q., Dzutsev A., Berzofsky J.A. A novel functional CTL avidity/activity compartmentalization to the site of mucosal immunization contributes to protection of macaques against simian/human immunodeficiency viral depletion of mucosal CD4(+) T cells. // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178. – № 11. – P. 7211-7221.
109. Belyakov I.M., Kuznetsov V.A., Kelsall B., Klinman D., Moniuszko M., Lemon M., Markham P.D., Pal R., Clements J.D., Lewis M.G., Strober W., Franchini G., Berzofsky J.A. Impact of vaccine-induced mucosal high-avidity CD8(+) CTLs in delay of AIDS viral dissemination from mucosa. // *Blood.* – 2006. – V. 107. – № 8. – P. 3258-3264.
110. Belyakov I.M., Wang J., Koka R., Ahlers J.D., Snyder J.T., Tse R., Cox J., Gibbs J.S., Margulies D.H., Berzofsky J.A. Activating CTL precursors to reveal CTL function without skewing the repertoire by in vitro expansion. // *Eur. J. Immunol.* – 2001. – V. 31. – № 12. – P. 3557-3566.
111. Belyakov I.M., Wyatt L.S., Ahlers J.D., Earl P., Pendleton C.D., Kelsall B.L., Strober W., Moss B., Berzofsky J.A. Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein. // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – № 10. – P. 8264-8272.
112. Benito A., Vidal M., Villaverde A. Enhanced production of pL-controlled recombinant proteins and plasmid stability in *Escherichia coli* RecA+ strains. // *J. Biotechnol.* – 1993. – V. 29. – № 3. – P. 299-306.
113. Bergman P.J., Camps-Palau M.A., McKnight J.A., Leibman N.F., Craft D.M., Leung C., Liao J., Riviere I., Sadelain M., Hohenhaus A.E., Gregor P., Houghton A.N., Perales M.A., Wolchok J.D. Development of a xenogeneic DNA

- vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. // *Vaccine*. – 2006. – V. 24. – № 21. – P. 4582-4585.
114. Bernard H.U., Remaut E., Hershfield M.V., Das H.K., Helinski D.R., Yanofsky C., Franklin N. Construction of plasmid cloning vehicles that promote gene expression from the bacteriophage lambda pL promoter. // *Gene*. – 1979. – V. 5. – № 1. – P. 59-76.
 115. Bernard P., Gabant P., Bahassi E.M., Couturier M. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. // *Gene*. – 1994. – V. 148. – № 1. – P. 71-74.
 116. Bertolotti-Ciarlet A., Smith J., Strecker K., Paragas J., Altamura L.A., McFalls J.M., Frias-Stäheli N., García-Sastre A., Schmaljohn C.S., Doms R.W. Cellular localization and antigenic characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – № 10. – P. 6152-6161.
 117. Berzofsky J., Ahlers J., Belyakov I. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2001. – V. 1. – № 3. – P. 209-219.
 118. Binley J.M., Sanders R.W., Clas B., Schuelke N., Master A., Guo Y., Kajumo F., Anselma D.J., Maddon P.J., Olson W.C., Moore J.P. A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – № 2. – P. 627-643.
 119. Birnboim H.C., Doly J.A. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. // *Nucl. Acids Res.* – 1979. – V. 7. – № 6. – P. 1513-1523.
 120. Blattner F.R., Plunkett G. 3rd, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. // *Science*. – 1997. – V. 277. – № 5331. – P. 1453-1462.
 121. Blumer K.J., Ivey M.R., Steege D.A. Translational control of phage f1 gene expression by differential activities of the gene V, VII, IX and VIII initiation sites. // *J. Mol. Biol.* – 1987. – V. 197. – № 3. – P. 439-451.
 122. de Boer H.A., Comstock L.J., Vasser M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1983. – V. 80. – № 1. – P. 21-25.
 123. Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M.C., Boyer H.W. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. // *Gene*. – 1977a. – V. 2. – № 2. – P. 75-93.
 124. Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W., Crosa J.H., Falkow S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. // *Gene*. – 1977b. – V. 2. – № 2. – P. 95-113.

125. Boni I.V., Isaeva D.M., Musychenko M.L., Tzareva N.V. Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – № 1. – P. 155-162.
126. Borrow P., Lewicki H., Hahn B.H., Shaw G.M., Oldstone M.B. Virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. // *J. Virol.* – 1994. – V. 68. – № 9. – P. 6103-6110.
127. Borsig L., Ivanov S.X., Herrmann G.F., Kragl U., Wandrey C., Berger E.G. Scaled-up expression of human alpha 2,6(N)sialyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995 – V. 210. – № 1. – P. 14-20.
128. Borthwick N., Ahmed T., Ondondo B., Hayes P., Rose A., Ebrahimsa U., Hayton E.J., Black A., Bridgeman A., Rosario M., Hill A.V., Berrie E., Moyle S., Frahm N., Cox J., Colloca S., Nicosia A., Gilmour J., McMichael A.J., Dorrell L., Hanke T. Vaccine-elicited human T cells recognizing conserved protein regions inhibit HIV-1. // *Mol. Ther.* – 2014. – V. 22. – № 2. – P. 464-475.
129. Bousso P. Generation of MHC-peptide tetramers: a new opportunity for dissecting T-cell immune responses. // *Microbes Infect.* – 2000. – V. 2. – P. 425-429.
130. Boyer H.W., Roulland-Dussoix D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. // *J. Mol. Biol.* – 1969. – V. 41. – № 3. – P. 459-472.
131. Boyer J.D., Robinson T.M., Kutzler M.A., Parkinson R., Calarota S.A., Sidhu M.K., Muthumani K., Lewis M., Pavlakis G., Felber B., Weiner D. SIV DNA vaccine co-administered with IL-12 expression plasmid enhances CD8 SIV cellular immune responses in cynomolgus macaques. // *J. Med. Primatol.* – 2005. – V. 34. – № 5-6. – P. 262-270.
132. Braakman E., van Tunen A., Meager A., Lucas C.J. Natural cytotoxic activity in multiple sclerosis patients: defects in IL-2/interferon gamma-regulatory circuit. // *Clin. Exp. Immunol.* – 1986. – V. 66. – № 2. – P. 285-294.
133. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
134. Brandhuber B.J., Boone T., Kenney W.C., McKay D.B. Three-dimensional structure of interleukin-2. // *Science.* – 1987. – V. 238. – № 4834. – P. 1707-1709.
135. Bressan G.M., Stanley K.K. pUEX, a bacterial expression vector related to pEX with universal host specificity. // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – V. 15. – № 23. – P. 10056.
136. Brosius J., Erfle M., Storella J. Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. // *J. Biol. Chem.* – 1985. – V. 260. – № 6. – P. 3539-3541.
137. Brown E.L., Belagaje R., Ryan M.J., Khorana H.G. Chemical synthesis and cloning of a tyrosine tRNA gene. // *Methods Enzymol.* – 1979. – V. 68. – P. 109-151.

138. Bujard H., Gentz R., Lanzer M., Stueber D., Mueller M., Ibrahimi I., Haeuptle M.T., Dobberstein B. A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. // *Methods Enzymol.* – 1987. – V. 155. – P. 416-433.
139. Bult H., Herman A.G. Inflammatory mediators released by complement-derived peptides. // *Agents Actions.* – 1983. – V. 13. – № 5-6. – P. 405-414.
140. Burt F.J., Leman P.A., Abbott J.C., Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. // *Epidemiol. Infect.* – 1994. – V. 113. – № 3. – P. 551-562.
141. Burt F.J., Samudzi R.R., Randall C., Pieters D., Vermeulen J., Knox C.M. Human defined antigenic region on the nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus identified using truncated proteins and a bioinformatics approach. // *J Virol. Methods.* – 2013. – V. 193. – № 2. – P. 706-712.
142. Cai Y., Rodriguez S., Hebel H. DNA vaccine manufacture: scale and quality. // *Expert Rev. Vaccines.* – 2009. – V. 8. – № 9. – P. 1277-1291.
143. Cardinaud S., Bouziat R., Rohrlisch P.S., Tourdot S., Weiss L., Langlade-Demoyen P., Burgevin A., Fiorentino S., van Endert P., Lemonnier F.A. Design of a HIV-1-derived HLA-B07.02-restricted polyepitope construct. // *AIDS.* – 2009. – V. 23. – № 15. – P. 1945-1954.
144. Carpousis A.J. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2007. – V. 61. – P. 71-87.
145. Casals J. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. // *Pros. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1969. – V. 131. – P. 233-236.
146. Casares S., Inaba K., Brumeanu T.D., Steinman R.M., Bona C.A. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. // *J. Exp. Med.* – 1997. – V. 186. – № 9. – P. 1481-1486.
147. Casimiro D.R., Wang F., Schleif W.A., Liang X., Zhang Z.Q., Tobery T.W., Davies M.E., McDermott A.B., O'Connor D.H., Fridman A., Bagchi A., Tussey L.G., Bett A.J., Finnefrock A.C., Fu T.M., Tang A., Wilson K.A., Chen M., Perry H.C., Heidecker G.J., Freed D.C., Carella A., Punt K.S., Sykes K.J., Huang L., Ausensi V.I., Bachinsky M., Sadasivan-Nair U., Watkins D.I., Emini E.A., Shiver J.W. Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with DNA and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag. // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – № 24. – P. 15547-15555.
148. Castellino F., Germain R.N. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – V. 24. – P. 519-540.
149. Cease K.B., Berzofsky J.A. Toward a vaccine for AIDS: the emergence of immunobiology-based vaccine development. // *Annu. Rev. Immunol.* – 1994. – V. 12. – P. 923-989.

150. Chapman B.S., Thayer R.M., Vincent K.A., Haigwood N.L. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – № 14. – P. 3979-3986.
151. Chattergoon M., Boyer J., Weiner D.B. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. // *FASEB J.* – 1997. – V. 11. – № 10. – P. 753-763.
152. Chen H., Bjercknes M., Kumar R., Jay E. Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22. – № 23. – P. 4953-4957.
153. Chen W.S., Anton L.C., Bennink J.R., Yewdell J.W. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. // *Immunity.* – 2000. – V. 12. – № 1. – P. 83-93.
154. Cheng X., Patterson T.A. Construction and use of lambda PL promoter vectors for direct cloning and high level expression of PCR amplified DNA coding sequences. // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V. 20. – № 17. – P. 4591-4598.
155. Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. Deoxyribonucleic acid polymerase from extreme thermophilic *Thermus aquaticus*. // *J. Bacteriol.* – 1976. – V. 127. – № 3. – P. 1550-1557.
156. Chinikar S., Shah-Hosseini N., Bouzari S., Jalali T., Shokrgozar M.A., Mostafavi E. New circulating genomic variant of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Iran. // *Arch. Virol.* – 2013. – V. 158. – № 5. – P. 1085-1088.
157. Ciernik I.F., Berzofsky J.A., Carbone D.P. Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes. // *J Immunol.* – 1996. – V. 156. – № 7. – P. 2369-2375.
158. Cohen F.E., Kosen P.A., Kuntz I.D., Epstein L.B., Ciardelli T.L., Smith K.A. Structure-activity studies of interleukin-2. // *Science.* – 1986. – V. 234. – № 4774. – P. 349-352.
159. Cohen J. The HIV vaccine paradox. // *Science.* – 1994. – V. 264. – № 5162. – P. 1072-1074.
160. Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W., Helling R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1973. – V. 70. – № 11. – P. 3240-3244.
161. Cohen S.N., Chang A.C., Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1972. – V. 69. – № 8. – P. 2110-2114.
162. Cohen S.N. DNA cloning: a personal view after 40 years. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – № 39. – P. 15521-15529.
163. Collins L., Tsien W.-H., Seals C., Hakimi J., Weber D., Bailon P., Hoskings J., Greene W.C., Toome V., Ju G. Identification of specific residues of human interleukin 2 that affect binding to the 70-kDa subunit (p70) of the interleukin 2 receptor. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85. – № 20. – P. 7709-7713.

164. Condreay J.P., Kost T.A. Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. // *Curr. Drug Targets*. 2007. – V. 8. – № 10. – P. 1126-1131.
165. Conry R.M.; LoBuglio, A.F., Loechel, F., Moore, S.E.; Sumerel L.A., Barlow D.L., Pike J., Curiel D.T.. A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine for human clinical use. // *Cancer gene therapy*. – 1995. – V. 2. – № 1. – P. 33-38.
166. Danna K., Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1971. – V. 68. – № 12. – P. 2913-2917.
167. Das A., Yanofsky C. A ribosome binding site sequence is necessary for efficient expression of the distal gene of a translationally-coupled gene pair. // *Nucleic Acids Res.* – 1984. – V. 12. – № 11. – P. 4757-4768.
168. Day P.M., Yewdell J.W., Porgador A., Germain R.N., Bennink J.R. Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – V. 94. – № 15. – P. 8064-8069.
169. Delogu G., Howard A., Collins F.M., Morris S.L. DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity. // *Infect. Immun.* – 2000. – V. 68. – № 6. – P. 3097-3102.
170. Denèfle P., Kovarik S., Guitton J.D., Cartwright T., Mayaux J.F. Chemical synthesis of a gene coding for human angiogenin, its expression in *Escherichia coli* and conversion of the product into its active form. // *Gene*. – 1987. – V. 56. – № 1. – P. 61-70.
171. Derynck R., Content J., DeClercq E., Volckaert G., Tavernier J., Devos R., Fiers W. Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. // *Nature*. – 1980. – V. 285. – № 5766. – P. 542-547.
172. Deuschle U., Kammerer W., Gentz R., Bujard H. Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. // *EMBO J.* – 1986. – V. 5. – № 11. – P. 2987-2994.
173. Devos R., Cheroutre H., Taya Y., Degrave W., Van Heuverswyn H., Fiers W. Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells. // *Nucleic Acids Res.* – 1982. – V. 10. – № 8. – P. 2487-2501.
174. Deyde V.M., Khristova M.L., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. // *J. Virol.* – 2006. – V. 80 – № 17. – P. 8834-8842.
175. Dillon P.J., Rosen C.A. Use of polymerase chain reaction for the rapid construction of synthetic genes. // *Methods Mol. Biol.* – 1993. – V. 15. – P. 263-268.
176. Disis M.L., Bernhard H., Shiota F.M., Hand S.L., Galow J.R., Huseby E.S., Gillis S., Cheever M.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. // *Blood*. – 1996. – V. 88. – № 1. – P. 202-210.

177. Doria-Rose N.A., Haigwood N.L. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. // *Methods*. – 2003. – V. 31. – № 3 – P. 207-216.
178. Doytchinova I.A., Guan P.P., Flower D.R. Identifying human MHC supertypes using bioinformatic methods. // *J. Immunol.* – 2004. – V. 172. – № 7. – P. 4314-4323.
179. D'Souza M.P., Frahm N. Adenovirus 5 serotype vector-specific immunity and HIV-1 infection: a tale of T cells and antibodies. // *AIDS*. – 2010. – V. 24. – P. 803-809.
180. Dubendorff J.W., Studier F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. // *J. Mol. Biol.* – 1991a. – V. 219. – № 1. – P. 45-59.
181. Dubendorff J.W., Studier F.W. Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. // *J. Mol. Biol.* – 1991b. – V. 219. – № 1. – P. 61-68.
182. Duh D., Saksida A., Petrovec M., Ahmeti S., Dedushaj I., Panning M., Drosten C., Avsic-Zupanc T. Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – V. 13. – № 11. – P. 1769-1772.
183. Duh D., Saksida A., Petrovec M., Dedushaj I., Avsic-Zupanc T. Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. // *J. Virol. Methods*. – 2006. – V. 133. – № 2. – P. 175-179.
184. Eroshkin A.M., Karginova E.A., Gileva I.P., Lomakin A.S., Lebedev L.R., Kamyinina T.P., Pereboev A.V., Ignat'ev G.M. Design of four-helical protein as a candidate for HIV vaccine. // *Protein Eng.* – 1995. – V. 8. – № 2. – P. 167-173.
185. Ertl P.F., Thomsen L.L. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. // *Methods*. – 2003. – V. 31. – № 3. – P. 199-206.
186. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. // *Vaccine*. – 2013. – V. 31. – № 35. – P. 3502-3518.
187. Esparza J., Osmanov S. HIV vaccines: a global perspective. // *Curr. Mol. Med.* – 2003. – V. 3. – № 3. – P. 183-193.
188. Esparza J., Russell N., Gayle H. The challenge of developing and evaluating preventive vaccines against HIV/AIDS. *HIV Vaccine Research and Development in Thailand*. Bangkok: Mahidol University. – 2006. – P. 3-26.
189. Esparza J. Solid vaccine protection against SIV in rhesus monkeys provides proof-of-concept for further evaluation of a novel HIV vaccine approach in humans. // *Exp. Rev. Vac.* – 2012. – V. 11. – № 5. – P. 539-542.
190. Evans T.G., Keefer M.C., Weinhold K.J., Wolff M., Montefiori D., Gorse G.J., Graham B.S., McElrath M.J., Clements-Mann M.L., Mulligan M.J., Fast P., Walker M.C., Excler J.L., Duliege A.M., Tartaglia J. A canarypox vaccine expressing multiple human immunodeficiency virus type 1 genes given alone or

- with rgp120 elicits broad and durable CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in seronegative volunteers. // *J. Infect. Dis.* – 1999. – V. 180. – № 2. – P. 290-298.
191. Fernandez H.N., Hugli T.E. Partial characterization of human C5a anaphylatoxin. I. Chemical description of the carbohydrate and polypeptide portions of human C5a. // *J. Immunol.* – 1976. – V. 117. – № 5 (Pt 1). – P. 1688-1694.
 192. Ferraro B., Morrow M.P., Hutnick N.A., Shin T.H., Lucke C.E., Weiner D.B. Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – V. 53. – № 3. – P. 296-302.
 193. Ferraz J.C., Stavropoulos E., Yang M., Coade S., Espitia C., Lowrie D.B., Colston M.J., Tascon R.E. A heterologous DNA priming–Mycobacterium bovis BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. // *Infect. Immun.* – 2004. – V. 72. – № 12. – P. 6945-6950.
 194. Fett J.W., Strydom D.J., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L., Riordan J.F., Vallee B.L. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. // *Biochemistry.* – 1985. – V. 24. – № 20. – P. 5480-5486.
 195. Fischer W., Perkins S., Theiler J., Bhattacharya T., Yusim K., Funkhouser R., Kuiken C., Haynes B., Letvin N.L., Walker B.D., Hahn B.H., Korber B.T. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. – № 1. – P. 100-106.
 196. Flynn N.M., Forthal D.N., Harro C.D., Judson F.N., Mayer K.H., Para M.F., rgp120 HIV Vaccine Study Group. Placebocontrolled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. // *J. Infect. Dis.* – 2005. – V. 191. – № 5. – P. 654-665.
 197. Fu T.M., Mylin L.M., Schell T.D., Bacik I., Russ G., Yewdell J.W., Bennink J.R., Tevethia S.S. An endoplasmic reticulum-targeting signal sequence enhances the immunogenicity of an immunorecessive simian virus 40 large T antigen cytotoxic T-lymphocyte epitope. // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – № 2. – P. 1469-1481.
 198. Gao F., Li Y., Decker J.M., Peyerl F.W., Bibollet-Ruche F., Rodenburg C.M., Chen Y., Shaw D.R., Allen S., Musonda R., Shaw G.M., Zajac A.J., Letvin N., Hahn B.H. Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: In vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2003. – V. 19. – № 9. – P. 817-823.
 199. Garrison A.R., Alakbarova S., Kulesh D.A., Shezmukhamedova D., Khodjaev S., Endy T.P., Paragas J. Development of a TaqMan minor groove binding protein assay for the detection and quantification of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2007. – V. 77. – № 3. – P. 514-520.
 200. Goeddel D.V., Heyneker H.L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D.G., Ross M.J., Miozzari G., Crea R., Seeburg P.H. Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. // *Nature.* – 1979a. – V. 281. – № 5732. – P. 544-548.

201. Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F., Heyneker H.L., Yansura D.G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A.D. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979b. – V. 76. – № 1. – P. 106-110.
202. Goeddel D.V., Yelverton E., Ullrich A., Heyneker H.L., Miozzari G., Holmes W., Seeburg P.H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J.M., Gross M., Familletti P.C., Pestka S. Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active. // *Nature.* – 1980. – V. 287. – № 5781. – P. 411-416.
203. Goldberg A.L., Rock K.L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. // *Nature.* – 1992. – V. 357. – № 6377. – P. 375-379.
204. Gorelick R.J., Benveniste R.E., Lifson J.D., Yovandich J.L., Morton W.R., Kuller L., Flynn B.M., Fisher B.A., Rossio J.L., Piatak M. Jr., Bess JW. Jr., Henderson L.E., Arthur L.O. Protection of *Macaca nemestrina* from disease following pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) challenge: utilization of SIV nucleocapsid mutant DNA vaccines with and without an SIV protein boost. // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – № 24. – P. 11935-11949.
205. Gottesman S. Genetic control of the SOS system in *E. coli*. // *Cell.* – 1981. – V. 23. – № 1. – P. 1-2.
206. Grant E.P., Michalek M.T., Goldberg A.L., Rock K.L. Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. // *J. Immunol.* – 1995. – V. 155. – № 8. – P. 3750-3758.
207. Gray G.E., Allen M., Moodie Z., Churchyard G., Bekker L.G., Nchabeleng M., Mlisana K., Metch B., de Bruyn G., Latka M.H., Roux S., Mathebula M., Naicker N., Ducar C., Carter D.K., Puren A., Eaton N., McElrath M.J., Robertson M., Corey L., Kublin J.G., HVTN 503/Phambili study team. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. // *Lancet Infect. Dis.* – 2011. – V. 11. – № 7. – P. 507-515.
208. Gray P.W., Leung D.W., Pennica D., Yelverton E., Najarian R., Simonsen C.C., Derynck R., Sherwood P.J., Wallace D.M., Berger S.L., Levinson A.D., Goeddel D.V. Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. // *Nature.* – 1982. – V. 295. – № 5849. – P. 503-508.
209. Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A. DNA vaccines: immunology, application and optimization. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2000. – V. 18. – P. 927-974.
210. Guzman L.M., Barondess J.J., Beckwith J. FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*. // *J. Bacteriol.* – 1992. – V. 174. – № 23. – P. 7716-7728.
211. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* – 1999. – V. 41. – P. 95-98.

212. Hammer S.M., Sobieszczyk M.E., Janes H., Karuna S.T., Mulligan M.J., Grove D., Koblin B.A., Buchbinder S.P., Keefer M.C., Tomaras G.D., Frahm N., Hural J., Anude C., Graham B.S., Enama M.E., Adams E., DeJesus E., Novak R.M., Frank I., Bentley C., Ramirez S., Fu R., Koup R.A., Mascola J.R., Nabel G.J., Montefiori D.C., Kublin J., McElrath M.J., Corey L., Gilbert P.B., HVTN 505 Study Team. Efficacy Trial of a DNA/rAd5 HIV-1 Preventive Vaccine. // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – V. 369. – № 22. – P. 2083-2092.
213. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. // *J. Mol. Biol.* – 1983. – V. 166. – № 4. – P. 557-580.
214. Hanke T. Conserved immunogens in prime-boost strategies for the next-generation HIV-1 vaccines. // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2014. – V. 14. – № 5. – P. 601-616.
215. Hanke T., Schneider J., Gilbert S.C., Hill A.V.S., McMichael A. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice. // *Vaccine.* – 1998a. – V. 16. – № 4. – P. 426-436.
216. Hanke T., Blanchard T.J., Schneider J., Ogg G.S., Tan R., Becker M., Gilbert S.C., Hill A.V.S., Smith G.L., McMichael A. Immunogenicities of intravenous and intramuscular administration of modified vaccinia virus Ankara-based multi-CTL epitope vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in mice. // *J. Gen. Virol.* – 1998b. – V. 79. – Pt 1. – P. 83-90.
217. Hanke T., Blanchard T.J., Schneider J., Hannan C.M., Becker M., Gilbert S.C., Hill A.V.S., Smith G.L., McMichael A. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime MVA boost vaccination regime. // *Vaccine.* – 1998c. – V. 16. – № 5. – P. 439-445.
218. Hanke T., McMichael A.J. Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. // *Nature Med.* – 2000. – V. 6. – № 9. – P.951.
219. Hanke T., McMichael A. Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. // *Immunol. Lett.* – 1999. – V. 66. – № 1-3. – P. 177-181.
220. Hannig G., Makrides S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. // *Trends Biotechnol.* – 1998. – V. 16. – № 2. – P. 54-60.
221. Harari A., Bart P.A., Stohr W., Tapia G., Garcia M., Medjitna-Rais E., Burnet S., Cellerai C., Erlwein O., Barber T., Moog C., Liljestrom P., Wagner R., Wolf H., Kraehenbuhl J.P., Esteban M., Heeney J., Frchette M.J., Tartaglia J., McCormack S., Babiker A., Weber J., Pantaleo G. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional and long-lasting T cell responses. // *J. Exp. Med.* – 2008. – V. 205. – № 1. – P. 63-77.
222. Harding C.V., Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. // *J. Immunol.* – 1994. – V. 153. – № 11. – P. 4925-4933.
223. Hartikka J., Sawdey M., Cornefert-Jensen F., Margalith M., Barnhart K., Nolasco M., Vahlsing H.L., Meek J., Marquet M., Hobart P., Norman J.,

- Manthorpe M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. // *Hum. Gene Ther.* – 1996. – V. 7. – № 10. – P. 1205-1217.
224. Heraud J.M., Edghill-Smith Y., Ayala V., Kalisz I., Parrino J., Kalyanaraman V.S., Manischewitz J., King L.R., Hryniewicz A., Trindade C.J., Hassett M., Tsai W.P., Venzon D., Nalca A., Vaccari M., Silvera P., Bray M., Graham B.S., Golding H., Hooper J.W., Franchini G. Subunit recombinant vaccine protects against monkeypox. // *J. Immunol.* – 2006. – V. 177. – № 4. – P. 2552-2564.
225. Herrmann G.F., Krezdorn C., Malissard M., Kleene R., Paschold H., Weuster-Botz D., Kragl U., Berger E.G., Wandrey C. Large-scale production of a soluble human beta-1,4-galactosyltransferase using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. // *Protein Expr. Purif.* – 1995. – V. 6. – № 1. – P. 72-78.
226. Hewson R., Chamberlain J., Mioulet V., Lloyd G., Jamil B., Hasan R., Gmyl A., Gmyl L., Smirnova S.E., Lukashev A., Karganova G., Clegg C. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: sequence analysis of the small RNA segments from a collection of viruses worldwide. // *Virus Res.* – 2004a. – V. 102. – № 2. – P. 185-189.
227. Hewson R., Gmyl A., Gmyl L., Smirnova S.E., Karganova G., Jamil B., Hasan R., Chamberlain J., Clegg C. Evidence of segment reassortment in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. // *J. Gen. Virol.* – 2004b. – V. 85. – Pt 10. – P. 3059-3070.
228. Holton T.A., Graham M.W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – № 5. – P. 1156.
229. Honig J.E., Osborne J.C., Nichol S.T. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. // *Virology.* – 2004. – V. 321. – № 1. – P. 29-35.
230. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe and Africa. // *J. Med. Entomol.* – 1979. – V. 15. – № 4. – P. 307-417.
231. Hooper J.W., Custer D.M., Thompson E., Schmaljohn C.S. DNA vaccination with the Hantaan virus M gene protects hamsters against three of four HFRS hantaviruses and elicits a high-titer neutralizing antibody response in Rhesus monkeys. // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – № 18. – P. 8469-8477.
232. Hooper J.W., Kamrud K.I., Elgh F., Custer D., Schmaljohn C.S. DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects against seoul virus infection. // *Virology.* – 1999. – V. 255. – № 2. – P. 269-278.
233. Hooper J.W., Thompson E., Wilhelmsen C., Zimmerman M., Ichou M.A., Steffen S.E., Schmaljohn C.S., Schmaljohn A.L., Jahrling P.B. Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. // *J. Virol.* – 2004. – V. 78. – № 9. – P. 4433-4443.
234. Horwitz A.H., Miyada C.G., Wilcox G. Functional limits of the araIc promoter suggest an additional regulatory site for araBAD expression. // *J. Bacteriol.* – 1984. – V. 158. – № 1. – P. 141-147.

235. Houdebine L.M. Animal transgenesis: recent data and perspectives. // *Biochimie.* – 2002. – V. 84. – № 11. – P. 1137-1141.
236. Hu G.F., Strydom D.J., Fett J.W., Riordan J.F., Vallee B.L. Actin is a binding protein for angiogenin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – V. 90. – № 4. – P. 1217-1221.
237. Hutnick N.A., Myles D.J., Bian C.B., Muthumani K., Weiner D.B. Selected approaches for increasing HIV DNA vaccine immunogenicity in vivo. // *Curr. Opin. Virol.* – 2011. – V. 1. – № 4. – P. 233-240.
238. Hutnick N.A., Myles D.J., Ferraro B., Lucke C., Lin F., Yan J., Broderick K.E., Khan A.S., Sardesai N.Y., Weiner D.B. Intradermal DNA vaccination enhanced by low-current electroporation improves antigen expression and induces robust cellular and humoral immune responses. // *Hum. Gene Ther.* – 2012. – V. 23. – № 9. – P. 943-950.
239. Ingham C.J., Crombie H.J., Bruton C.J., Chater K.F., Hartley N.M., Murphy G.J., Smith M.C. Multiple novel promoters from the early region in the *Streptomyces* temperate phage phi C31 are activated during lytic development. // *Mol. Microbiol.* – 1993. – V. 9. – № 6. – P. 1267-1274.
240. Ishioka G., Fikes J., Hermanson G., Livingston B., Crimi C., Qin M., del Guercio M-F., Oseroff C., Dahlberg C., Alexander J., Chesnut R.W., Sette A. Utilization of MHC Class I Transgenic Mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162. – № 7. – P. 3915-3925.
241. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A.D., Heyneker H.L., Bolivar F., Boyer H.W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. // *Science.* – 1977. – V. 198. – № 4321. – P. 1056-1063.
242. Ito Y. Heat-resistance of the tumorigenic nucleic acids of Shope papillomavirus. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1961. – V. 47. – № 12. – P. 1897-1900.
243. Iwasaki A., Stiernholm B.J., Chan A.K., Berinstein N.L., Barber B.H. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. // *J. Immunol.* – 1997a. – V. 158. – № 10. – P. 4591-4601.
244. Iwasaki A., Torres C.A., Ohashi P.S., Robinson H.L., Barber B.H. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. // *J. Immunol.* – 1997b. – V. 159. – № 1. – P. 11-14.
245. Jackson D.A., Symons R.H., Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1972. – V. 69. – № 10. – P. 2904-2909.
246. Jacob F., Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. // *J. Mol. Biol.* – 1961. – V. 3. – P. 318-356.
247. Jakob T., Walker P.S., Krieg A.M., Udey M.C., Vogel J.C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells

- in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. // *J. Immunol.* – 1998. – V. 161. – № 6. – P. 3042-3049.
248. Ji H., Wang T.L., Chen C.H., Pai S.I., Hung C.F., Lin K.Y., Kurman R.J., Pardoll D.M., Wu T.C. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. // *Hum. Gene Ther.* – 1999. – V. 10. – № 17. – P. 2727-2740.
249. Jin X., Bauer D.E., Tuttleton S.E., Lewin S., Gettie A., Blanchard J., Irwin C.E., Safrit J.T., Mittler J., Weinberger L., Kostrikis L.G., Zhang L., Perelson A.S., Ho D.D. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189. – № 6. – P. 991-998.
250. Jourdan M., Combes T., Klein B. Control of human T-colony formation by interleukin-2. // *Immunology.* – 1985. – V. 54. – № 2. – P. 249-253.
251. Ju G., Collins L., Kaffka K.L., Tsien W.H., Chizzonite R., Crowl R., Bhatt R., Kilian P.L. Structure-function analysis of human interleukin-2. Identification of amino acid residues required for biological activity. // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – № 12. – P. 5723-5731.
252. Karpenko L.I., Bazhan S.I., Antonets D.V., Belyakov I.M. Novel approaches in polyepitope T-cell vaccine development against HIV-1. // *Expert. Rev. Vaccines.* – 2014. – V. 13. – № 1. – P. 155-173.
253. Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Ilyichev A.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Zaitsev B.N., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Bazhan S.I. Comparative analysis of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated *Salmonella* strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen. // *Vaccine.* – 2004. – V. 22. – № 13-14. – P. 1692-1699.
254. Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Zaitsev B.N., Danilenko E.D., Masicheva V.I., Bazhan S.I. Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine. Design, immunogenicity and toxicity studies. // *Vaccine.* – 2007. – V. 25. – № 21. – P. 4312-4323.
255. Kelley V.E., Bacha P., Pankewycz O., Nichols J.C., Murphy J.R., Strom T.B. Interleukin 2-diphtheria toxin fusion protein can abolish cell-mediated immunity in vivo. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85. – № 11. – P. 3980-3984.
256. Kent S.J., Zhao A., Best S.J., Chandler J.D., Boyle D.B., Ramshaw I.A. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – № 12. – P. 10180-10188.

257. Khan A.S., Brown P.A., Draghia-Akli R. Plasmid-based growth hormone-releasing hormone supplementation and its applications. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 2005. – V. 7. – № 4. – P. 306-316.
258. Khorana H.G., Agarwal K.L., Büchi H., Caruthers M.H., Gupta N.K., Kleppe K., Kumar A., Otsuka E., RajBhandary U.L., Van de Sande J.H., Sgaramella V., Terao T., Weber H., Yamada T. Studies on polynucleotides. 103. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. // *J. Mol. Biol.* – 1972. – V. 72. – № 2. – P. 209-217.
259. Khorana H.G. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. // *Pure Appl. Chem.* – 1971. – V. 25. – № 1. – P. 91-118.
260. Kikuchi Y., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G. The nucleotide sequence of the promoter and the amino-terminal region of alkaline phosphatase structural gene (phoA) of *Escherichia coli*. // *Nucleic Acids Res.* – 1981. – V. 9. – № 21. – P. 5671-5678.
261. Kinsella E., Martin S.G., Grolla A., Czub M., Feldmann H., Flick R. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. // *Virology.* – 2004. – V. 321. – № 1. – P. 23-28.
262. Kirkman R.L., Bacha P., Barrett L.V., Forte S., Murphy J.R., Strom T.B. Prolongation of cardiac allograft survival in murine recipients treated with a diphtheria toxin-related interleukin-2 fusion protein. // *Transplantation.* – 1989. – V. 47. – № 2. – P. 327-330.
263. Kiyokawa T., Shirono K., Hattori T., Nishimura H., Yamaguchi K., Nichols J.C., Strom T.B., Murphy J.R., Takatsuki K. Cytotoxicity of interleukin 2-toxin toward lymphocytes from patients with adult T-cell leukemia. // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49. – № 14. – P. 4042-4046.
264. Klavinskis L.S., Gao L., Barnfield C., Lehner T., Parker S. Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. // *Vaccine.* – 1997. – V. 15. – № 8. – P. 818-820.
265. Klinman D.M., Yamshchikov G., Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. // *J. Immunol.* – 1997. – V. 158. – № 8. – P. 3635-3639.
266. Klinman D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., Conover J., Krieg A.M. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – № 7. – P. 2879-2883.
267. Knudsen M.L., Mbewe-Mvula A., Rosario M., Johansson D.X., Kakoulidou M., Bridgeman A., Reyes-Sandoval A., Nicosia A., Ljungberg K., Hanke T., Liljeström P. Superior induction of T cell responses to conserved HIV-1 regions by electroporated alphavirus replicon DNA compared to that with conventional plasmid DNA vaccine. // *J. Virol.* – 2012. – V. 86. – № 8. – P. 4082-4090.
268. Kodihalli S., Haynes J.R., Robinson H.L., Webster R.G. Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – № 5. – P. 3391-3396.

269. Kohtz D.S., Altman A., Kohtz J.D., Puszkun S. Immunological and structural homology between human T-cell leukemia virus type I envelope glycoprotein and a region of human interleukin-2 implicated in binding the beta receptor. // *J. Virol.* – 1988. – V. 62. – № 2. – P. 659-662.
270. Komarova A.V., Tchufistova L.S., Supina E.V., Boni I.V. Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation. // *RNA.* – 2002. – V. 8. – № 9. – P. 1137-1147.
271. Kondo T., McGregor M., Chu Q., Chen D., Horimoto T., Kawaoka Y. A protective effect of epidermal powder immunization in a mouse model of equine herpesvirus-1 infection. // *Virology.* – 2004. – V. 318. – № 1. – P. 414–419.
272. Kost T.A., Condreay J.P., Jarvis D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. // *Nat. Biotechnol.* – 2005. – V. 23. – № 5. – P. 567-575.
273. Koup R.A., Safrit J.T., Cao Y., Andrews C.A., McLeod G., Borkowsky W., Farthing C., Ho D.D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome // *J Virol.* – 1994. – V. 68. – № 7. – P. 4650-4655.
274. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – V. 15. – № 20. – P. 8125-8148.
275. Kozak M. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. // *Nature.* – 1984. – V. 308. – № 5956. – P. 241-246.
276. Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in position +5 and +6. // *EMBO J.* – 1997. – V. 16. – № 9. – P. 2482-2492.
277. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. // *Gene.* – 2005. – V. 361. – P. 13-37.
278. Kozlov Yu.V., Kabishev A.A., Lukyanov E.V., Bayev A.A. The Primary Structure of the operons coding for Shigella Dysenteriae toxin and temperature phage H30 Shiga-like toxin. // *Gene.* – 1988. – V. 67. – № 2. – P. 213-221.
279. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. // *Nature.* – 1995. – V. 374. – № 6522. – P. 546-549.
280. Kuhn J.H., Seregin S.V., Morzunov S.P., Petrova I.D., Vyshemirskii O.I., Lvov D.K., Tyunnikov G.I., Gutorov V.V., Netesov S.V., Petrov V.S. Genetic analysis of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains involved in the recent outbreaks in Russia. // *Arch. Virol.* – 2004. – V. 149. – № 11. – P. 2199-2213.
281. Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. // *Bioinformatics.* – 2001. – V. 17. – № 12. – P. 1244-1245.

282. Kuo L.-M., Robb R.J. Structure-function relationships for the IL 2-receptor system. I. Localization of a receptor binding site on IL 2. // *J. Immunol.* – 1986a. – V. 137. – № 5. – P. 1538-1543.
283. Kuo L.-M., Rusk C.M., Robb R.J. Structure-function relationships for the IL 2-receptor system. II. Localization of an IL 2 binding site on high and low affinity receptors. // *J. Immunol.* – 1986b. – V. 137. – № 5. – P. 1544-1551.
284. Kupiec-Weglinski J.W., Diamantstein T., Tilney N.L. Interleukin 2 receptor-targeted therapy - rationale and applications in organ transplantation. // *Transplantation.* – 1988. – V. 46. – № 6. – P. 785-792.
285. Kurachi K., Rybak S.M., Fett J.W., Shapiro R., Strydom D.J., Olson K.A., Riordan J.F., Davie E.W., Vallee B.L. Expression of human angiogenin in cultured baby hamster kidney cells. // *Biochemistry.* – 1988. – V. 27. – № 17. – P. 6557-6562.
286. Kushner P.J., Baxter J.D., Duncan K.G., Lopez G.N., Schaufele F., Uht R.M., Webb P., West B.L. Eukaryotic regulatory elements lurking in plasmid DNA: the activator protein-1 site in pUC. // *Mol. Endocrinol.* – 1994. – V. 8. – № 4. – P. 405-407.
287. Kuttler C., Nussbaum A.K., Dick T.P., Rammensee H.G., Schild H., Haderl K.P. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V. 298. – № 3. – P. 417-429.
288. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature.* – 1970. – V. 227. – № 5259. – P. 680-685.
289. Lalvani A., Aidoo M., Allsopp C.E., Plebanski M., Whittle H.C., Hill A.V. An HLA-based approach to the design of a CTL-inducing vaccine against *Plasmodium falciparum*. // *Res. Immunol.* – 1994. – V. 145. – № 6. – P. 461-468.
290. Laursen B.S., Sørensen H.P., Mortensen K.K., Sperling-Petersen H.U. Initiation of protein synthesis in bacteria. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2005. – V. 69. – № 1. – P. 101-123.
291. Lavrinenko I.A., Lavrinenko V.A., Ryabchenko A.V., Beklemishev A.B. Development of a biosensor test system with GFP reporter protein for detection of DNA damages. // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2006. – V. 141. – № 1. – P. 33-35.
292. Lebedev L.R., Karpenko L.I., Poryvaeva V.A., Azaev M.Sh., Riabchikova E.I., Gileva I.P., Il'ichev A.A. Design of virus-like particles, exposing HIV-1 epitopes. // *Mol. Biol.* – 2000. – V. 34. – № 3. – P. 480-485.
293. Lee C.H., Mizusawa H., Kakefuda T. Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1981. – V. 78. – № 5. – P. 2838-2842.
294. Lee F.S., Vallee B.L. Characterization of ribonucleolytic activity of angiogenin towards tRNA. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. – V. 161. – № 1. – P. 121-126.
295. Lee N., Francklyn C., Hamilton E.P. Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – V. 84. – № 24. – P. 8814-8818.

296. Letvin N.L. Progress in the development of an HIV-1 vaccine. // *Science*. – 1998. – V. 280. – № 5371. – P.1875-1880.
297. Liang S.-M., Thatcher D.R., Liang C.-M., Allet B. Studies of structure-activity relationships of human interleukin-2. // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261. – № 1. – P. 334-337.
298. Lipford G.B., Bauer M., Blank C., Reiter R., Wagner H., Heeg K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – V. 27. – № 9. – P. 2340-2344.
299. Little J.W., Mount D.W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. // *Cell*. – 1982. – V. 29. – № 1. – P. 11-22.
300. Livingston B.D., Newman M., Crimi C., McKinney D., Chesnut R., Sette A. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines. // *Vaccine*. – 2001. – V. 19. – № 32. – P. 4652-4660.
301. Loktev V.B., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M., Karpenko L.I., Pokrovsky A.G., Svyatchenko V.A., Ignat'ev G.M., Smolina M.I., Melamed N.V., Lebedeva C.D., Sandakhchiev L.S. Design of immunogens as components of a new generation of molecular vaccines. // *J. Biotechnol.* – 1996. – V.44. – № 1-3. – P. 129-137.
302. Lorberboum-Galski H., FitzGerald D., Chaudhary V., Adhya S., Pastan I. Cytotoxic activity of an interleukin 2-Pseudomonas exotoxin chimeric protein produced in *Escherichia coli*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1988. – V. 85. – № 6. – P. 1922-1926.
303. Lorenzen N., LaPatra S.E. DNA vaccines for aquacultured fish. // *Rev. Sci. Tech.* – 2005. – V. 24. – № 1. – P. 201-213.
304. Luckey C.J., King G.M., Marto J.A., Venketeswaran S., Maier B.F., Crotzer V.L., Colella T.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Engelhard V.H. Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: Evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. // *J. Immunol.* – 1998. – V. 161. – № 1. – P. 112-121.
305. Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J.M., Sorge J.A., Mathur E.J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. // *Gene*. – 1991. – V. 108. – № 1. – P. 1-6.
306. Ma B., Zhang S., Jiang H., Zhao B., Lv H. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. // *J. Control Release*. – 2007. – V. 123. – № 3. – P. 184-194.
307. Mandecki W., Mollison K.W., Bolling T.J., Powell B.S., Carter G.W., Fox J.L. Chemical synthesis of a gene encoding the human complement fragment C5a and its expression in *Escherichia coli*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1985. – V. 82. – № 11. – P. 3543-3547.
308. Mandecki W. Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1986. – V. 83. – № 19. – P. 7177-7181.

309. Mandecki W., Powell B.S., Mollison K.W., Carter G.W., Fox J.L. High-level expression of a gene encoding the human complement factor C5a in *Escherichia coli*. // *Gene*. – 1986. – V. 43. – № 1-2. – P. 131-138.
310. Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. // *J. Mol. Biol.* – 1970. – V. 14. – № 1. – P. 159-162.
311. Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. 1970. // *Biotechnology*. – 1992. – V. 24. – P. 198-201.
312. Mariott A.C., Polyzeni T., Antoniadis A., Nuttall P.A. Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein. // *Gen. Virol.* – 1994. – V. 75. – Pt 9. – P. 2157-2161.
313. Marugg J.D., Meijer W., van Kranenburg R., Laverman P., Bruinenberg P.G., de Vos W.M. Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. // *J. Bacteriol.* – 1995. – V. 177. – № 11. – P. 2982-2989.
314. Masopust D., Jiang J., Shen H., Lefrançois L. Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection. // *J. Immunol.* – 2001. – V. 166. – № 4. – P. 2348-2356.
315. Maxam A.M., Gilbert W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. // *Methods Enzymol.* – 1980. – V. 65. – № 1. – P. 499-560.
316. McConkey S.J., Reece W.H., Moorthy V.S., Webster D., Dunachie S., Butcher G., Vuola J.M., Blanchard T.J., Gothard P., Watkins K., Hannan C.M., Everaere S., Brown K., Kester K.E., Cummings J., Williams J., Heppner D.G., Pathan A., Flanagan K., Arulanantham N., Roberts M.T., Roy M., Smith G.L., Schneider J., Peto T., Sinden R.E., Gilbert S.C., Hill A.V. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. // *Nat. Med.* – 2003. – V. 9. – № 6. – P. 729-735.
317. McGraw T., Mindich L., Frangione B. Nucleotide sequence of the small double-stranded RNA segment of bacteriophage phi 6: novel mechanism of natural translational control. // *J. Virol.* – 1986. – V. 58. – № 1. – P. 142-151.
318. McKay P.F., Schmitz J.E., Barouch D.H., Kuroda M.J., Lifton M.A., Nickerson C.E., Gorgone D.A., Letvin N.L. Vaccine protection against functional CTL abnormalities in simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. // *J. Immunol.* – 2002. – V. 168. – № 1. – P. 332-337.
319. McKinnon L.R., Card C.M. HIV vaccine efficacy trials: A brief history, and options for going forward. // *AIDS Rev.* – 2010. – V. 12. – № 4. – P. 209-217.
320. McMichael A., Hanke T. The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible? // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – V. 2. – № 4. – P. 283-291.
321. McMichael A.J., Hanke T. Is an HIV vaccine possible? // *Nature Med.* – 1999. – V. 5. – № 6. – P. 612-614.
322. McMichael A.J., Borrow P., Tomaras G.D., Goonetilleke N., Haynes B.F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – V. 10. – № 1. – P. 11-23.

323. McMichael A.J., Callan M., Appay V., Hanke T., Ogg G., Rowland-Jones S. The dynamics of the cellular immune response to HIV infection: implications for vaccination. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2000. – V. 355. – № 1400. – P. 1007-1011.
324. McMichael A.J., Haynes B.F. Lessons learned from HIV-1 vaccine trials: new priorities and directions. // *Nat. Immunol.* – 2012. – V. 13. – № 5. – P. 423-427.
325. McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Cellular immune responses to HIV. // *Nature.* – 2001. – V. 410. – № 6831. – P. 980-987.
326. McMichael A. Prospects for an AIDS vaccine. // *Clin. Med.* – 2003. – V. 3. – № 3. – P. 269-272.
327. zur Megede J., Chen M.C., Doe B., Schaefer M., Greer C.E., Selby M., Otten G.R., Barnett S.W. Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – № 6. – P. 2628-2635.
328. Meissner J.D., Seregin S.S., Seregin S.V., Vyshemieskii O.J., Yakimenko N.V., Netesov S.V., Petrov V.S. The complete genomic sequence of Strain ROS/HUVLV-100, a representative Russian Crimean Congo hemorrhagic fever virus strain. // *Virus Genes.* – 2006a – V. 33. – № 1. – P. 87-93.
329. Meissner J.D., Seregin S.S., Seregin S.V., Vyshemirskii O.I., Samokhvalov E.I., Lvov D.K., Netesov S.V., Petrov V.S. A variable region in the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment distinguishes between strains isolated from different geographic regions. // *J. Med. Virol.* – 2006b. – V. 78. – № 2. – P. 223-228.
330. Meissner J.D., Seregin S.S., Seregin S.V., Vyshemirskii O.I., Samokhvalov E.I., Lvov D.K., Netesov S.V., Petrov V.S. Complete L segment coding-region sequences of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains from the Russian Federation and Tajikistan. // *Arch. Virol.* – 2006c. – V. 151. – № 3. – P. 465-475.
331. Mild M., Simon M., Albert J., Mirazimi A. Towards an understanding of the migration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. // *J. Gen. Virol.* – 2010. – V. 91. – Pt 1. – P. 199-207.
332. Miyada C.G., Stoltzfus L., Wilcox G. Regulation of the araC gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on araBAD expression. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1984. – V. 81. – № 13. – P. 4120-4124.
333. Mollison K.W., Mandrecki W., Zuiderweg E.R., Fayer L., Fey T.A., Krause R.A., Conway R.G., Miller L., Edalji R.P., Shallcross M.A. Identification of receptor-binding residues in the inflammatory complement protein C5a by site-directed mutagenesis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – V. 86. – № 1. – P. 292-296.
334. Moore R.A., Nicholls P.K., Santos E.B., Gough G.W., Stanley M.A. Absence of canine oral papillomavirus DNA following prophylactic L1 particle-mediated immunotherapeutic delivery vaccination. // *J. Gen. Virol.* – 2002. – V. 83. – Pt. 9. – P. 2299-2301.

335. Morgan E.L., Weigle W.O., Hugli T.E. Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. I. C3a-mediated suppression of human and murine humoral immune responses. // *J. Exp. Med.* – 1982. – V. 155. – № 5. – P. 1412-1426.
336. Morikawa S., Saijo M., Kurane I. Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2007. – V. 30. – № 5-6. – P. 375-389.
337. Moroianu J., Riordan J.F. Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – V. 91. – № 5. – P. 1677-1681.
338. Mottl H., Keck W. Purification of penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli* as a soluble protein by dye-affinity chromatography. // *Eur. J. Biochem.* – 1991. – V. 200. – № 3. – P. 767-773.
339. Mousavi-Jazi M., Karlberg H., Papa A., Christova I., Mirazimi A. Healthy individuals' immune response to the Bulgarian Crimean-Congo hemorrhagic fever virus vaccine. // *Vaccine.* – 2012. – V. 30. – № 44. – P. 6225-6229.
340. Mudd P.A., Martins M.A., Ericson A.J., Tully D.C., Power K.A., Bean A.T., Piaskowski S.M., Duan L., Seese A., Gladden A.D., Weisgrau K.L., Furlott J.R., Kim Y.I., Veloso de Santana M.G., Rakasz E., Capuano S. 3rd, Wilson N.A., Bonaldo M.C., Galler R., Allison D.B., Piatak M. Jr., Haase A.T., Lifson J.D., Allen T.M., Watkins D.I. Vaccine-induced CD8(+) T cells control AIDS virus replication. // *Nature.* – 2012. – V. 491. – № 7422. – P. 129-133.
341. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 1986. – V. 51. – Pt 1. – P. 263-273.
342. Munson L.M., Stormo G.D., Niece R.L., Reznikoff W.S. lacZ translation initiation mutations. // *J. Mol. Biol.* – 1984. – V. 177. – № 4. – P. 663-683.
343. Murashev B., Kazennova E., Kozlov A., Murasheva I., Dukhovlinova E., Galachyants Y., Dorofeeva E., Dukhovlinov I., Smirnova G., Masharsky A., Klimov N., Kozlov A.P. Immunogenicity of candidate DNA vaccine based on subtype A of human immunodeficiency virus type 1 predominant in Russia. // *Biotechnol. J.* – 2007. – V. 2. – № 7. – P. 871-878.
344. Narang S.A., Brousseau R., Hsiung H.M., Sung W., Scarpulla R., Ghangas G., Lau L., Hess B., Wu R. Synthesis of the human insulin gene. Part IV. New synthetic deoxyribonucleotide adaptors and primer for DNA cloning and sequence analysis. // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 1980. – № 7. – P. 377-385.
345. Neeper M.P., Kuo L.-M., Kiefer M.C., Robb R.J. Structure function relationships for the IL 2 receptor system. III. Tac protein missing amino acids 102 to 173 (exon 4) is unable to bind IL 2: detection of spliced protein after L cell transfection. // *J. Immunol.* – 1987. – V. 138. – № 10. – P. 3532-3538.
346. Nilsson B., Abrahmsén L. Fusions to staphylococcal protein A. // *Methods Enzymol.* – 1990. – V. 185. – P. 144-161.

347. Nitayaphan S., Pitisuttithum P., Karnasuta C., Eamsila C., de Souza M., Morgan P., Polonis V., Benenson M., VanCott T., Ratto-Kim S., Kim J., Thapinta D., Garner R., Bussaratid V., Singharaj P., el-Habib R., Gurunathan S., Heyward W., Birx D., McNeil J., Brown A.E., Thai AIDS Vaccine Evaluation Group. Safety and immunogenicity of an HIV subtype B and E prime-boost vaccine combination in HIV-negative Thai adults. // *J. Infect. Dis.* – 2004. – V. 190. – № 4. – P. 702-706.
348. O'Connor M, Asai T, Squires CL, Dahlberg AE. Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – № 16. – P. 8973-8978.
349. Ogata S., Fukuda M. Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 7. – P. 5210-5217.
350. Ogden S., Haggerty D., Stoner C.M., Kolodrubetz D., Schleif R. The Escherichia coli L-arabinose operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – V. 77. – № 6. – P. 3346-3350.
351. Ogg G.S., McMichael A.J. Quantitation of antigen-specific CD8+ T-cell responses. // *Immunol. Lett.* – 1999. – V. 66. – № 1-3. – P. 77-80.
352. Oldstone M.B. Viral persistence. // *Cell.* – 1989. – V. 56. – № 4. – P. 517-520.
353. Olschläger S., Gabriel M., Schmidt-Chanasit J., Meyer M., Osborn E., Conger N.G., Allan P.F., Günther S. Complete sequence and phylogenetic characterisation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from Afghanistan. // *J. Clin. Virol.* – 2011. – V. 50. – № 1. – P. 90-92.
354. Oppenheim D.S., Yanofsky C. Translational coupling during expression of the tryptophan operon of Escherichia coli. // *Genetics.* – 1980. – V. 95. – № 4. – P. 785-795.
355. Orth G., Atanasiu P., Boiron M., Rebiere J.P., Paoletti C. Infectious and oncogenic effect of DNA extracted from cells infected with polyoma virus. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1964. – V. 115. – P. 1090-1095.
356. Pan C.H., Chen H.W., Huang H.W., Tao M.H. Protective mechanisms induced by a Japanese encephalitis virus DNA vaccine: requirement for antibody but not CD8(+) cytotoxic T-cell responses. // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – № 23. – P. 11457-11463.
357. Pankewycz O., Mackie J., Hassarjian R., Murphy J.R., Strom T.B., Kelley V.E. Interleukin-2-diphtheria toxin fusion protein prolongs murine islet cell engraftment. // *Transplantation.* – 1989. – V. 47. – № 2. – P. 318-322.
358. Pantaleo G., Esteban M., Jacobs B., Tartaglia J. Poxvirus vector-based HIV vaccines. // *Curr. Opin. HIV AIDS.* – 2010. – V. 5. – № 5. – P. 391-396.
359. Papa A., Ma B., Kouidou S., Tang Q., Hang C., Antoniadis A. Genetic characterization of the M RNA segment of Crimean Congo hemorrhagic fever virus strains, China. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2002. – V. 8. – № 1. – P. 50-53.

360. Person R., Bodles-Brakhop A.M., Pope M.A., Brown P.A., Khan A.S., Draghia-Akli R. Growth hormone-releasing hormone plasmid treatment by electroporation decreases offspring mortality over three pregnancies. // *Mol. Ther.* – 2008. – V. 16. – № 11. – P. 1891-1897.
361. Pestka S. The purification and manufacture of human interferons. Their promise is still not fulfilled, but now their genes have been isolated and cloned in *E. coli*. The bacteria are making interferon in quantity and the bacterial product is undergoing clinical trials. // *Sci. Am.* – 1983. – V. 249. – № 2. – P. 37-43.
362. Peters B., Bulik S., Tampe R., Van Endert P.M., Holzhütter H.G. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171. – № 4. – P. 1741-1749.
363. Peterson D.O., Beifuss K.K., Morley K.L. Context-Dependent Gene expression: cis-acting negative effects of specific prokaryotic plasmid sequences on eukaryotic genes. // *Mol. Cell Biol.* – 1987. – V. 7. – № 4. – P. 1563-1567.
364. Pillai V.B., Hellerstein M., Yu T., Amara R.R., Robinson H.L. Comparative studies on in vitro expression and in vivo immunogenicity of supercoiled and open circular forms of plasmid DNA vaccines. // *Vaccine.* – 2008. – V. 26. – № 8. – P. 1136-1141.
365. Pitisuttithum P., Choopanya K., Rerk-Ngam S. HIV-vaccine research and development in Thailand: evolution and challenges. // *Vaccine.* – 2010. – V. 28. – Suppl. 2. – B. 45-49.
366. Pitisuttithum P., Gilbert P., Gurwith M., Heyward W., Martin M., van Griensven F., Hu D., Tappero J.W., Choopanya K., Bangkok Vaccine Evaluation Group. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand // *J. Infect. Dis.* – 2006. – V. 194. – № 12. – P. 1661-1671.
367. Plater R., Robinson J.A. Cloning and sequence of a gene encoding macrotetrolide antibiotic resistance from *Streptomyces griseus*. // *Gene.* – 1992. – V. 112. – № 1. – P. 117-122.
368. Platt T. Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of *E. coli*. // *Cell.* – 1981. – V. 24. – № 1. – P. 10-23.
369. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2010. – V. 17. – № 7. – P. 1055-1065.
370. Pogue R.R., Eron J., Frelinger J.A., Matsui M. Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – № 18. – P. 8166-8170.
371. Porgador A., Yewdell J.W., Deng Y., Bennink J.R., Germain R.N. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. // *Immunity.* – 1997. – V. 6. – № 6. – P. 715-726.
372. Powell K. DNA vaccines – back in the saddle again? // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – № 7. – P. 799-801.

373. Price B.M., Liner A.L., Park S., Leppla S.H., Mateczun A., Galloway D.R. Protection against anthrax lethal toxin challenge by genetic immunization with a plasmid encoding the lethal factor protein. // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69. – № 7. – P. 4509-4515.
374. Price D.A., Sewell A.K., Dong T., Tan R., Goulder P.J., Rowland-Jones S.L., Phillips R.E. Antigen-specific release of beta-chemokines by anti-HIV-1 cytotoxic T lymphocytes. // *Cur. Biol.* – 1998. – V. 8. – № 6. – P. 355-358.
375. Putnak R., Fuller J., VanderZanden L., Innis B.L., Vaughn D.W. Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2003. – V. 68. – № 4. – P. 469-476.
376. Qing G., Xia B., Inouye M. Enhancement of translation initiation by A/T-rich sequences downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – V. 6. – № 3-4. – P. 133-144.
377. Rainczuk A., Smooker P.M., Kedzierski L., Black C.G., Coppel R.L., Spithill T.W. The protective efficacy of MSP4/5 against lethal *Plasmodium chabaudi adami* challenge is dependent on the type of DNA vaccine vector and vaccination protocol. // *Vaccine.* – 2003. – V. 21. – № 21-22. – P. 3030-3042.
378. Rammensee H.G., Falk K., Roetzschke O. MHC molecules as peptide receptors. // *Curr. Opin. Immunol.* – 1993. – V. 5. – № 1. – P. 35-44.
379. Raz E., Carson D., Parker S., Parr T., Abai A., Aichinger G., Gromkowski S., Singh M., Lew D., Yankauckas M., Baird S., Rhodes G. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – V. 91. – № 20. – P. 9519-9523.
380. Régnier P., Arraiano C.M. Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. // *Bioessays.* – 2000. – V. 22. – № 3. – P. 235-244.
381. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T Cell-Epitope Immunogens. // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – № 3. – e0116412.
382. Renfer L., Frank M.M., Hammer C.H., Harvath L., Lawley T.J., Yancey K.B. A simplified method for purification of human C5a from citrated plasma. // *J. Immunol. Methods.* – 1986. – V. 88. – № 2. – P. 193-205.
383. Ren Y.G., Wu B., Pan Y., Lv F., Kong X., Luo X., Li Y., Yang Q. Characterization of the binding profile of peptide to transporter associated with antigen processing (TAP) using Gaussian process regression. // *Comput. Biol. Med.* – 2011. – V. 41. – № 9. – P. 865-870.
384. Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., Kaewkungwal J., Chiu J., Paris R., Prem Sri N., Namwat C., de Souza M., Adams E., Benenson M., Gurunathan S., Tartaglia J., McNeil J.G., Francis D.P., Stablein D., Birx D.L., Chunsuttiwat S., Khamboonruang C., Thongcharoen P., Robb M.L., Michael N.L., Kunasol P., Kim J.H., MOPH-TAVEG Investigators. Vaccination with ALVAC

- and AIDS VAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – V. 361. – № 23. – P. 2209-2220.
385. Riemenschneider J., Garrison A., Geisbert J., Jahrling P., Hevey M., Negley D., Schmaljohn A., Lee J., Hart M.K., Vanderzanden L., Custer D., Bray M., Ruff A., Ivins B., Bassett A., Rossi C., Schmaljohn C. Comparison of individual and combination DNA vaccines for *B. anthracis*, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. // *Vaccine.* – 2003. – V. 21. – № 25-26. – P. 4071-4080.
386. Robinson H.L., Montefiori D.C., Johnson R.P., Manson K.H., Kalish M.L., Lifson J.D., Rizvi T.A., Lu S., Hu S.L., Mazzara G.P., Panicali D.L., Herndon J.G., Glickman R., Candido M.A., Lydy S.L., Wyand M.S., McClure H.M. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. // *Nat. Med.* – 1999. – V. 5. – № 5. – P. 526-534.
387. Robinson H.L., Montefiori D.C., Villinger F., Robinson J.E., Sharma S., Wyatt L.S., Earl P.L., McClure H.M., Moss B., Amara R.R. Studies on GM-CSF DNA as an adjuvant for neutralizing Ab elicited by a DNA/MVA immunodeficiency virus vaccine. // *Virology.* – 2006. – V. 352. – № 2. – P. 285-294.
388. Rodriguez F., An L.L., Harkins S., Zhang J., Yokoyama M., Widera G., Fuller J.T., Kincaid C., Campbell I.L., Whitton J.L. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – № 6. – P. 5174-5181.
389. Rodriguez F., Harkins S., Redwine J.M., de Pereda J.M., Whitton J.L. CD4(+) T cells induced by a DNA vaccine: immunological consequences of epitope-specific lysosomal targeting. // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – № 21. – P. 10421-10430.
390. Rodriguez L.L., Maupin G.O., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Khan A.S., Schwarz T.F., Lofts R.S., Smith J.F., Noor A.M., Peters C.J., Nichol S.T. Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1997. – V. 57. – № 5. – P. 512-518.
391. Rosario M., Bridgeman A., Quakkelaar E.D., Quigley M.F., Hill B.J., Knudsen M.L., Ammendola V., Ljungberg K., Borthwick N., Im E.J., McMichael A.J., Drijfhout J.W., Greenaway H.Y., Venturi V., Douek D.C., Colloca S., Liljeström P., Nicosia A., Price D.A., Melief C.J., Hanke T. Long peptides induce polyfunctional T cells against conserved regions of HIV-1 with superior breadth to single-gene vaccines in macaques. // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – V. 40. – № 7. – P. 1973-1984.
392. Rosati M., Valentin A., Jalah R., Patel V., von Gegerfelt A., Bergamaschi C., Alicea C., Weiss D., Treece J., Pal R., Markham P.D., Marques E.T., August J.T., Khan A., Draghia-Akli R., Felber B.K., Pavlakis G.N. Increased immune responses

- in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. // *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – № 40. – P. 5223-5229.
393. Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D.S., Lin S.W., Dunn J.J., Studier F.W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. // *Gene*. – 1987. – V. 56. – № 1. – P. 125-135.
394. Rossi J.J., Kierzek R., Huang T., Walker P.A., Itakura K. An alternate method for synthesis of double-stranded DNA segments. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – V. 257. – № 16. – P. 9226-9229.
395. Rowland-Jones S., Sutton J., Ariyoshi K., Dong T., Gotch F., McAdam S., Whitby D., Sabally S., Gallimore A., Corrah T., Takiguchi M., Schultz T., McMichael A., Whittle H. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. // *Nat. Med.* – 1995. – V.1. – № 1. – P. 59-64.
396. Rusk C.M., Neeper M.P., Kuo L.-M., Kutny R.M., Robb R.J. Structure-function relationships for the IL-2 receptor system. V. Structure-activity analysis of modified and truncated forms of the Tac receptor protein: site-specific mutagenesis of cysteine residues. // *J. Immunol.* – 1988. – V. 140. – № 7. – P. 2249-2259.
397. Rychlik W., Rhoads R.E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – V. 17 – № 21. – P. 8543-8551.
398. Rychlik W., Rychlik P. *Oligo 6: Primer analysis software*. – Molecular biology insights. – Connecticut – 2000.
399. Saez-Cirion A., Lacabaratz C., Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, Barré-Sinoussi F, Delfraissy JF, Sinet M, Pancino G, Venet A; Agence Nationale de Recherches sur le Sida EP36 HIV Controllers Study Group. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – V. 104. – № 16. – P. 6776-6781.
400. Saez-Cirion A., Sinet M., Shin S.Y., Urrutia A., Versmisse P., Lacabaratz C., Boufassa F., Avettand-Fènoël V., Rouzioux C., Delfraissy J.F., Barré-Sinoussi F., Lambotte O., Venet A., Pancino G., ANRS EP36 HIV Controllers Study Group. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. // *J. Immunol.* – 2009. – V. 182. – № 12. – P. 7828-7837.
401. Saijo M., Tang Q., Niikura M., Maeda A., Ikegami T., Prehaud C., Kurane I., Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – V. 40. – № 5. – P. 1587-1591.
402. Saijo M., Tang Q., Shimayi B., Han L., Zhang Y., Asiguma M., Tianshu D., Maeda A., Kurane I., Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. // *J. Med. Virol.* – 2005. – V. 75. – № 2. – P. 295-299.

403. Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. // *Nature*. – 1986. – V. 324. – № 6093. – P. 163-166.
404. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. // *Science*. – 1988. – V. 239. – № 4839. – P. 487-491.
405. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. // *Biotechnology*. – 1992. – V. 24. – P. 476-480.
406. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. // *Science*. – 1985. – V. 230. – № 4732. – P. 1350-1354.
407. Sakai T., Hisaeda H., Nakano Y., Zhang M., Takashima M., Ishii K., Maekawa Y., Matsumoto S., Nitta Y., Miyazaki J., Yamamoto S., Himeno K. Gene gun-based co-immunization of merozoite surface protein-1 cDNA with IL-12 expression plasmid confers protection against lethal *Plasmodium yoelii* in A/J mice. // *Vaccine*. – 2003. – V. 21. – № 13-14. – P. 1432-1444.
408. Sakhatsky P., Wang S., Chou T.H., Lu S. Immunogenicity and protection efficacy of monovalent and polyvalent poxvirus vaccines that include the D8 antigen. // *Virology*. – 2006. – V. 355. – № 2. – P. 164-174.
409. Sambrook J., Russell D.W. Expression of secreted foreign proteins using the alkaline phosphatase promoter (phoA) and signal sequence. // *Cold Spring Harb. Protoc.* – 2006. – V. 2006. – № 1. – pii: pdb.prot3654. doi: 10.1101/pdb.prot3654.
410. Samudzi R.R., Leman P.A., Paweska J.T., Swanepoel R., Burt F.J. Bacterial expression of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein and its evaluation as a diagnostic reagent in an indirect ELISA. // *J. Virol. Methods*. – 2012. – V. 179. – № 1. – P. 70-76.
411. Sanchez A.J., Vincent M.J., Nichol S.T. Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – № 14. – P. 7263-7275.
412. Sandoval I.V., Arredondo J.J., Alcalde J., Gonzalez Noriega A., Vandekerckhove J., Jimenez M.A., Rico M. The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 9. – P. 6622-6631.
413. Sanger F., Nichen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1977. – V. 74. – № 15. – P. 5463-5467.

414. Sanou M.P., De Groot A.S., Murphey-Corb M., Levy J.A., Yamamoto J.K. HIV-1 Vaccine Trials: Evolving Concepts and Designs. // *Open AIDS J.* – 2012. – V. 6. – P. 274-788.
415. Sardewsai N.Y., Weiner D.B. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2011. – V. 23. – № 3. – P. 421-429.
416. Sarmientos P., Sylvester J.E., Contente S., Cashel M. Differential stringent control of the tandem *E. coli* ribosomal RNA promoters from the *rrnA* operon expressed in vivo in multicopy plasmids. // *Cell.* – 1983. – V. 32. – № 4. – P. 1337-1346.
417. Sasaki S., Amara R.R., Yeow W.S., Pitha P.M., Robinson H.L. Regulation of DNA-primed immune responses by cotransfected interferon regulatory factors. // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – № 13. – P. 6652-6659.
418. Sato T., Matsui H., Shibahara S., Kobayashi T., Morinaga Y., Kashima N., Yamasaki S., Hamuro J., Taniguchi T. New approaches for the high-level expression of human interleukin-2 cDNA in *Escherichia coli*. // *J. Biochem.* – 1987. – V. 101. – № 2. – P. 525-534.
419. Sato Y., Roman M., Tighe H., Lee D., Corr M., Nguyen M.D., Silverman G.J., Lotz M., Carson D.A., Raz E. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. // *Science.* – 1996. – V. 273. – № 5273. – P. 352-354.
420. Saunders K.O., Rudicell R.S., Nabel G.J. The design and evaluation of HIV-1 vaccines. // *AIDS.* – 2012. – V. 26. – № 10. – P. 1293-302.
421. Scheiblhofer S., Weiss R., Durnberger H., Mostböck S., Breitenbach M., Livey I., Thalhamer J. A DNA vaccine encoding the outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi* is able to induce protective immune responses. // *Microbes Infect.* – 2003. – V. 5. – № 11. – P. 939-946.
422. Schmaljohn C., Vanderzanden L., Bray M., Custer D., Meyer B., Li D., Rossi C., Fuller D., Fuller J., Haynes J., Huggins J. Naked DNA vaccines expressing the prM and E genes of Russian spring summer encephalitis virus and Central European encephalitis virus protect mice from homologous and heterologous challenge. // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – № 12. – P. 9563-9569.
423. Schmitz J.E., Kuroda M.J., Santra S., Sasseville V.G., Simon M.A., Lifton M.A., Racz P., Tenner-Racz K., Dalesandro M., Scallon B.J., Ghayeb J., Forman M.A., Montefiori D.C., Rieber E.P., Letvin N.L., Reimann K.A. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. // *Science.* – 1999. – V. 283. – № 5403. – P. 857-860.
424. Schneider S.C., Ohmen J., Fosdick L., Gladstone B., Guo J., Ametani A., Sercarz E.E., Deng H. Cutting edge: Introduction of an endopeptidase cleavage motif into a determinant flanking region of hen egg lysozyme results in enhanced T cell determinant display. // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165. – № 1. – P. 20-23.
425. Schoenly K.A., Weiner D.B. Human immunodeficiency virus type 1 vaccine development: recent advances in the cytotoxic T-lymphocyte platform “spotty business”. // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – № 7. – P. 3166-3180.

426. Schwarz T.F., Nsanze H., Ameen A.M. Clinical features of Crimean-Congo haemorrhagic fever in the United Arab Emirates. // *Infection*. – 1997. – V. 25. – № 6. – P. 364-367.
427. Schwarz T.F., Nsanze H., Longson M., Nitschko H., Gilch S., Shurie H., Ameen A., Zahir A.R., Acharya U.G., Jager G. Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1996. – V. 55. – № 2. – P. 190-196.
428. Sengupta J., Agrawal R.K., Frank J. Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – V. 98. – № 21. – P. 11991-11996.
429. Seregin S.V., Babkina I.N., Nesterov A.E., Sinyakov A.N., Shchelkunov S.N. Comparative studies of gamma-interferon receptor-like proteins of variola major and variola minor viruses. // *FEBS Lett.* – 1996. – V. 382. – № 1-2. – P. 79-83.
430. Seregin S.V., Samokhvalov E.I., Petrova I.D., Vyshemirskii O.I., Samokhvalova E.G., Lvov D.K., Gutorov V.V., Tyunnikov G.I., Shchelkunov S.N., Netesov S.V., Petrov V.S. Genetic characterization of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains isolated in Russia and Tajikistan. // *Virus Genes*. – 2004. – V. 28. – № 2. – P. 187-193.
431. Sette A., Sidney J. HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism. // *Curr. Opin. Immunol.* – 1998. – V. 4. – № 4. – P. 478-482.
432. Shapiro R., Harper J.W., Fox E.A., Jansen H.W., Hein F., Uhlmann E. Expression of Met(-1) angiogenin in *Escherichia coli*: conversion to the authentic less than Glu-1 protein. // *Anal. Biochem.* – 1988. – V. 175. – № 2. – P. 450-461.
433. Shapiro R., Strydom D.J., Olson K.A., Vallee B.L. Isolation of angiogenin from normal human plasma. // *Biochemistry* – 1987. – V. 26. – № 16. – P. 5141-5146.
434. Shchelkunov S.N., Blinov V.M., Resenchuk S.M., Totmenin A.V., Olenina L.V., Chirikova G.B., Sandakhchiev L.S. Analysis of the nucleotide sequence of 53 kbp from the right terminus of the genome of variola major virus strain India-1967. // *Virus Res.* – 1994. – V. 34. – № 3. – P. 207-236.
435. Shchelkunov S.N., Blinov V.M., Sandakhchiev L.S. Genes of variola and vaccinia viruses needed for overcoming of the host protective mechanisms. // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 319. – № 1-2. – P. 80-83.
436. Shine J., Dalgarno L. Terminal-sequence analysis of bacterial ribosomal RNA. Correlation between the 3'-terminal-polypyrimidine sequence of 16-S RNA and translational specificity of the ribosome. // *Eur. J. Biochem.* – 1975. – V. 57. – № 1. – P. 221-230.
437. Shirakawa M., Tsurimoto T., Matsubara K. Plasmid vectors designed for high-efficiency expression controlled by the portable *recA* promoter-operator of *Escherichia coli*. // *Gene*. – 1984. – V. 28. – № 1. – P. 127-132.

438. Sidney J., Grey H.M., Kubo R.T., Sette A. Practical, biochemical and evolutionary implication of the discovery of HLA class I supermotifs. // *Immunol. today.* – 1996. – V. 17. – № 6. – P. 261-266.
439. Siegall C.B., Chaudhary V.K., FitzGerald D.J., Pastan I. Cytotoxic activity of an interleukin 6-Pseudomonas exotoxin fusion protein on human myeloma cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85. – № 24. – P. 9738-9742.
440. Simonetti A., Marzi S., Myasnikov A.G., Fabbretti A., Yusupov M., Gualerzi C.O., Klaholz B.P. Structure of the 30S translation initiation complex. // *Nature.* – 2008. – V. 455. – № 7211. – P. 416-420.
441. Skalińska B.A., Pieniazek N., Stańczak J., Osowiecki H. Cloning of *Aspergillus nidulans* ribosomal DNA in shotgun experiments using the EK2 vector lambda gtWEST.T5-622. // *Acta Microbiol. Pol.* – 1983. – V. 32. – № 3. – P. 231-236.
442. Smith D.B., Johnson R.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. // *Gene.* – 1988. – V. 67. – № 1. – P. 31-40.
443. Smith H.O., Wilcox K.W. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. // *J. Mol. Biol.* – 1970. – V. 51. – № 23. – P. 79-91.
444. Smith K.A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. // *Science.* – 1988. – V. 240. – № 4856. – P. 1169-1176.
445. Snyder H.L., Bacik I., Yewdell J.W., Behrens T.W., Bennink J.R. Promiscuous liberation of MHC-class I-binding peptides from the C termini of membrane and soluble proteins in the secretory pathway. // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – V. 28. – № 4. – P. 1339-1346.
446. Sodoyer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. // *BioDrugs.* – 2004. – V. 18. – № 1. – P. 51-62.
447. Sorensen H.P., Mortensen K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. // *J. Biotechnol.* – 2005. – V. 115. – № 2. – P. 113-128.
448. Sparwasser T., Koch E.S., Vabulas R.M., Heeg K., Lipford G.B., Ellwart J.W., Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – V. 28. – № 6. – P. 2045-2054.
449. Spencer J.V., Braciale T.J. Incomplete CD8(+) T lymphocyte differentiation as a mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte responses to a viral antigen. // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 191. – № 10. – P. 1687-1698.
450. Spik K., Shurtleff A., McElroy A.K., Guttieri M.C., Hooper J.W., SchmalJohn C. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. // *Vaccine.* – 2006. – V. 24. – № 21. – P. 4657-4666.

451. Spirin A.S., Baranov V.I., Ryabova L.A., Ovodov S.Y., Alakhov Y.B. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. // *Science*. – 1988. – V. 242. – № 4882. – P. 1162-1164.
452. Spirin A.S. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. // *Trends Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – № 10. – P. 538-545.
453. Sprengart M.L., Fuchs E., Porter A.G. The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. // *EMBO J.* – 1996. – V. 15. – № 3. – P. 665-674.
454. Sprengel R., Reiss B., Schaller H. Translationally coupled initiation of protein synthesis in *Bacillus subtilis*. // *Nucleic Acids Res.* – 1985. – V. 13. – № 3. – P. 893-909.
455. Stanley M.A., Moore R.A., Nicholls P.K., Santos E.B., Thomsen L., Parry N., Walcott S., Gough G. Intra-epithelial vaccination with COPV L1 DNA by particle-mediated DNA delivery protects against mucosal challenge with infectious COPV in beagle dogs. // *Vaccine*. – 2001. – V. 19. – № 20-22. – P. 2783-2792.
456. Starodubova E.S., Isagulians M.G., Kuzmenko Y.V., Latanova A.A., Krotova O.A., Karpov V.L. Fusion to the lysosome targeting signal of the invariant chain alters the processing and enhances the immunogenicity of HIV-1 Reverse Transcriptase. // *Acta Naturae*. – 2014. – V. 6. – № 1. – P. 61-68.
457. Steitz J.A. Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. // *Nature*. – 1969. – V. 224. – № 5223. – P. 957-964.
458. Stellwag E.J., Brenchley J.E. Genetic engineering of microorganisms for biotechnology. // *Microb. Ecol.* – 1986. – V. 12. – № 1. – P. 3-13.
459. Studier F.W., Daegelen P., Lenski R.E., Maslov S., Kim J.F. Understanding the differences between genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3) and comparison of the *E. coli* B and K-12 genomes. // *J. Mol. Biol.* – 2009. – V. 394. – № 4. – P. 653-680.
460. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. // *J. Mol. Biol.* – 1986. – V. 189. – № 1. – P. 113-130.
461. Stueber D., Bujard H. Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. // *EMBO J.* – 1982. – V. 1. – № 11. – P. 1399-1404.
462. Sutcliffe J.G. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* – 1979. – V. 43. – P. 77-80.
463. Tacon W., Carey N., Emtage S. The construction and characterisation of plasmid vectors suitable for the expression of all DNA phases under the control of the *E. coli* tryptophan promoter. // *Mol. Gen. Genet.* – 1980. – V. 177. – № 3. – P. 427-438.
464. Takahashi H., Nakagawa Y., Pendleton C.D., Houghten R.A., Yokomuro K., Germain R.N., Berzofsky J.A. Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells

- recognizing an HIV-1 envelope determinant. // *Science*. – 1992. – V. 255. – № 5042. – P. 333-336.
465. Takeshita S., Takeshita F., Haddad D.E., Ishii K.J., Klinman D.M. CpG oligodeoxynucleotides induce murine macrophages to up-regulate chemokine mRNA expression. // *Cell. Immunol.* – 2000. – V. 206. – № 2. – P. 101-106.
466. Tang D., Devit M., Johnston S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. // *Nature*. – 1992. – V. 356. – № 6365. – P. 152-154.
467. Tang Q., Saijo M., Zhang Y., Asiguma M., Tianshu D., Han L., Shimayi B., Maeda A., Kurane I., Morikawa S. A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever serologically diagnosed by recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2003. – V. 10. – № 3. – P. 489-491.
468. Tangri S., Ishioka G.Y., Huang X., Sidney J., Southwood S., Fikes J., Sette A. Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide. // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 194. – № 6. – P. 833-846.
469. Taya Y., Devos R., Tavernier J., Cheroutre H., Engler G., Fiers W. Cloning and structure of the human immune interferon-gamma chromosomal gene. // *EMBO J.* – 1982. – V. 1. – № 8. – P. 953-958.
470. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – № 24. – P. 4876-4882.
471. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22. – № 22. – P. 4673-4680.
472. Thomson S., Elliott S.L., Sherritt M., Sproat K.W., Coupar B.E., Scalzo A.A., Forbes C.A., Ladhams A.M., Mo X.Y., Tripp R.A., Doherty P.C., Moss D.J., Suhrbier A. Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8+ cytotoxic T cells epitopes. // *J. Immunol.* – 1996. – V. 157. – № 2. – P. 822-826.
473. Thomson S., Khanna R., Gardner J., Burrows S.R., Coupar B., Moss D.J., Suhrbier A. Minimal epitopes expressed in a recombinant polyepitope protein are processed and presented to CD8+ cytotoxic T cells: Implications for vaccine design. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – № 13. – P. 5845-5849.
474. Toes R.E., Nussbaum A.K., Degermann S., Schirle M., Emmerich N.P., Kraft M., Laplace C., Zwinderman A., Dick T.P., Müller J., Schönfish B., Schmid C., Fehling H.J., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 194. – № 1. – P. 1-12.

475. Torres C.A., Iwasaki A., Barber B.H., Robinson H.L. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. // *J. Immunol.* – 1997. – V. 158. – № 10. – P. 4529-4532.
476. Uebel S., Wiesmuller K.H., Jung G., Tampe R. Peptide libraries in cellular immune recognition. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 1999. – V. 243. – P. 1-21.
477. Ulmer J.B., Donnelly J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dwarki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., DeWitt C.M., Friedman A., Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. // *Science.* – 1993. – V. 259. – № 5102. – P. 1745-1749.
478. Ulmer J.B., Wahren B., Liu M.A. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. // *Trends Mol. Med.* – 2006. – V. 12. – № 5. – P. 216-222.
479. Upton C., Mossman K., McFadden G. Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. // *Science.* – 1992. – V. 258. – № 5086. – P. 1369-1372.
480. Valdez-Cruz N.A., Caspeta L., Pérez N.O., Ramírez O.T., Trujillo-Roldán M.A. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. // *Microb. Cell Fact.* – 2010. – V. 9. – P. 1-18. doi: 10.1186/1475-2859-9-18.
481. Vanderzanden L., Bray M., Fuller D., Roberts T., Custer D., Spik K., Jahrling P., Huggins J., Schmaljohn A., Schmaljohn C. DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. // *Virology.* – 1998. – V. 246. – № 1. – P. 134-144.
482. Varshavsky A., Turner G., Du F., Xie Y. Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. // *Biol. Chem.* – 2000. – V. 381. – № 9-10. – P. 779-789.
483. Vasan S., Hurley A., Schlesinger S.J., Hannaman D., Gardiner D.F., Dugin D.P., Boente-Carrera M., Vittorino R., Caskey M., Andersen J., Huang Y., Cox J.H., Tarragona-Fiol T., Gill D.K., Cheeseman H., Clark L., Dally L., Smith C., Schmidt C., Park H.H., Kopycinski J.T., Gilmour J., Fast P., Bernard R., Ho D.D. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 5. – e19252.
484. Vasilenko S.M. Results of the investigation on etiology, epidemiologic features and the specific prophylactic of Crimean hemorrhagic fever (CHF) in Bulgaria. // In: *Abstr. Inv. Pap. 9. Int. Congr. Trop. Med. Malar.* – Athens. – 1973. – V. 1. – P. 32-33.
485. Velders M.P., Weijzen S., Eiben G.L, Elmishad A.G, Kloetzel P.M., Higgins T, Ciccarelli R.B., Evans M., Man S., Smith L., Kast W.M. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. // *J. Immunol.* – 2001. – V. 166. – № 9. – P. 5366-5373.
486. Volk H.D., Diamantstein T. IL-2 normalizes defective suppressor T cell function of patients with systemic lupus erythematosus in vitro. // *Clin. Exp. Immunol.* – 1986. – V. 66. – № 3. – P. 525-531.

487. Wagner E., Yang O.O., Garcia-Zepeda E.A., Ge Y., Kalams S.A., Walker B.D., Pasternack M.S., Luster A.D. Beta-chemokines are released from HIN-1-specific T cells granules complexed to proteoglycans. // *Nature*. – 1998. – V. 391. – № 6670. – P. 908-911.
488. Walker B.D., Ahmed R., Plotkin S. Moving ahead an HIV vaccine: use both arms to beat HIV. // *Nature Med.* – 2011. – V. 17. – № 10. – P. 1194-1195.
489. Walker B.D. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. // *Top. HIV Med.* – 2007. – V. 15. – № 4. – P. 134-136.
490. Walker C.M., Moody D.J., Stites D.P., Levy J.A. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. // *Science*. – 1986. – V. 234. – № 4783. – P. 1563-1566.
491. Walz G., Zanker B., Murphy J.R., Strom T.B. A kinetic analysis of the effects of interleukin-2 diphtheria toxin fusion protein upon activated T cells. // *Transplantation*. – 1990. – V. 49. – № 1. – P. 198-201.
492. Wang A., Lu S.-D., Mark D.F. Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2 gene: structure-function analysis of the cysteine residues. // *Science*. – 1984. – V. 224. – № 4656. – P. 1431-1433.
493. Wang B., Ugen K.E., Srikantan V., Agadjanyan M.G.; Dang K., Refaeli Y., Sato A.I., Boyer J., Williams W.V., Weiner D.B. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – V. 90. – № 9. – P. 4156-4160.
494. Wang S., Farfan-Arribas D.J., Shen S., Chou T.H., Hirsch A., He F., Lu S. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. // *Vaccine*. – 2006. – V. 24. – № 21. – P. 4531-4540.
495. Wang S., Kennedy J., West K., Montefiori D.C., Bansal A., Goepfert P., Coley S., Lawrence J., Shen S., Green S., Rothman A., Ennis F., Pal R., Markham P., Lu S. Balanced cellular and antibody responses induced by the polyvalent DNA prime-protein boost HIV-1 vaccine formulation DP6-001 in healthy human volunteers. // *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – № 8. – P. 1098-1110.
496. Waters C.A., Schimke P.A., Snider C.E., Itoh K., Smith K.A., Nichols J.C., Strom T.B., Murphy J.R. Interleukin 2 receptor-targeted cytotoxicity. Receptor binding requirements for entry of a diphtheria toxin-related interleukin 2 fusion protein into cells. // *Eur. J. Immunol.* – 1990. – V. 20. – № 4. – P. 785-791.
497. Watkins D.I. The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8+ T lymphocytes. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. – 2008. – V. 103. – № 2. – P. 119-129.
498. Webster R.G., Fynan E.F., Santoro J.C., Robinson H. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. // *Vaccine*. – 1994. – V. 12. – № 16. – P. 1495-1498.
499. Webster R.G., Robinson H.L. DNA vaccines: a review of developments. // *BioDrugs*. – 1997. – V. 8. – № 4. – P. 273-292.

500. Weigel U., Meyer M., Sebald W. Mutant proteins of human interleukin 2. Renaturation yield, proliferative activity and receptor binding. // *Eur. J. Biochem.* – 1989. – V. 180. – № 2. – P. 295-300.
501. Weighous T.F., Tarpley W.G. A bacteriophage transcription terminator permits the cloning of a mammalian expression vector carrying the human preprorenin gene in *E. coli*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1987. – V. 143. – № 2. – P. 593-599.
502. Weinberger E.E., Isakovic A., Scheibelhofer S., Ramsauer C., Reiter K., Hauser-Kronberger C., Thalhamer J., Weiss R. The influence of antigen targeting to sub-cellular compartments on the anti-allergic potential of a DNA vaccine. // *Vaccine.* – 2013. – V. 31. – № 51. – P. 6113-6121.
503. Weiner H.L., Weiner L.H., Swain J.L. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. // *Science.* – 1987. – V. 237. – № 4812. – P. 280-282.
504. Whitehouse C.A. Crimean-Congo hemorrhagic fever. // *Antivir. Res.* – 2004. – V. 64. – № 3. – P. 145-160.
505. Widera G., Austin M., Rabussay D., Goldbeck C., Barnet S.W., Chen M., Leung L., Otten G.R., Thudium K., Selby M.J., Ulmer J.B. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. // *J. Immunol.* – 2000. – V. 164. – № 9. – P. 4635-4640.
506. Williams D.P., Parker K., Bacha P., Bishai W., Borowski M., Genbauffe F., Strom T.B., Murphy J.R. Diphtheria toxin receptor binding domain substitution with interleukin-2: genetic construction and properties of a diphtheria toxin-related interleukin-2 fusion protein. // *Protein Eng.* – 1987. – V. 1. – № 6. – P. 493-498.
507. Williams D.P., Regier D., Akiyoshi D., Genbauffe F., Murphy J.R. Design, synthesis and expression of a human interleukin-2 gene incorporating the codon usage bias found in highly expressed *Escherichia coli* genes. // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16. – № 22. – P. 10453-10467.
508. Williams J.A., Carnes A.E., Hodgson C.P. Plasmid DNA Vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – V. 27. – № 4. – P. 353-370.
509. Williams J.A. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. // *Vaccines.* – 2013. – V. 1. – № 3. – P. 225-249.
510. Wölfel R., Paweska J.T., Petersen N., Grobbelaar A.A., Leman P.A., Hewson R., Georges-Courbot M.C., Papa A., Günther S., Drosten C. Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – V. 13. – № 7. – P. 1097-1100.
511. Wong T.K., Neumann E. Electric field mediated gene transfer. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1982. – V. 107. – № 2. – P. 584-587.
512. Woodberry T., Gardner J., Mateo L., Eisen D., Medveczky J., Ramshaw I.A., Thomson S.A., French R.A., Elliott S.L., Firat H., Lemonnier F.A., Suhrbier A. Immunogenicity of a human immunodeficiency virus (HIV) polytope

- vaccinecontaining multiple HLA A2 HIV CD8(+) cytotoxic T-cell epitopes. // *J. Virol.* – 1999. – V. 73. – № 7. – P. 5320-5325.
513. Wren L., Kent S.J. HIV Vaccine efficacy trial: glimmers of hope and the potential role of antibody-dependent cellular cytotoxicity. // *Hum. Vac.* – 2011. – V. 7. – № 4. – P. 466-473.
514. Wu T.C., Guarnieri F.G., Staveley-O'Carroll K.F., Viscidi R.P., Levitsky H.I., Hedrick L., Cho K.R., August J.T., Pardoll D.M. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class-II presentation of antigens. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – № 25. – P. 11671-11675.
515. Wu Y., Kipps T.J. Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. // *J. Immunol.* – 1997. – V. 159. – № 12. – P. 6037-6043.
516. Wyatt R., Kwong P.D., Desjardins E., Sweet R.W., Robinson J., Hendrickson W.A., Sodroski J.G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. // *Nature* – 1998. – V. 393. – № 6686. – P. 705-711.
517. Yang O.O., Kalams S.A., Trocha A., Cao H., Luster A., Johnson R.P., Walker B.D. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – № 4. – P. 3120-3128.
518. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. // *Gene.* – 1985. – V. 33. – № 1. – P. 103-119.
519. Yanofsky C. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. // *Nature.* – 1981. – V. 289. – № 5800. – P. 751-758.
520. Yanofsky C., Platt T., Crawford I.P., Nichols B.P., Christie G.E., Horowitz H., VanCleave M., Wu A.M. The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. // *Nucleic Acids Res.* – 1981. – V. 9. – № 24. – P. 6647-6668.
521. Yansura D.G., Bass S.H. Application of the *E. coli* trp promoter. // *Methods Mol. Biol.* – 1997. – V. 62. – P. 55-62.
522. Yapar M., Aydogan H., Pahsa A., Besirbellioglu B.A., Bodur H., Basustaoglu A.C., Guney C., Avci I.Y., Sener K., Sette M.H., Kubar A. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2005. – V. 58. – № 6. – P. 358-362.
523. Yashina L., Petrova I., Seregin S., Vyshemirskii O., Lvov D., Aristova V., Kuhn J., Morzunov S., Gutorov V., Kuzina I., Tyunnikov G., Netesov S., Petrov V. Genetic variability of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia. // *J. Gen. Virol.* – 2003a. – V. 84. – Pt 5. – P. 1199-1206.
524. Yashina L., Vyshemirskii O., Seregin S., Petrova I., Samokhvalov E., Lvov D., Gutorov V., Kuzina I., Tyunnikov G., Tang Y.-W., Netesov S., Petrov V. Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia. // *J. Clin. Microbiol.* – 2003b. – V. 41. – № 2. – P. 860-862.

525. Yates N.L., Liao H.-X., Fong Y., de Camp A., Vandergrift N.A., Williams W.T., Alam S.M., Ferrari G., Yang Z.-Y., Seaton K.E., Berman P.W., Alpert M.D., Evans D.T., O'Connell R.J., Francis D., Sinangil F., Lee C., Nitayaphan S., Rerks-Ngarm S., Kaewkungwal J., Pitisuttithum P., Tartaglia J., Pinter A., Zolla-Pazner S., Gilbert P.B., Nabel G.J., Michael N.L., Kim J.H., Montefiori D.C., Haynes B.F., Tomaras G.D. Vaccine-Induced Env V1-V2 IgG3 Correlates with Lower HIV-1 Infection Risk and Declines Soon After Vaccination. // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – № 228. – V. 6. – 228ra39.
526. Yewdell J.W., Bennink J.R. Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1999. – V. 15. – P. 579-606.
527. York I.A., Rock K.L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. // *Ann. Rev. Immunol.* – 1996. – V. 14. – P. 369-396.
528. Yoshida A., Nagata T., Uchijima M., Koide Y. Protective CTL response is induced in the absence of CD4+ T cells and IFN-gamma by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes*. // *Vaccine.* – 2001. – V. 19. – № 30. – P. 4297-4306.
529. Yu-Chen Y., Ling-Xiong K., Ling L., Yu-Qin Z., Feng L., Bao-Jian C., Shou-Yi G. Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1985. – V. 34. – № 6. – P. 1179-1182.
530. Yu X.G., Shang H., Addo M.M., Eldridge R.L., Phillips M.N., Feeney M.E., Strick D., Brander C., Goulder P.J., Rosenberg E.S., Walker B.D., Altfeld M. HIV Study Collaboration. Important contribution of p15 Gag-specific responses to the total Gag-specific CTL responses. // *AIDS.* – 2002. – V. 16. – № 3. – P. 321-328.
531. Zhang J., Deutscher M.P. A uridine-rich sequence required for translation of prokaryotic mRNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – № 7. – P. 2605-2609.
532. Zhu H., Liu K.C., Cerny J., Imoto T., Moudgil K.D. Insertion of the dibasic motif in the flanking region of a cryptic self-determinant leads to activation of the epitope-specific T cells. // *J. Immunol.* – 2005. – V. 175. – № 4. – P. 2252-2260.