

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Грановский Дмитрий Львович

**Создание и характеристика кандидатной вакцины против
сибирской язвы на основе структурно модифицированных
вирусов растений**

1.5.10 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, профессор
Карпова Ольга Вячеславовна;
кандидат биологических наук
Рябчевская Екатерина Михайловна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Сибирская язва в истории человечества и в наше время	17
1.2. Сибирская язва, характеристика заболевания	20
1.3. Характеристика <i>Bacillus anthracis</i>	22
1.4. Токсин сибирской язвы	23
1.4.1. Протективный антиген сибирской язвы, РА	23
1.4.1.1. Строение РА	23
1.4.1.2. Проникновение РА в клетку	25
1.4.1.3. Токсин-нейтрализующие моноклональные антитела к РА	28
1.4.1.4. Стабильность РА	30
1.4.2. Фактор летальности, LF	32
1.4.3. Фактор отёчности, EF	32
1.5. Вакцины против сибирской язвы	34
1.5.1. Лицензированные вакцины	34
1.5.1.1. Живые аттенуированные вакцины	34
1.5.1.2. Бесклеточные вакцины на основе нативного РА	35
1.5.2 Современное состояние исследований в области вакцин против сибирской язвы	37
1.5.2.1. Вакцины на основе бактериальных векторов	38
1.5.2.2. Вакцины на основе вирусных векторов	40
1.5.2.3. ДНК-вакцины	41
1.5.2.4. Субъединичные вакцины против сибирской язвы на основе гРА	42
1.5.2.4.1. Субъединичные вакцины на основе гРА, экспрессированного в бактериальной системе	42
1.5.2.4.2. Субъединичные вакцины на основе гРА, экспрессированного в растительной системе	48
1.5.2.4.3. Адъюванты, используемые для гРА в составе субъединичных вакцин	50

1.6. Животные модели для изучения сибирской язвы	55
1.6.1. Мыши	56
1.6.2. Крысы.....	57
1.6.3. Морские свинки.....	58
1.6.4. Кролики.....	59
1.6.5. Приматы.....	60
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	61
2.1. Получение сферических частиц (СЧ) из вируса табачной мозаики (ВТМ)	62
2.2. Электрофоретический анализ белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях.....	63
2.3. Получение плазмид, кодирующих рекомбинантные антигены сибирской язвы	63
2.4. Получение конструкции pQE-30-rPA83m.....	66
2.4.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	67
2.4.1.1. Получение ДНК-фрагментов, соответствующих 3'-концевой части гена rPA(1+2)m и 5'-концевой части гена rPA(3+4)m.....	68
2.4.1.2. ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов	69
2.4.2. Фенольное переосаждение ДНК.....	70
2.4.3. Электрофоретический анализ и разделение ДНК в 1% агарозном геле	70
2.4.4. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля.....	70
2.4.5. Препаративная рестрикция ДНК	71
2.4.6. Лигирование фрагментов ДНК	71
2.4.7. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток	72
2.4.8. Аналитическая рестрикция ДНК	72
2.5. Трансформация бактериальных клеток.....	72
2.6. Экспрессия рекомбинантного белка	73
2.7. Хроматографическая очистка His ₆ -рекомбинантного белка на Ni ²⁺ -нитрилотриацетатной агарозе (Ni-NTA-агарозе).....	73
2.8. Диализ	74
2.9. Определение концентрации белка.....	75
2.10. Иммунизация лабораторных мышей.....	75

2.11. Получение сыворотки крови.....	76
2.12. Вестерн-блот анализ.....	76
2.13. Изоэлектрофокусирование.....	77
2.14. Иммунофлуоресцентная микроскопия.....	78
2.15. Иммунизация и заражение морских свинок	79
2.16. Непрямой твердофазный ИФА	80
2.17. Включение флуоресцентной метки ФИТЦ или РИТЦ в рекомбинантные белки rPA(1+2)m и rPA(3+4)m	81
2.18. Статистическая обработка результатов.....	82
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	83
3.1. Стабильность рекомбинантного полноразмерного РА	83
3.2. Дизайн и получение модифицированного полноразмерного протективного антигена сибирской язвы – rPA83m	87
3.3. Серологическая характеристика rPA83m	92
3.4. Стабильность rPA83m свободного и в композиции с СЧ ВТМ	94
3.5. Иммуногенность и протективность вакцинного кандидата – rPA83m в композиции с СЧ ВТМ.....	107
3.6. Создание и серологическая характеристика модифицированных рекомбинантных антигенов rPA(1+2)m и rPA(3+4)m	119
3.7. Получение композиций rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ	122
3.8. Стабильность rPA(1+2)m и rPA(3+4)m в композиции с СЧ ВТМ	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
БИБЛИОГРАФИЯ.....	134
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	152

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген

а.о. – аминокислотный остаток

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВТМ – вирус табачной мозаики

ДСН – додецилсульфат натрия

ИФА – иммуноферментный анализ

ИПТГ – изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид

кДа – килодальтон

МАТ – моноклональные антитела

ПААГ – полиакриламидный гель

ПВДФ – поливинилиденфторид

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РИТЦ – родамин Б изотиоцианат

СЧ – сферические частицы

ТМХ – триметилхитозан

ФИТЦ - флуоресцеин-5-изотиоцианат

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ANTXR1 – anthrax toxin receptor 1 (рецептор токсина сибирской язвы 1)

ANTXR2 – anthrax toxin receptor 2 (рецептор токсина сибирской язвы 2)

AVA – Anthrax Vaccine Adsorbed (вакцина против сибирской язвы адсорбированная)

AVP – Anthrax Vaccine Precipitated (вакцина против сибирской язвы преципитированная)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (центры по контролю и профилактике заболеваний США)

CMG2 – capillary morphogenesis gene 2 (белок капиллярного морфогенеза 2)

CpG – cytosine-phosphate-guanine (олигодезоксирибонуклеотид цитозин-фосфат-гуанин)

DABCO – 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (1,4- диазидобибцикло[2.2.2]октан)

ECV – endosomal carrier vesicles (эндосомольные везикулы-переносчики)

EdTx – edema toxin (токсин отёчности)

EF – edema factor (фактор отёчности)

FDA - Food and Drug Administration (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США)

НОС - highly antigenic outer capsid protein (внешний белок-антиген капсида бактериофага Т4)

LD₅₀ – полулетальная доза

LeTx – lethal toxin (летальный токсин)

LF – lethal factor (фактор летальности)

LRP6 – low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (белок 6, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности)

MAPK – mitogen-activated protein kinase (митоген-активируемая протеинкиназа)

MAPKK – mitogen-activated protein kinase kinase (киназа митоген-активируемых протеинкиназ)

MVB – multivesicular bodies (мультивезикулярные тельца)

Ni-NTA агароза – Ni²⁺-нитрилотриацетатная агароза

РА – protective antigen (протективный антиген сибирской язвы)

РА20 – фрагмент РА (20 кДа), отщепляемый фуриновой протеазой

РА63 – фрагмент РА (63 кДа) после отщепления РА20

PBS – phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буферный раствор)

pQE-30-rPA(1+2)m – конструкция, кодирующая белок rPA(1+2)m

pQE-30-rPA(3+4)m – конструкция, кодирующая белок rPA(3+4)m

pQE-30-rPA83m – конструкция, кодирующая белок rPA83m

pXO1 – большая плазмида вирулентности *Bacillus anthracis*, кодирует компоненты токсина сибирской язвы

pXO2 – малая плазмида вирулентности *Bacillus anthracis*, кодирует белки синтеза капсулы

rPA – recombinant PA (рекомбинантный протективный антиген)

rPA(1+2)m – белок, содержащий I и II домены PA со стабилизирующими аминокислотными заменами

rPA(3+4)m – белок, содержащий III и IV домены PA со стабилизирующими аминокислотными заменами

rPA83 – полноразмерный rPA

rPA83m – модифицированный rPA83 со стабилизирующими аминокислотными заменами

TAE – tris-acetate-EDTA buffer (трис-ацетатный буфер)

TBS – tris-buffered saline (трис-HCl солевой буферный раствор)

TEM8 – tumor endothelial marker 8 (эндотелиальный опухолевый маркер 8)

tTBS – tween-TBS (трис-HCl солевой буферный раствор с твином-20)

WHO – World Health Organization (Всемирная Организация Здравоохранения)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Сибирская язва – тяжёлое инфекционное заболевание бактериальной природы. Споры возбудителя сибирской язвы, грамположительной бактерии *Bacillus anthracis*, способны в течение десятилетий персистировать в почве с сохранением вирулентных свойств. Формирование почвенных резервуаров *B. anthracis* является основной причиной вспышек заболевания как среди сельскохозяйственных и диких животных, так и у человека. Случаи возникновения заболевания у человека регистрируются по всему земному шару ежегодно. Согласно отчётам, в 2023 году в Российской Федерации сибирская язва была обнаружена у 19 человек, а в странах ближнего зарубежья – у 137 (Рязанова и др., 2024). В дополнение к природным вспышкам заболевания важно отметить, что споры *B. anthracis* могут использоваться в качестве инфекционного агента при биотеррористических актах. Прецедент произошёл в 2001 году в США: злоумышленники рассылали споры возбудителя в почтовых отправлениях (Jernigan *et al.*, 2001). Таким образом, создание современных и эффективных методов борьбы с заболеванием крайне актуально.

Существуют два вида лицензированных вакцин для профилактики сибирской язвы: живые аттенуированные вакцины и препараты, основанные на бесклеточных фильтратах культур *B. anthracis*. Живые аттенуированные вакцины применяются для вакцинации человека только в России и в Китае. Их основным недостатком является невозможность использования одновременно с терапией антибиотиками. Вакцины, основанные на фильтратах бесклеточных культур возбудителя сибирской язвы, адсорбированных на алюмосодержащих носителях, лицензированы в США (BioThraxTM и CYPHENDUSTM) и Великобритании (AVP – Anthrax Vaccine Precipitated, вакцина против сибирской язвы преципитированная). Основным белком-иммуногеном в этих препаратах является один из трёх компонентов токсина

сибирской язвы, протективный антиген *B. anthracis* – PA (protective antigen, молекулярная масса – 83 кДа). PA безопасен для человека в отсутствие остальных компонентов токсина, антител к нему достаточно для формирования эффективного протективного иммунного ответа (Taft, Weiss, 2008). Однако данные вакцины содержат большое количество примесей *B. anthracis*, что приводит к высокой реактогенности препарата. Также известно, что PA обладает низкой стабильностью, а хранение в присутствии геля гидроксида алюминия приводит к его ускоренной деградации и изменению антигенных свойств (Wagner *et al.*, 2012; D'Souza *et al.*, 2013). В связи с этим необходимость разработки стабильной и безопасной вакцины нового поколения не вызывает сомнений.

Современные разработки вакцин против сибирской язвы, как правило, предлагают в качестве основного компонента препарата рекомбинантный PA (rPA). Использование именно рекомбинантного белка позволяет обеспечить строго детерминированный состав вакцины, а также вносить изменения в аминокислотную последовательность антигена. Наиболее распространённым подходом является создание субъединичных вакцин, в которых rPA представлен в комбинации с платформой-носителем или адъювантом. Именно полноразмерный rPA (rPA83) при иммунизации способен обеспечить формирование наиболее эффективного протективного иммунного ответа (Abbound, Casadevall, 2008). При этом основной проблемой субъединичных вакцин против сибирской язвы на основе rPA83 является нестабильность данного антигена вследствие протеолиза и спонтанного дезаминирования отдельных остатков аспарагина. В попытке решить эту проблему были разработаны варианты модифицированного rPA83 со стабилизирующими заменами в сайтах протеолиза (Singh *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2002) или дезаминирования (Verma *et al.*, 2018). Оба варианта замен привели к увеличению стабильности белка, однако возможность их комбинации не была исследована.

В качестве носителя, адъюванта или стабилизатора для rPA применяются вещества и частицы различной природы, например, гель гидроксида алюминия (Campbell *et al.*, 2007), полисахариды (Feinen *et al.*, 2014; Bento *et al.*, 2015), водно-масляные эмульсии (Bielinska *et al.*, 2007), вирусы бактерий (Shivachandra *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2011; Peachman *et al.*, 2012) или животных (Yin *et al.*, 2008). Потенциал вирусов растений в качестве носителя и стабилизатора для rPA на данный момент не изучен. Большинство используемых адъювантов обладают существенными недостатками, такими как дестабилизация rPA при хранении, высокая реактогенность, сложность изготовления. Оптимальная платформа для rPA, не оказывающая негативного влияния на его стабильность и иммуногенность, полностью безопасная для человека и экономически выгодная, пока неопределена.

Таким образом, разработка субъединичной вакцины против сибирской язвы, содержащей rPA в качестве основного белка-антигена, определение наиболее эффективного подхода к стабилизации rPA в составе такой вакцины, а также выбор подходящей платформы-носителя – актуальные задачи современной науки. Их решение позволит обеспечить более эффективную защиту населения и сельскохозяйственных животных от такого тяжелого и опасного заболевания, как сибирская язва.

Цель и задачи исследования

Цель исследования заключалась в разработке, получении и характеристике стабильного рекомбинантного субъединичного вакцинного кандидата против сибирской язвы на основе структурно модифицированных вирусов растений.

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

1) Разработать и получить модифицированный рекомбинантный протективный антиген *Bacillus anthracis* (PA – protective antigen) со стабилизирующими заменами в сайтах протеолиза и дезаминирования и изучить его антигенную специфичность.

- 2) Оценить стабильность полученного антигена в сравнении с немодифицированным рекомбинантным РА (rРА).
- 3) Создать вакцинный кандидат – композицию полученного антигена со сферическими частицами (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ). Исследовать возможность стабилизации полученного антигена с помощью СЧ ВТМ и его антигенную специфичность в составе вакцинного кандидата.
- 4) Исследовать иммуногенность модифицированного rРА в виде свободного белка и в составе вакцинного кандидата на морских свинках.
- 5) Изучить на морских свинках протективность вакцинного кандидата против полностью вирулентного штамма *B. anthracis*.
- 6) Разработать и получить два двухдоменных рекомбинантных антигена, содержащих домены I и II или домены III и IV РА со стабилизирующими заменами и изучить их антигенную специфичность и стабильность в композиции с СЧ ВТМ.
- 7) Исследовать возможность получения вакцинного кандидата, содержащего СЧ ВТМ и два двухдоменных антигена (I+II и III+IV) одновременно.

Объект исследования

Объектами исследования являлись рекомбинантные белки, представляющие собой полноразмерный протективный антиген сибирской язвы или его двухдоменные фрагменты со стабилизирующими аминокислотными заменами, а также их композиции с СЧ ВТМ.

Научная новизна исследования

В настоящей работе впервые получены и охарактеризованы три оригинальных рекомбинантных антигена: rРА83m, rРА(1+2)m и rРА(3+4)m. Полученные антигены представляют собой полноразмерный модифицированный рекомбинантный протективный антиген *B. anthracis*, домены I и II РА или домены III и IV РА, соответственно, со стабилизирующими аминокислотными заменами. В последовательностях

антигенов rPA83m и rPA(1+2)m впервые одновременно применены замены в фурин- и химотрипсин-чувствительных сайтах протеолиза, а также замены аминокислотных остатков аспарагина, подверженных спонтанному дезаминированию, на глутамин. Все три полученных оригинальных антигена взаимодействовали с поликлональной сывороткой к рекомбинантному РА (rPA), при этом rPA83m и rPA(3+4)m также взаимодействовали с моноклональными нейтрализующими антителами к домену IV РА.

Впервые продемонстрировано увеличение стабильности rPA в присутствии СЧ ВТМ. Были получены и охарактеризованы композиции rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ. Таким образом, впервые показана возможность адсорбции рекомбинантного антигена бактериальной природы на поверхности структурно модифицированных частиц вируса растений. При этом впервые была показана стабилизация и сохранение антигенных свойств rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m в составе композиций с модифицированными частицами вирусов растений даже после инкубации в течение 40 дней при +37 °С. Также впервые показана возможность создания композиции, в которой на поверхности СЧ ВТМ одновременно адсорбированы два двухдоменных антигена бактериальной природы: rPA(1+2)m и rPA(3+4)m.

Вакцинный кандидат – композиция rPA83m+СЧ ВТМ – является иммуногенным и обеспечивает протективный эффект на морских свинках. Впервые продемонстрировано, что иммунизация модифицированным стабилизированным rPA в композиции с СЧ ВТМ обеспечивает стопроцентную защиту морских свинок от заражения полностью вирулентным штаммом *B. anthracis*. При этом протективные свойства вакцинного кандидата значительно не ослабевают в результате его предварительной инкубации в течение 27 дней при +37 °С (условия искусственного “составривания” препарата).

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют считать композицию rPA83m с СЧ ВТМ, а также композицию двух двухдоменных антигенов rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ перспективными вакцинными кандидатами против сибирской язвы. Стабилизация антигенов, которая была достигнута путём внесения аминокислотных замен в сайтах протеолиза и спонтанного дезаминирования, а также формированием композиции с СЧ ВТМ, обеспечивает возможность длительного хранения вакцинных кандидатов без изменения их антигенных свойств даже при нарушении холодовой цепи. Полученные композиции являются субъединичными рекомбинантными вакцинами, что позволяет применять их совместно с терапией антибиотиками. Последнее критически важно для профилактики сибирской язвы во время вспышек инфекции не только у человека, но и у сельскохозяйственных животных.

Полученные результаты представляют научный интерес для специалистов в области вирусологии, микробиологии и вакцинологии. Они открывают новые перспективы для создания стабильных вакцин против сибирской язвы с использованием носителей-стабилизаторов вирусной природы. Полученные данные о новом подходе для создания вакцин (адсорбции антигена бактериальной природы на частицах вирусов растений) будут использованы при чтении лекций по вирусологии в МГУ имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в работе с научной литературой, планировании и проведении экспериментальной части исследования, обработке и интерпретации полученных результатов. Автор внёс вклад в подготовку научных публикаций по материалам диссертационной работы и представлял результаты исследований на всероссийских и международных конференциях. Имена соавторов указаны в опубликованных

работах. Участие соавторов отражено в тексте диссертации и автореферата. Автором написаны текст диссертации и автореферат к ней. Вклад автора в представленную работу определяющий.

Методы и методология научного исследования

В исследовании были применены современные методы генетической инженерии, биохимии, молекулярной биологии, вирусологии, иммунохимии, микроскопии, методы работы с культурами клеток и с лабораторными животными, биоинформатические и статистические подходы. Используемые методы подробно описаны в соответствующем разделе текста диссертации.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Рекомбинантные антигены, представляющие собой полноразмерный протективный антиген (РА) *Bacillus anthracis* (rРА83m) или его двухдоменные фрагменты (rРА(1+2)m и rРА(3+4)m), модифицированные путём внесения стабилизирующих аминокислотных замен, могут быть использованы в составе вакцинного кандидата против сибирской язвы.
- 2) Антигенная специфичность полученных белков rРА83m, rРА(1+2)m и rРА(3+4)m соответствует немодифицированному РА.
- 3) Аминокислотные замены, внесённые в последовательность rРА83m, повышают стабильность белка.
- 4) Сферические частицы (СЧ), полученные в результате термической перестройки вируса табачной мозаики (ВТМ), способны стабилизировать rРА83m, rРА(1+2)m и rРА(3+4)m, не изменяя при этом антигенную специфичность данных белков.
- 5) Как свободный антиген rРА83m, так и вакцинный кандидат rРА83m+СЧ ВТМ индуцируют выработку высокого титра антител к rРА83m. Длительная инкубация обоих препаратов при +37 °С не приводит к уменьшению их иммуногенности.

6) Вакцинный кандидат rPA83m+СЧ ВТМ способен обеспечить стопроцентную защиту морских свинок от инфекции полностью вирулентным штаммом сибирской язвы, при этом протективность вакцинного кандидата значимо не снижается в результате инкубации +37 °С в течение 27 дней.

Степень достоверности и результаты апробации

Результаты были получены с применением актуальных методик и современного научного оборудования. Данные, полученные в экспериментальной части работы, были обработаны с использованием современного программного обеспечения и методов статистического анализа. Результаты, представленные в настоящей работе, опираются на экспериментальные данные, а также на результаты исследований, опубликованных в рецензируемых научных журналах.

По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в Диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – Вирусология. Также по теме диссертационной работы получено 2 патента РФ. Результаты диссертационной работы были представлены на XI Международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни” (Москва, 2019), на 26-й и 28-й Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов” (Москва, 2019, 2021), на международном конгрессе “The 44th FEBS Congress” (Краков, Польша, 2019), на III Объединенном научном форуме, включающем VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), на международном форуме “Биотехнология: состояние и перспективы развития” (Москва, 2020), на международном конгрессе “IUBMB–FEBS–PABMB Congress” (Лиссабон, Португалия, 2022), на III Объединенном Научном Форуме Физиологов, Биохимиков И Молекулярных Биологов (Сочи, 2022), а также в рамках международной

летней научной школы “7th Innovative Approaches for Identification of Antiviral Agents Summer School” (Сардиния, Италия, 2024).

Структура и содержание работы

Диссертационная работа изложена на 159 страницах и состоит из введения, обзора литературы, раздела “Материалы и методы”, раздела “Результаты и обсуждение”, заключения и библиографии. Работа содержит 4 таблицы, 25 рисунков и 8 приложений. Библиография включает 188 источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сибирская язва в истории человечества и в наше время

Сибирская язва – острое зоонозное инфекционное заболевание, возбудителем которого является бактерия *Bacillus anthracis*. Инфекции подвержены теплокровные животные, в особенности травоядные млекопитающие, а также человек (Sternbach, 2003; Turnbull, 2002).

Человечество сталкивалось с сибирской язвой с древнейших времён. Есть основания полагать, что пятая и шестая казни египетские, описанные в девятой главе книги Исход, второй книге Пятикнижия – не что иное, как эпидемии сибирской язвы. Также вероятно, что знаменитая Афинская чума (430-427 г.г. до нашей эры) – не что иное, как эпидемия лёгочной формы сибирской язвы (McSherry *et al.*, 1992). Лучшее же из древних описаний этого заболевания содержится в поэме Вергилия “Георгики” (предположительно, 29 г. до нашей эры), третья книга которой посвящена животноводству и содержит сведения об эпидемиологии некой эпизоотии, распространившейся в римской провинции Норик. Описанные признаки проявления болезни, несмотря на определённые неточности и образные поэтические выражения, очень сходны с клинической картиной сибирской язвы (Dirckx, 1981).

На протяжении всей новой истории сибирская язва оставалась серьёзной угрозой. Как отдельное заболевание лёгочная форма сибирской язвы была описана в середине 1800-х годов, когда болезнь стремительно распространялась среди работников текстильной промышленности сначала в Великобритании, а позже – в Германии (LaForce, 1978; Brachman, 1980). В 1850 году Пьер Райер и Казимир Жозеф Давен обнаружили в кровотоке зараженных сибирской язвой овец небольшие нитевидные тела. Было выдвинуто предположение, что эти микроорганизмы были причиной заболевания (Sternbach, 2003). В 1876 году Роберт Кох впервые проследил полный жизненный цикл *B. anthracis*, а также показал процесс образования спор, устойчивых к внешним воздействиям. В 1881 году Луи Пастер создал

первую вакцину против сибирской язвы на основе ослабленной культуры *B. anthracis* (Sternbach, 2003).

В первой половине XX века, по различным данным, число случаев заражения людей сибирской язвой составило от 20000 до 100000 (Brachman, 2002). Однако в дальнейшем на протяжении XX века частота встречаемости сибирской язвы у человека значительно снизилась как из-за вакцинации работников животноводческой отрасли, так и из-за улучшения условий работы с продуктами животноводства (Sternbach, 2003; Mayer, 2001). В 1979 году появилась информация о вспышке эпидемии сибирской язвы среди домашнего скота около Свердловска вблизи военного микробиологического завода, а также о случаях заражения людей в округе желудочно-кишечной и кожной формой сибирской язвы (суммарно 96 случаев инфекции у человека). Исследования показали, что болезнь была, возможно, вызвана не контактом с больными животными, а распылением в воздухе аэрозоля патогена сибирской язвы (Meselson, 1994).

В XXI веке, несмотря на снижение частоты заражения сибирской язвой по сравнению с прошлыми столетиями, заболевание всё ещё представляет серьёзную угрозу. В 2016 году в Ямало-Ненецком автономном округе Российской Федерации была зарегистрирована серьёзная вспышка инфекции. Сибирская язва была обнаружена у 36 человек и более чем у двух тысяч северных оленей. По-видимому, причиной вспышки послужило таяние вечной мерзлоты, которое повлекло за собой высвобождение возбудителей заболевания из промёрзших слоёв грунта (Попова *и др.*, 2016; Goudarzi, 2016). Ежегодно случаи заражения сибирской язвой фиксируются по всему земному шару и не ограничиваются северными регионами. В качестве примера последних инцидентов в странах с тёплым климатом можно привести случаи на Филиппинах (12 человек, 2023 год) и в Гане (два человека, 2023 год) (GMA News Online, 2023; Oduoye *et al.*, 2023). В Российской Федерации в последнее время обстановка, связанная с сибирской язвой, вызывает опасения. В 2022 году были зарегистрированы два подтверждённых случая заражения людей

кожной формой заболевания: в Республике Дагестан и Ставропольском крае (Рязанова *и др.*, 2023). Несмотря на то, что в 2022 году в 66 субъектах Российской Федерации, 7929 человек были провакцинированы впервые, а ревакцинацией был охвачен 32101 человек в 71 субъекте (суммарно 90,8% плана по вакцинации), в 2023 году обстановка, связанная с сибирской язвой, ухудшилась. В пяти субъектах Российской Федерации трех федеральных округов (Приволжского, Сибирского и Центрального) зарегистрировано семь вспышек сибирской язвы. Всего были заражены 19 человек (Рязанова *и др.*, 2024). Два клинических случая появления кожной формы сибирской язвы у жителей Воронежской области были подробно описаны (Никифоров, Сорокина, 2023). На **Рисунке 1** представлены данные по зафиксированным случаям возникновения сибирской язвы у людей и сельскохозяйственных животных в Российской Федерации в период с 2014 по 2023 год.

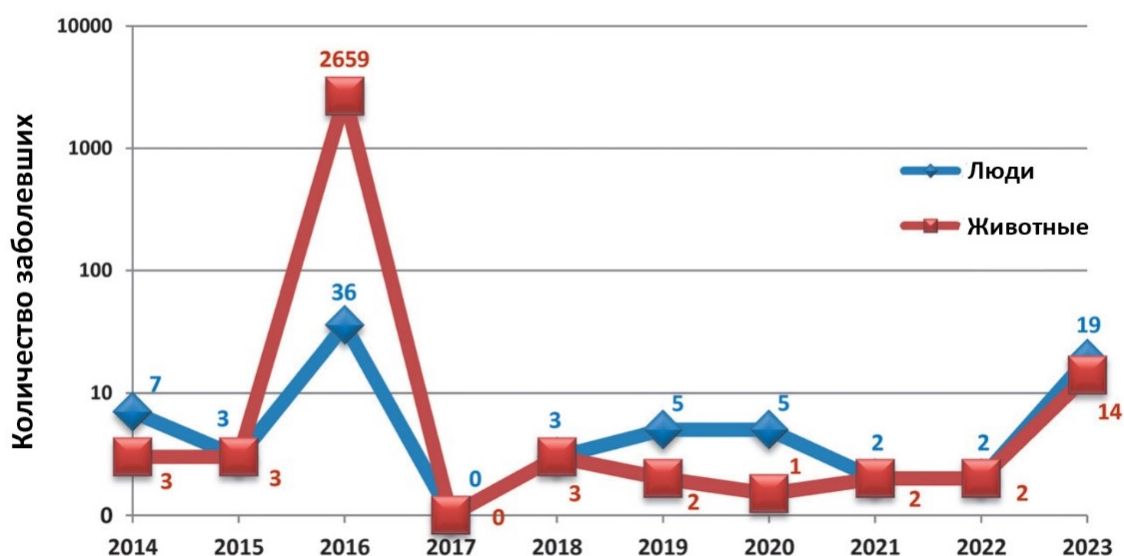


Рисунок 1. Количество зарегистрированных случаев заболевания сибирской язвой животных и людей в Российской Федерации в период с 2014 по 2023 г (адаптировано по Рязанова *и др.*, 2024).

В странах ближнего зарубежья в 2023 году зарегистрировано 137 случаев заболевания людей, наибольшее количество из которых пришлось на Таджикистан, и, по меньшей мере, 80 – у сельскохозяйственных животных (Рязанова *и др.*, 2024).

Помимо природных вспышек заболевания, важно отметить, что споры *B. anthracis*, крайне устойчивые к нагреванию, ультрафиолету и химическим агентам (Setlow, 2006), являются одним из основных потенциальных биотеррористических агентов. По мнению центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC – Centers for Disease Control and Prevention) среди потенциальных биотеррористических агентов споры *B. anthracis* относятся к первой группе опасности (CDC, 2019). В 2001 году на территории США (в Округе Колумбия, Флориде, Нью Джерси и Нью Йорке) были зарегистрированы 10 случаев инфицирования человека лёгочной формой сибирской язвы вследствие преднамеренного заражения почтовых отправлений спорами возбудителя заболевания (Jernigan *et al.*, 2001).

Таким образом, угроза сибирской язвы является актуальной не только с точки зрения естественных вспышек, обусловленных в том числе глобальным потеплением и оттаиванием вечной мерзлоты, но и в контексте потенциальных биотеррористических актов.

1.2. Сибирская язва, характеристика заболевания

Основным резервуаром *B. anthracis* является почва, поскольку крайне устойчивые к внешним воздействиям споры бактерии способны персистировать в ней десятилетиями. Почвенные резервуары создают основную угрозу заражения для крупного рогатого скота. Однако при этом для человека находящиеся в почве споры не представляют настолько существенной опасности, поскольку агрегаты спор с компонентами почвы не способны проникать в терминальные отделы дыхательных путей, а минимальная инфицирующая доза *B. anthracis* относительно высока (8000-10000 спор) (Лобзин *и др.*, 2002).

Типичными признаками сибирской язвы у животных являются лихорадка и дезориентация в пространстве, а также выделения кровянистых жидкостей изо рта, носа или анального отверстия павших особей. У

плотоядных животных и свиней основным видимым проявлением сибирской язвы зачастую служат крупные отёки в шейной области (Turnbull, 2002).

Для человека существуют четыре пути заражения сибирской язвой: через микротравмы кожных покровов, аспирационный путь (при вдыхании зараженной спорами возбудителя пыли), алиментарный путь (при употреблении в пищу не прошедших надлежащей термической обработки зараженных мясопродуктов) и факультативно-трансмиссивный путь (передача через насекомых-переносчиков, в организме которых не происходит размножения возбудителя) (Лобзин *и др.*, 2002; Ясюкевич, Ясюкевич, 2016). В зависимости от пути заражения сибирская язва проявляется в одной из трёх форм: кожной, лёгочной или гастроэнтеральной. При этом кожная форма наиболее распространена и составляет 95% от общего числа заражений, а лёгочная - наиболее тяжёлая, с наибольшей вероятностью летального исхода (Turnbull, 2002).

При кожной форме сибирской язвы характерной картиной заболевания является карбункул. Спустя 3-5 дней после заражения на коже появляется небольшая папула, центр которой через 2-3 суток преобразуется в плотную чёрную корку, окружённую кольцом везикул. Заболевание всегда сопровождается крупным отёком, который может представлять угрозу для жизни при поражении лица или шеи. В 80% случаев инфекция локальна, струп начинает рассасываться через 10 дней после появления папулы, процесс его ликвидации занимает 2-6 недель. При этом в 20% случаев инфекция гематогенно или лимфогенно распространяется за пределы первичного очага, что вызывает общую интоксикацию и может привести к летальному исходу (Лобзин *и др.*, 2002; Turnbull, 2002).

Лёгочная форма сибирской язвы является наиболее тяжёлой и опасной для жизни человека. Отдельные споры или небольшие агрегаты спор *B. anthracis*, имеющие диаметр 2-5 мкм, способны проникать в альвеолы лёгких и транспортироваться макрофагами в лимфатические узлы. Крупные

аэрозольные агрегаты спор диаметром более 5 мкм задерживаются в верхних дыхательных путях и эффективно нейтрализуются аппаратом мукоцилиарного клиренса. После прорастания спор в лимфатических узлах продуцируется большое количество токсина сибирской язвы, затем следует системная циркуляция токсина по организму, что приводит к отёкам, некрозам и септическому шоку (Shafazand *et al.*, 1999). Основываясь на наблюдениях, проведённых в 2001 году на жертвах биотеррористических атак (Jernigan *et al.*, 2001), средний инкубационный период заболевания составляет от 4 до 6 дней. У 10 пациентов, находившихся под наблюдением в рамках исследования, зафиксирована аномальная картина рентгенограммы грудной клетки: лёгочные инфильтраты, плевральный выпот и расширения средостения. При первичном обращении стандартными симптомами являлись озноб, потливость, усталость, кашель, тошнота и рвота (Jernigan *et al.*, 2001).

У гастроэнтеральной формы сибирской язвы существуют две клинические разновидности: орофарингеальная и кишечная. Признаками орофарингеальной сибирской язвы являются боль в горле, дисфагия, лихорадка, региональная лимфаденопатия в области шеи. К клинической картине кишечной сибирской язвы можно отнести тошноту, рвоту, лихорадку, боль в животе, кровавую диарею и асцит. Кишечная форма заболевания, как правило, приводит к быстрому наступлению протравации, шока, коллапса и последующей смерти (Turnbull, 2002).

1.3. Характеристика *Bacillus anthracis*

B. anthracis – представитель рода *Bacillus*, семейства *Bacillaceae*, порядка *Bacillales*, класса *Bacilli*, типа *Firmicutes*, домена *Bacteria*.

B. anthracis – грамположительная аэробная или факультативно анаэробная спорообразующая палочковидная бактерия (Baillie, Read, 2001). Размеры клетки составляют 1-1,5 мкм в ширину и 3-10 мкм в длину (Spenser, 2003). В крови заражённых животных обнаруживают как индивидуальные бактериальные клетки, так и короткие цепочки, состоящие из нескольких

клеток, окружённых капсулой из поли- γ -D-глутаминовой кислоты (Лобзин и др., 2002).

Геном *B. anthracis* представлен кольцевой молекулой ДНК, состоящей из 5 227 293 пар оснований. Также вирулентные штаммы бактерии содержат две плазмиды вирулентности: pXO1 (181 167 пар оснований, кодирует три компонента токсина сибирской язвы) и pXO2 (94 829 пар оснований, кодирует белки синтеза капсулы из поли- γ -D-глутаминовой кислоты) (Read *et al.*, 2003).

1.4. Токсин сибирской язвы

Токсин сибирской язвы состоит из трёх компонентов: протективный антиген (РА – Protective Antigen; 83 кДа), фактор летальности (LF – Lethal Factor; 90 кДа) и фактор отёчности (EF – Edema Factor; 89 кДа) (Collier, Young, 2003). Все три компонента токсина кодируются большой плазмидой вирулентности pXO1 (Okinaka *et al.*, 1999). Токсическим эффектом обладает как комбинация всех трёх компонентов токсина, так и сочетание РА только с LF или только с EF. РА в комплексе с LF формирует летальный токсин (LeTx – Lethal Toxin), а в комплексе с EF – токсин отёчности (EdTx – Edema toxin) (Moayeri, Leppla, 2009).

1.4.1. Протективный антиген сибирской язвы, РА

1.4.1.1. Строение РА

Протективный антиген (РА) сибирской язвы (735 а. о., 83 кДа) – четырёхдоменный белок, получивший своё название благодаря его активному использованию при создании вакцин: антител к РА достаточно для нейтрализации действия токсина сибирской язвы (Taft, Weiss, 2008). Домены РА сформированны, в основном, антипараллельными β -слоями (Petosa *et al.*, 1997) (**Рисунок 2**). Рецепторами для РА на поверхности клетки являются TEM8 (tumor endothelial marker 8 – эндотелиальный опухолевый маркер 8) и CMG2 (capillary morphogenesis gene 2 – белок капиллярного морфогенеза 2), которые также называются ANTXR1 и ANTXR2, соответственно (Anthrax Toxin Receptor 1/2 – рецептор токсина сибирской язвы 1/2). После связывания

с белковыми клеточными рецепторами РА способен обеспечивать транспорт EF и LF сквозь мембрану (Bradley *et al.*, 2001; Lacy *et al.*, 2004; Milne *et al.*, 1994).

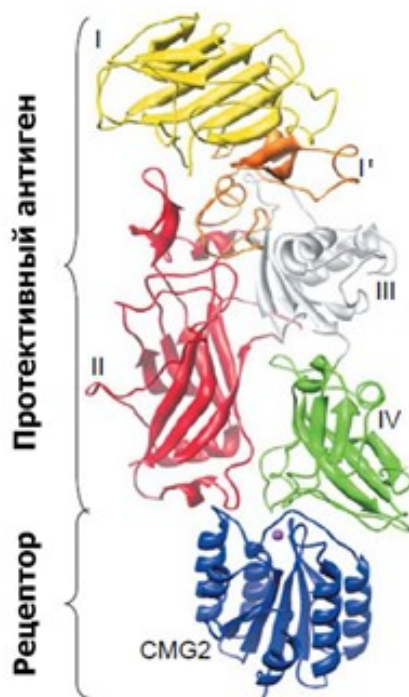


Рисунок 2. Четырёхдоменная структура РА, связанного с рецептором – CMG2 (адаптировано по Abrami *et al.*, 2005).

Домен I (а. о. 1-258) РА содержит в поверхностной петле сайт расщепления для фуриновой протеазы ($^{164}\text{RKKR}^{167}$). Протеолиз фурином происходит после связывания с РА с рецептором и приводит к образованию двух фрагментов белка: РА20 (N-концевой фрагмент) и РА63 (С-концевой фрагмент), названия которых обусловлены их молекулярной массой. РА20 соответствует 1-167 аминокислотным остаткам (около двух третей домена). Оставшаяся в составе РА63 и образующая его N-конец часть домена I называется доменом I'. Домен I' содержит сайт связывания двух ионов кальция (Gao-Sheridan *et al.*, 2003), которые, предположительно, удерживают домен I' в конформации, пригодной для самоассоциации РА63 в гептамер и связывания лиганда (Petosa *et al.*, 1997). В качестве лиганда для домена I'

выступают гомологичные N-концевые участки LF и EF. Методом сайт-специфического мутагенеза было показано, что в связывании лиганда играют важную роль остатки Arg¹⁷⁸, Lys¹⁹⁷, Arg²⁰⁰, Pro²⁰⁵, Ile²⁰⁷, Ile²¹⁰, и Lys²¹⁴ (Cunningham *et al.*, 2002).

Домен II (а. о. 249-487) участвует в образовании гептамерной поры из семи мономеров PA63. Основу структуры домена составляет β -бочонок. Важным элементом является большая гибкая петля между бета-слоями 2 β_2 и 2 β_3 , которая необходима для порообразования (Collier, Young, 2003; Petosa *et al.*, 1997). Второй домен содержит сайт расщепления белка химотрипсином (³¹³FF³¹⁴). Расщепление химотрипсином или делеция данного сайта приводит к утрате PA способности к олигомеризации и, следовательно, функции транслокации LF и EF в цитозоль (Singh *et al.*, 1994; Duverger *et al.*, 2010). Однако наличие химотрипсин-чувствительного негативно сказывается на стабильности белка, что с практической точки зрения затрудняет его использование в вакцинных препаратах (Ramirez *et al.*, 2002).

Домен III (а.о. 488-595), предположительно, в основном участвует в самоассоциации и олигомеризации PA63 (Mogridge *et al.*, 2001).

Домен IV (а.о. 596-735) выполняет функцию связывания с рецепторами (Singh *et al.*, 1991). Он состоит из N-концевой шпильки и спирали, за которыми следует бета-сендвич с иммуноглобулин-подобной складкой. В отличие от остальных трёх доменов, тесно связанных друг с другом, домен IV не слишком плотно контактирует остальной частью молекулы (Collier, Young, 2003). Рентгеноструктурный анализ PA, связанного с клеточными рецепторами, показывает, что взаимодействие рецепторов с четвертым доменом в основном связано с тремя петлями, содержащими следующие аминокислоты: ⁶⁵⁴Glu – Met⁶⁶², ⁶⁸¹Tyr – Tyr⁶⁸⁸ и ⁷¹²Glu – Gly⁷¹⁴ (McComb, Martchenko, 2016).

1.4.1.2. Проникновение PA в клетку

Первым этапом проникновения PA в клетку является его связывание через IV домен с клеточными рецепторами TEM8 или CMG2 (Bradley *et al.*,

2001). Затем происходит активация РА путём отщепления фуриновой протеазой N-терминального фрагмента белка массой 20 кДа (РА20) (Molloy *et al.*, 1992). Однако после разрыва ковалентной связи между аминокислотами полного отделения РА20 от остальной части молекулы не происходит. Для этого требуется присутствие ЕF или LF, которые конкурентно вытесняют РА20 своими N-терминальными доменами (Lacy *et al.*, 2002; Mogridge *et al.*, 2002). Активированный РА63 способен олигомеризоваться в гептамер – предшественник поры в клеточной мембране, который впоследствии преобразуется в полноценную пору, обеспечивающую транслокацию LF и EF в цитозоль. Таким образом, механизм активации РА фуриновой протеазой предотвращает олигомеризацию РА до взаимодействия с клеткой-мишенью, поддерживая таким образом РА в виде растворимого мономера. Стоит отметить, что делеция химотрипсин-чувствительного сайта приводит к утрате РА способности образовывать олигомеры (Singh *et al.*, 1994). По мере перехода в гептамерное состояние РА становится способным связывать вплоть до трёх молекул EF или LF на один гептамер (Mogridge *et al.*, 2002). Вслед за образованием комплекса с лигандами происходит клатрин- и рафт-зависимый эндоцитоз комплекса гептамера РА63 с несколькими молекулами EF и/или LF (Abrami *et al.*, 2003) (**Рисунок 3**).

Важным дополнительным условием проникновения РА в клетку является убиквитинирование консервативного остатка лизина в составе клеточного рецептора (Lys³⁵² для ANT XR1 и Lys³⁵⁰ для ANT XR2), которое осуществляет E3-лигаза Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma – Лимфома линии Casitas B) (Abrami *et al.*, 2006). Также для проникновения РА в клетку необходим корецептор к токсину сибирской язвы – LRP6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 6 – белок 6, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности). Этот поверхностный белок стимулирует связывание РА с рецептором и внутреннюю транслокацию токсина (Wei *et al.*, 2006).

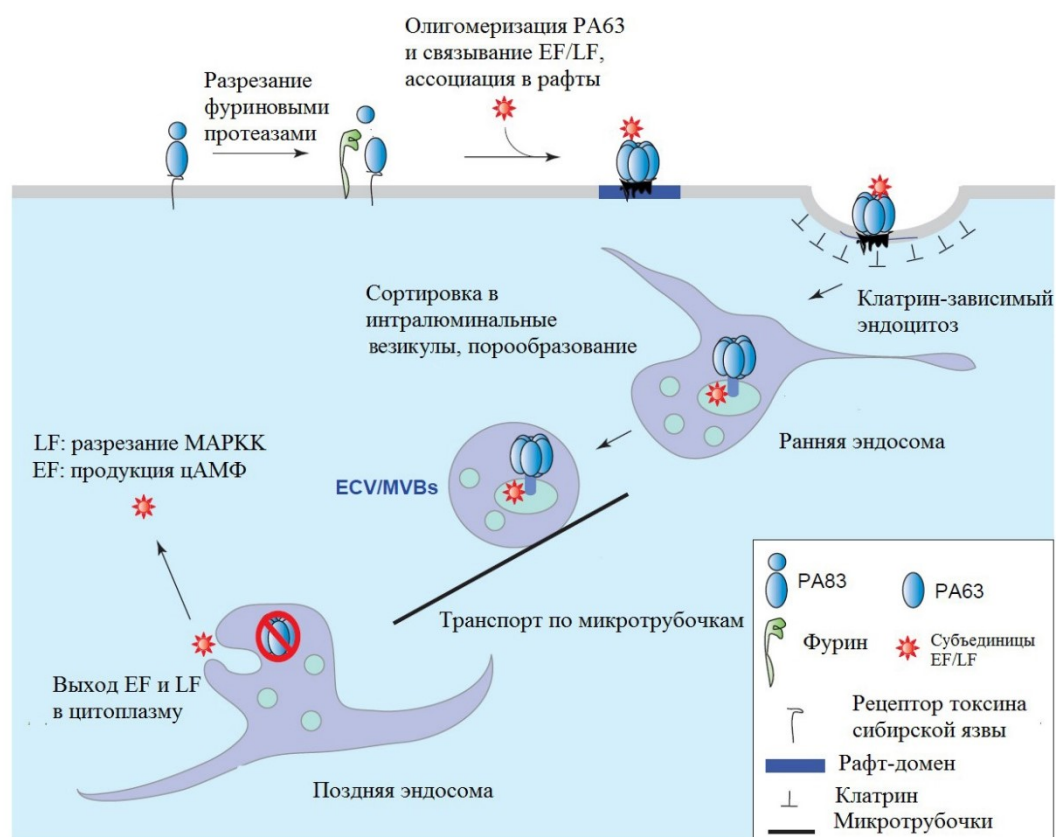


Рисунок 3. Эндоцитозный путь проникновения токсина сибирской язвы в клетки млекопитающих (адаптировано по Abrami *et al.*, 2005).

ECV – endosomal carrier vesicles, эндосомальные везикулы-переносчики.

MVB – multivesicular bodies, мультивезикулярные тельца.

По мере созревания эндосомы, образовавшейся в результате эндоцитоза гептамера РА в комплексе с лигандами, внутри неё понижается рН. Наряду с этим происходит сортировка эндосом на эндосомальные везикулы-переносчики (ECV – Endosomal Carrier Vesicles) и мультивезикулярные тельца (MVB – Multivesicular Bodies) (**Рисунок 3**) с их последующим транспортом по цитоскелету от периферии клетки к её центру. По мере этого гептамер РА преобразуется в интегральную пору, встроенную в мембрану интралюминальной везикулы (Blaustein *et al.*, 1989; Milne, Collier, 1993; Abrami *et al.*, 2004). Преобразование запускается рН-чувствительным переключателем. Механизм действия переключателя основан на протонировании аминокислотных остатков гистидина в составе петли второго домена РА (а.о. 275-352) (Santelli *et al.*, 2004). В результате срабатывания

переключателя из гибкой петли между бета-слоями $2\beta_2$ и $2\beta_3$ формируется трансмембранный β -бочонок (Collier, Young, 2003).

Через образовавшуюся пору происходит транслокация EF и LF в цитозоль. Транслокация начинается с N-конца белков. Пора выступает в роли активного транспорёра, способного переносить белки из везикулы через эндосомальную мембрану в ответ на изменение pH (Collier, 2009).

1.4.1.3. Токсин-нейтрализующие моноклональные антитела к РА

Было показано, что ряд моноклональных антител (МАТ) к рекомбинантному РА (rРА – recombinant РА) обладают способностью нейтрализовать LeTx *in vitro*. Список моноклональных антител представлен в **Таблице 1**.

In vitro исследования нейтрализующего действия МАТ в основном проводились на макрофагоподобных клеточных линиях RAW 264,7 (например, МАТ 47F12 (Reason *et al.*, 2011)) и J774A.1 (например, МАТ 1-F1 (Kelly-Cirino, Mantis, 2009)). В экспериментах по определению нейтрализующей активности в качестве токсина выступал LeTx. Были определены эпитопы РА, с которыми взаимодействуют нейтрализующие МАТ, а также было установлено, какие именно функции РА блокируются при взаимодействии с теми или иными МАТ (McComb, Martchenko, 2016).

Для ряда МАТ, взаимодействующих с эпитопами в составе IV домена РА, и одного из МАТ, взаимодействующих с эпитопом в составе II домена, продемонстрирована протективность *in vivo*. МАТ РА6 AP и РА12AP обеспечили выживание 30% и 60% мышей A/J соответственно после введения 3 LD₅₀ LeTx внутрибрюшинно (Crowe *et al.*, 2010). МАТ 48.3 продемонстрировали нейтрализующую активность против 10 LD₅₀ pXO1⁺ pXO2⁻ Штамма Sterne на OF1 линии мышей (Brossier *et al.*, 2004). МАТ 3B6 и 14B7 защитили крыс линии Fisher 344 от внутривенного введения смертельного для них LeTx (40 мкг РА, 8 мкг LF) (Little *et al.*, 1988). МАТ 1-F1 и 2-B12 продемонстрировали умеренную нейтрализующую активность

против внутрибрюшинного введения LeTx мышам линии BALB/c (2 из 5 и 3 из 5 особей соответственно). Протективность ряда МАТ, взаимодействующих с эпитопами I, II и IV доменов, ещё предстоит изучить.

Таблица 1. Моноклональные антитела к гРА, демонстрирующие способность нейтрализовать LeTx *in vitro*, и эпитопы гРА, с которыми они взаимодействуют (адаптировано по McComb, Martchenko, 2016).

МАТ	Локализация эпитопа		Функция, блокируемая антителами к эпитопу	Нейтрализующая активность <i>in vivo</i> антител, связывающихся с эпитопом
	Домен	а.о.		
47F12	РА 20	95-106	Разрезание фурином	Не исследована
19D9	I'	196-210	Не определено	Не исследована
РА6 AP	I'	232-247	Не определено	Частично показана
5E12, 2A8, 5E1	II	312-315	Формирование поры в эндосоме	Не исследована
F20G75, 76, 77	II	311-315	Формирование поры в эндосоме	Не исследована
48.3	II	412-419	Разрезание фурином	Показана
3B6	IV	671-721	Связывание с рецептором	Показана
14B7	IV	684-688	Связывание с рецептором	Показана
1-F1	IV	692-703	Связывание с рецептором	Частично показана
2-B12	IV	716-727	Связывание с рецептором	Частично показана
РА12AP	IV	628-637	Не определено	Частично показана

1.4.1.4. Стабильность РА

Поскольку РА является безопасным компонентом токсина сибирской язвы, антитела к которому обеспечивают токсин-нейтрализующее действие, интерес учёных к данному белку с точки зрения основы для создания вакцинных препаратов закономерен. Однако для rРА была продемонстрирована крайне низкая стабильность. Свободные рекомбинантные белки, как правило, особенно подвержены дезаминированию, окислению и агрегации (Manning *et al.*, 1989; Cleland *et al.*, 1993). Согласно литературным данным, одной из основных и наиболее изученной причин нестабильности rРА является спонтанное дезаминирование некоторых остатков аспарагина в его составе. Дезаминирование приводит к замене остатка аспарагина на остаток аспарагиновой или изоаспарагиновой кислоты, что влечёт за собой локальное изменение заряда молекулы, и, в случае РА, к потере иммуногенности белка и возможности реализации его биологической функции (Zomber *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2018). РА содержит 68 аминокислотных остатков аспарагина, некоторые из которых в большей степени подвержены спонтанному дезаминированию. Ранее Zomber с соавторами теоретически рассчитали полупериод ($t_{1/2}$) дезаминирования для каждого из остатков, и он составил от 24 дней для Asn⁷¹³ до $2,5 \times 10^6$ дней для Asn⁶⁰². Для расчёта был использован алгоритм Robinson и Robinson (<https://www.deamidation.org>). Алгоритм учитывает при расчёте первичную, вторичную, и третичную структуру белка при стандартных условиях. Авторы выбрали 5 остатков, теоретически наиболее подверженных дезаминированию ($t_{1/2} < 60$ дней), и изучили их подверженность дезаминированию экспериментально (Zomber *et al.*, 2005):

1) Asn¹⁰ (расчётный $t_{1/2}$ дезаминирования – 57 дней) – расположен в отщепляемом фурином 20 кДа фрагменте белка. Вопреки расчётам, не продемонстрировал значительного дезаминирования.

2) Asn¹⁶² (расчётный $t_{1/2}$ дезаминирования – 38 дней) – расположен в области фурин-чувствительного сайта ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷. Степень дезаминирования составила 70% спустя 30 дней хранения препарата при +25 °C.

3) Asn³⁰⁶ (расчётный $t_{1/2}$ дезаминирования – 53 дней) – расположен в петле, участвующей в образовании гептамерной поры. Вопреки расчётам, не продемонстрировал значительного дезаминирования.

4) Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ (расчётный $t_{1/2}$ дезаминирования – 24 и 49 дней, соответственно) – расположены в рецептор-связывающем регионе белка. Для обоих остатков наблюдалось 50% дезаминирование в самом начале эксперимента, до инкубации. Следовательно, дезаминирование происходило ещё на этапе выделения и очистки белка. В рамках дополнительного исследования было показано, что при хранении при +37 °C в течение 10 дней наблюдалось стопроцентное дезаминирование по обоим остаткам аспарагина.

Исследование Zomber с соавторами, безусловно, принесло огромный вклад в изучение дезаминирования РА, однако частично полагалось на компьютерные расчёты на этапе выбора конкретных остатков аспарагина для экспериментального анализа. Позднее, Powell с коллегами провели исследование, в рамках которого производилась оценка подверженности дезаминированию всех остатков аспарагина в составе РА. Согласно полученным результатам, спонтанному дезаминированию в существенной степени подвержены семь аминокислотных остатков: Asn⁶⁰², Asn⁴⁰⁸, Asn⁶⁰¹, Asn⁷¹⁹, Asn⁴⁶⁶, Asn⁷¹³ и Asn⁵³⁷. Вероятность дезаминирования в данном ряду увеличивается слева-направо. При этом замораживание и последующее оттаивание белка существенно увеличивают степень дезаминирования (Powell *et al.*, 2007). В дальнейшем, Verma с коллегами при проектировании мутантного рекомбинантного РА (rРА), акцентировали своё внимание на остатках Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹, которые сильно подвержены спонтанному дезаминированию как под данным, полученным Zomber с соавторами, так и по результатам исследования Powell с коллегами (Verma *et al.*, 2018)

Помимо дезаминирования к причинам нестабильности rPA относится наличие в составе белка сайтов протеолиза для фурина ($^{164}\text{RKKR}^{167}$) и химотрипсина ($^{313}\text{FF}^{314}$). Данный вывод основан на увеличении стабильности белка при внесении замен в фурин-чувствительный сайт и делеции химотрипсин-чувствительного сайта (Singh *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2002).

1.4.2. Фактор летальности, LF

Фактор летальности (LF) (776 а. о.; 90 кДа) – Zn^{2+} -зависимая металлопротеаза, которая специфически расщепляет большинство изоформ киназ митоген-активируемых протеиновых киназ (митоген-активируемые протеиновые киназы – MAPK; киназы MAPK – MAPKK) (Duesbery *et al.*, 1998; Bromberg-White *et al.*, 2010). MAPK и MAPKK – часть фосфорелейной системы, состоящей из трех последовательно активируемых путём фосфорилирования киназ. MAPK фосфорилируют определенные серины и треонины целевых белков и регулируют клеточные процессы от экспрессии генов до апоптоза (Johnson, Lapadat, 2002).

LF в комплексе с PA формирует LeTx. Данный токсин зачастую используется в тестировании вакцинных кандидатов и антител на протективность. Примером подобного тестирования может служить изучение протективности МАТ к РА как *in vitro*, так и *in vivo* (McComb, Martchenko, 2006). Имеются сведения, что наличие LF в составе вакцины против сибирской язвы способно оказывать положительное влияние на устойчивость реципиента к заражению. Антитела к LF, изолированные из крови людей, вакцинированных AVP (Anthrax Vaccine Precipitated, вакцина против сибирской язвы преципитированная), продемонстрировали нейтрализующую активность по отношению к LeTx, связываясь с первым доменом LF (Dumas *et al.*, 2017a).

14.3. Фактор отёчности, EF

EF (767 а. о.; 89 кДа) – кальций- и кальмодулин-зависимая аденилатциклаза, которая повышает концентрацию в цитоплазме цАМФ, что

ведёт к нарушению водного гомеостаза (Abrami *et al.*, 2005; Tang, Guo, 2009). В комбинации с РА EF формирует EdTx. Сам по себе EdTx не наносит большого повреждения тканям организма, его роль в патогенезе, исходя из аналогии с другими токсинами, повышающими концентрацию цАМФ, заключается в нарушении функции фагоцитов (Lerpla, 2000). Данное предположение подтверждается, например, тем, что EdTx ингибирует способность к фагоцитозу спор у полиморфноядерных лейкоцитов (O'Brien *et al.*, 1985).

Исследования последних десятилетий позволяют предположить, что антитела к EF могут внести свой вклад в способность организма противостоять инфекции сибирской язвы в дополнение к антителам к РА. Было показано, что моноклональные антитела EF13D, связывающиеся с четвёртым доменом EF, по-видимому, способны конкурировать за EF с кальмодулином, образуя с EF более прочные комплексы, чем последний. В результате наблюдалась не только нейтрализация EdTx *in vitro*, но и уменьшение системных негативных эффектов EdTx, и нейтрализация местного отёка на мышинной модели (Chen *et al.*, 2009). Также исследовались антитела к EF, вырабатываемые после вакцинации AVR. Показано, что эти антитела связывают участки второго и третьего домена EF, и для них также была описана способность нейтрализовать EdTx *in vitro* (Dumas *et al.*, 2017b).

На мышинной модели A/J было продемонстрировано, что вакцинирование аденовирусным вектором, кодирующим первые 254 а. о. EF, обеспечивает защиту 57% особей от инфицирования 100 LD₅₀ спор pXO1⁺ pXO2⁻ штамма *B. anthracis* Sterne. Интересно, что антитела против N-концевого участка EF демонстрировали кросс-реактивность с LF и нейтрализовали LeTx *in vivo* (Zeng *et al.*, 2006). По-видимому, это объясняется общим строением N-терминальных участков LF и EF, которые отвечают за взаимодействие с РА.

1.5. Вакцины против сибирской язвы

1.5.1. Лицензированные вакцины

1.5.1.1. Живые аттенуированные вакцины

Первоначально для профилактики сибирской язвы были использованы живые аттенуированные вакцины. Первую подобную вакцину создал Луи Пастер в 1881 году, и она активно использовалась для вакцинации как людей, так и животных в Европе и Южной Америке на протяжении 50 лет. Такие вакцины предполагали аттенуацию по схеме Пастера (путём инкубации культуры при +42-43 °С в течение нескольких дней). Считалось, что это приводит к элиминации плазмиды pXO1, кодирующей компоненты токсина сибирской язвы. В результате, препарат представлял собой нетоксигенный, инкапсулированный (pXO1⁻, pXO2⁺) вакцинный штамм *B. anthracis*. Дальнейшие исследования показали, что данные вакцины всё же содержали примесь полностью вирулентного (pXO1⁺, pXO2⁺) штамма возбудителя. Впоследствии вакцины, получаемые путём аттенуации по схеме Пастера, были замещены вакцинами, основанными на *B. anthracis* штамма Sterne (неинкапсулированный штамм, pXO1⁺, pXO2⁻) и других Sterne-подобных штаммах (Hambleton *et al.*, 1984; Scorpio *et al.*, 2006; Thorkildson *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2016).

Вакцины для человека на основе живых ослабленных возбудителей сибирской язвы лицензированы только в двух странах: в России и в Китае (WHO, 2012). Российская вакцина “Вакцина сибиреязвенная живая сухая” (48 ЦНИИ Минобороны России ФГУ, Россия), впервые лицензированная для скарификационной вакцинации в 1953 году и для подкожной вакцинации в 1959 году, содержит живые споры аттенуированного штамма *B. anthracis* STI-1 (pXO1⁺, pXO2⁻). Одна доза вакцины содержит 4*10⁸ спор. В 1990 году в рамках эксперимента была произведена вакцинация препаратом более 2500 человек. В результате ни у одного из реципиентов не было обнаружено серьезных негативных последствий применения вакцины (Shlyakhov,

Rubinstein, 1994). Китайская вакцина основана на суспензии штамма *B. anthracis* A16R (pXO1⁺, pXO2⁻) и используется только в Китае (WHO, 2012). В западных странах ни одна из данных вакцин не применяется.

При этом живые аттенуированные вакцины по-прежнему остаются основным видом препаратов для профилактики сибирской язвы в ветеринарии. Большинство из них основано на штамме Sterne или Sterne-подобных неинкапсулированных штаммах. Ветеринарная вакцина “Вакцина против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИВВиМ живая” (ООО “Агровет”, Россия) содержит споры аттенуированного бескапсульного (pXO1⁺, pXO2⁻) штамма *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ. В качестве примера живых аттенуированных вакцин против сибирской язвы типа Sterne за рубежом можно привести Anthrax Spore Vaccine (Colorado Serum Company, Денвер, Колорадо, США). Препарат содержит споры Sterne 34F2 (pXO1⁺, pXO2⁻). Помимо вакцин типа Sterne, существуют также вакцины против сибирской язвы Carbozoo. Механизм их аттенуации до конца неизвестен, однако было показано, что вакцинные штаммы, используемые в препаратах типа Carbozoo, содержат обе плазмиды вирулетности: как pXO1, так и pXO2. Подобные вакцины лицензированы для ветеринарного использования, в частности, в Италии (штамм Carbosap) (Fasanella *et al.*, 2001).

1.5.1.2. Бесклеточные вакцины на основе нативного РА

В Америке и Европе лицензированы три вакцины, основанные на РА, полученном из фильтратов культур аттенуированных авирулентных штаммов *B. anthracis*: вакцина против сибирской язвы адсорбированная (AVA – Anthrax Vaccine Adsorbed), вакцина против сибирской язвы преципитированная (AVP – Anthrax Vaccine Precipitated) (Friedlander, Little, 2009; Kaur *et al.*, 2013) и вакцина CYFENDUS™ (Emergent BioSolutions Inc., Гейтерсберг, Мэриленд, США).

AVA (производится под маркой BioThrax, Emergent BioSolutions Inc., Гейтерсберг, Мэриленд, США), разработанная и лицензированная в США

в 1972 году, представляет собой фильтрат культуры неинкапсулированного (PXO2⁻) штамма V770-NP1-R *B. anthracis*, адсорбированный на гель гидроксида алюминия Alhydrogel®. Вакцинация проводится внутримышечно и включает введение пяти доз препарата в течение 18 месяцев (Wright *et al.*, 2010).

AVP, лицензированная в Великобритании в 1979 году, основана на фильтрате культуры неинкапсулированного авирулентного штамма Sterne 34F2 *B. anthracis*, адсорбированного на сульфате калия-алюминия. Вакцинация проводится внутримышечно и включает введение четырёх доз препарата в течение восьми месяцев (WHO, 2012).

Обе вакцины предполагают ежегодные бустерные вакцинации для поддержания иммунитета. При использовании AVA и AVP характерно возникновение эритем и небольших отёков в месте введения вакцины более чем у 40% реципиентов (WHO, 2012). Как AVA, так и AVP содержат недетерминированные количества LF и EF (Dumas *et al.*, 2017a; Dumas *et al.*, 2017b), с чем, вероятно, могут быть связаны побочные реакции организма реципиентов. Было показано, что AVP содержит как минимум 138 белков *B. anthracis*, из которых доля PA составляет 65%, LF – 8%, а EF – 3% (Modi *et al.*, 2021). Также было показано, что при использовании гидроксида алюминия в качестве адъюванта для рекомбинантного PA (rPA) при хранении происходит уменьшение иммуногенных свойств rPA вследствие деградации белка (Wagner *et al.*, 2012). Данный факт позволяет предположить негативное влияние гидроксида алюминия также и на стабильность нативного PA в составе вакцин.

В 2023 году успешно завершилась третья фаза клинических испытаний вакцины AV7909, представляющей собой AVA с добавлением CPG7909 в качестве адъюванта. Вакцина была разработана для постконтактной профилактики сибирской язвы. Для препарата были показаны иммуногенность и способность индуцировать токсин-нейтрализующие антитела (Akintunde *et al.*, 2023). В 2023 году вакцина была лицензирована под

маркой CYFENDUS™ (Emergent BioSolutions Inc., Гейтерсберг, Мэриленд, США). Вакцина предполагает введение реципиенту двух доз с перерывом в две недели (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/cyfendus>).

1.5.2. Современное состояние исследований в области рекомбинантных вакцин против сибирской язвы

Недостатки лицензированных вакцин ставят перед научным сообществом задачу усовершенствования препаратов для профилактики сибирской язвы. Подходы, применяемые в вакцинах AVA, AVP и CYFENDUS™ находят логичное продолжение в современных исследованиях. В 2023 году было опубликовано исследование иммуногенности и протективности препарата, представляющего собой бесклеточный супернатант культуры *B. anthracis* штамма A16R-5.1, лишённого пяти генов, связанных с внеклеточной протеазной активностью, а также гена LF. Массовая доля РА в препарате составила 50%. Вакцинный кандидат продемонстрировал способность индуцировать сильный иммунный ответ и обеспечил протективность в лабораторных мышках против *B. anthracis* штамма Pasteur II. При этом наибольшая протективность наблюдалась при аэрозольном интратрахеальном введении жидкой или сублимированной форм: 100% животных пережило заражение 200 LD₅₀ спор *B. anthracis* (Zhai *et al.*, 2023). Однако подобные разработки требуют дополнительных исследований в контексте безопасности, аллергенности и точного состава препарата.

Наиболее широко распространён подход, заключающийся в использовании рекомбинантного РА (rPA – recombinant PA) в качестве основы для вакцин, поскольку антител к РА достаточно для формирования эффективного иммунного ответа (Taft, Weiss, 2008). При этом предпочтительно использование именно рекомбинантного белка, в связи с тем, что препараты на его основе не содержат нежелательных примесей *B. anthracis*, способных вызвать побочные реакции. Таким образом, решается одна из главных проблем, связанных с AVA и AVP, активно применяемыми

для вакцинации в США и Великобритании. Разрабатываются вакцины на основе бактериальных и вирусных векторов, экспрессирующих гРА, ДНК-вакцины, содержащие кодирующие гРА молекулы ДНК, а также субъединичные вакцины, основанные как на идентичном по аминокислотной последовательности нативному гРА, так и на модифицированном гРА.

1.5.2.1. Вакцины на основе бактериальных векторов

Активно предпринимаются попытки создания вакцины против сибирской язвы на основе живых бактериальных векторов, экспрессирующих различные компоненты токсина сибирской язвы. Интересными представляются разработки векторов на основе бактерий родов *Bacillus*, *Lactobacillus* и *Salmonella*.

На основе спор *B. anthracis* штамма MASC-13 (pXO1⁻, pXO2⁻ штамм Δ14185, трансформированный плазмидой pA13UB) была предложена кандидатная вакцина, предусматривающая введение *per oris*. Вектор экспрессирует модифицированный гРА, названный mгРА313, в котором делетированы 313 и 314 остатки фенилаланина в химотрипсин-чувствительном сайте. Иммунизация морских свинок данным вектором привела к эффективной выработке антител против гРА (Aloni-Grinstein *et al.*, 2005).

На основе другого вида рода *Bacillus* – *Bacillus subtilis* (штамм PY79) – также были предложены кандидатные вакцины для введения *per oris* (Duc *et al.*, 2007). В работе Duc с соавторами были рассмотрены варианты векторов, содержащих рекомбинантную плазмиду, кодирующую полноразмерный гРА или его части. Интересно, что в случае *B. subtilis* наиболее высокий уровень протективного иммунного ответа достигался в том случае, когда вектор экспрессировал гРА, слитый с поверхностным белком споры, что приводило к экспонированию гРА на поверхности споры (Duc *et al.*, 2007). Впоследствии данные исследования продолжены не были.

На основе *Lactobacillus acidophilus* была разработана вакцина, предполагающая адресную доставку rPA к дендритным клеткам с помощью слияния rPA с белком, специфически узнающим дендритные клетки. Вакцинация мышей кандидатной вакциной привела к формированию устойчивого протективного иммунного ответа против *B. anthracis* штамма Sterne (Mohamadzadeh *et al.*, 2009). Подобные разработки представляются особенно интересными, поскольку применение непатогенной *L. acidophilus* позволяет избежать рисков, связанных с использованием аттенуированных штаммов патогенных бактерий.

Аттенуированные штаммы *Salmonella* также являются перспективной основой для вакцин против сибирской язвы. В 2009 году в рамках доклинических испытаний на макаках резус (*Macaca mulatta*) и циномолгус (*Macaca flavicularis*) была показана эффективность мукозальной вакцинации животных вектором *Salmonella enterica serovar Typhi* штамма CVD 908-htrA, содержащим плазмиду, кодирующую химерный rPA слитый с экспротируемым белком ClyA. Вакцинация проводилась с парентеральным введением одной (макаки циномолгус) или двух (макаки резус) бустерных доз лицензированных вакцин против сибирской язвы. Через семь дней после получения бустера изначально иммунизированные *Salmonella enterica serovar Typhi* животные продемонстрировали высокую токсин-нейтрализующую активность сыворотки, в то время как животные, получившие только бустер без изначальной иммунизации *Salmonella enterica serovar Typhi*, не продемонстрировали подобной картины. Данная разработка потенциально может уменьшить число необходимых ревакцинаций (Galen *et al.*, 2009). Также в 2017 году на мышах и кроликах была продемонстрирована высокая протективность вакцины, основанной на *Salmonella enterica serovar Typhi* штамма TY21a, содержащей ген rPA в хромосоме (Sim *et al.*, 2017).

1.5.2.2. Вакцины на основе вирусных векторов

Чаще всего в качестве вирусных векторов для вакцины против сибирской язвы рассматриваются аденовирусные векторы, в особенности, на основе нереплицирующегося аденовируса пятого серотипа (Ad5), экспрессирующего гРА или его части. Испытания на кроликах подобного вакцинного кандидата, экспрессирующего полноразмерный гРА (AdVAV), продемонстрировали его эффективность, не уступающую эффективности AVA (при однократной иммунизации для обоих препаратов). Более того, была показана большая скорость выработки антител, при этом высокие титры антител также сохранялись дольше (Krishnan *et al.*, 2015). Стоит отметить, что разработка новых векторных вакцин, основанных на Ad5, может быть осложнена наличием у большей части населения Земли иммунитета против Ad5, что ограничивает использование векторов на его основе. Этот факт необходимо учитывать в дальнейших исследованиях в данной области (Fausther-Bovendo, Kobinger, 2014; Wang *et al.*, 2022). Несмотря на это, в работе Zhang с соавторами было показано, что единичная интраназальная иммунизация мышей нереплицирующимся аденовирусным вектором, кодирующим РА, обеспечила защиту мышей от сибирской язвы, не взирая на предсуществующий у животных иммунитет к аденовирусу (Zhang *et al.*, 2013).

В 2013 году компанией PaxVax были анонсированы клинические испытания вакцинных кандидатов, основанных на экспрессирующих гРА реплицирующихся аденовирусных векторах четвертого серотипа, однако на данный момент результаты так и не были опубликованы (NCT01979406).

Помимо вакцин против сибирской язвы, содержащих аденовирусные векторы, существуют разработки препаратов с использованием других модифицированных вирусов. Было показано, что вирус осповакцины, экспрессирующий гРА, обеспечивает частичную защиту морских свинок и мышей от полностью вирулентного инкапсулированного штамма *B. anthracis* Ames (pXO1⁺, pXO2⁺) (Iacono-Connors *et al.*, 1991). Частицы вируса

венесуэльского лошадиного энцефалита, экспрессирующие rPA, обеспечили полную защиту мышей от заражения *B. anthracis* штамма Sterne (pXO1⁺, pXO2⁻) (Lee *et al.*, 2003).

1.5.2.3. ДНК-вакцины

Существуют интересные работы по созданию вакцин против сибирской язвы на основе ДНК-плазмид, кодирующих различные компоненты токсина *B. anthracis*. В 2004 году Hermanson с коллегами показали, что вакцинация ДНК-плазмидами, кодирующими rPA с делетированным фурин-чувствительным сайтом и первые три домена LF, способна защитить кроликов от аэрозольного заражения *B. anthracis* штамма Ames (pXO1⁺, pXO2⁺) (Hermanson *et al.*, 2004). Исследован ряд ДНК-вакцин, кодирующих различные домены PA и/или LF ДНК в качестве основы для вакцин (Price *et al.*, 2001; Livingston *et al.*, 2010). Отдельно хотелось бы выделить вакцину VCL-AB01, содержащую рекомбинантные PA и LF с модификациями, инактивирующими их биологические функции. Данный препарат продемонстрировал безопасность и иммуногенность в испытаниях на людях, а также иммуногенность и протективность на приматах (Keitel *et al.*, 2009). В 2021 году было опубликовано исследование, показывающее эффективность иммунизации мышей ДНК вакциной, кодирующей одновременно PA и поверхностный белок *B. anthracis* EA1, что позволяет индуцировать выработку антител, направленных как на токсин сибирской язвы, так и на клетки бактерии-возбудителя. Единичная вакцинация подобной «бицистронной» ДНК-вакциной с последующей бустерной дозой смеси белков PA и EA1 обеспечила защиту 83,3% мышей против *B. anthracis* штамма Sterne 34F2. Однако при вакцинации данной ДНК-вакциной с использованием её же в качестве бустерной дозы, без добавления бустера, содержащего смесь белков PA и EA1, наблюдалась лишь 50% протективность (Simuthra *et al.*, 2021).

ДНК-вакцины вызывают серьёзные дискуссии в научном сообществе. Нет ясности в вопросе безопасности подобных вакцин с точки зрения

потенциальной возможности интеграции в геном. Также не до конца понятно взаимодействие трансформированных клеток с Т-лимфоцитами после презентации фрагментов антигенов, кодируемых вакцинной ДНК, на главных комплексах гистосовместимости (Kofta, Wedrychowicz, 2001).

1.5.2.4. Субъединичные вакцины против сибирской язвы на основе rPA

Субъединичные вакцины являются наиболее распространённым типом разрабатываемых препаратов для профилактики сибирской язвы. Чаще всего они содержат rPA или другие компоненты токсина или оболочки *B. anthracis*. Для получения rPA для подобных вакцин используются бактериальные и растительные экспрессионные системы. При этом для экспрессии rPA чаще всего выбирают именно клетки бактерий.

1.5.2.4.1. Субъединичные вакцины на основе rPA, экспрессированного в бактериальной системе

Для экспрессии rPA в качестве основы для субъединичных вакцин, в основном, используются *Escherichia coli*., *B. anthracis*., *B. subtilis*., *Brevibacillus brevis* (ранее известная ранее как *Bacillus brevis*) и *Pseudomonas fluorescence*. Все перечисленные бактерии имеют различные недостатки, которые необходимо учитывать при выборе экспрессионной системы. Так, препараты белков, полученные из *E. coli* или *P. fluorescence* часто контаминированы эндотоксинами, а *B. anthracis*. и *B. subtilis* производят большое количество протеаз, в том числе секретируемых, которые негативно влияют на стабильность экспрессируемых белков (Kondakova *et al.*, 2019). *B. brevis* представляет интерес для создания вакцины против сибирской язвы, поскольку способна обеспечивать крайне эффективную экспрессию белка интереса в растворимой секретируемой форме (Panda *et al.*, 2014). Однако данная бактерия требует особых условий культивирования: культуру выращивают до течение 4 дней на +30 °C (Rhie *et al.*, 2005a,b). Подобные условия не являются оптимальными для накопления rPA, белка, характеризующегося низким уровнем стабильности.

Наиболее очевидной отправной точкой в исследованиях субъединичных вакцин на основе rPA являются препараты, содержащие rPA, идентичный нативному, то есть, не отличающийся от него по аминокислотной последовательности. Большинство научных исследований и клинических испытаний по-прежнему проводятся именно с таким рекомбинантным белком. В работе Campbell с соавторами (2007) исследовали эффективность вакцинации людей путём внутримышечного введения rPA, экспрессированного в нетоксигенном, неинкапсулированном (pXO1⁻, pXO2⁻) штамме *B. anthracis*, с гелем гидроксида алюминия Alhydrogel[®] в качестве адъюванта. В результате у реципиентов наблюдалось формирование иммунного ответа, сравнимого с иммунным ответом, индуцированным AVA (Campbell *et al.*, 2007). Вакцина rPA102, основанная на rPA, выделенном из неинкапсулированного штамма *B. anthracis* Sterne-1, адсорбированном на гидроксиде алюминия, успешно прошла первый этап клинических испытаний (Gorse *et al.*, 2006). Вакцина, содержащая rPA, экспрессированный в *E. coli* и адсорбированный на гидроксиде алюминия, также показала способность индуцировать высокие и устойчивые титры к PA, коррелирующие с токсин-нейтрализующей активностью (Brown *et al.*, 2010; идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT00057525). Корейское агентство по контролю и профилактике заболеваний (KDCA - Korea Disease Control and Prevention Agency) разрабатывает рекомбинантную вакцину GC1109 на основе rPA, экспрессируемого в *Brevibacillus brevis*, на данный момент завершены первая и вторая фазы клинических испытаний (Kim *et al.*, 2023; идентификаторы ClinicalTrials.gov: NCT01624532, NCT01867957).

Использование субъединичных вакцин, содержащих rPA, позволяет избежать одну из главных проблем современных вакцин, основанных на бесклеточных фильтратах культур возбудителя – включение в состав препарата прочих белков и молекул небелковой природы *B. anthracis*. Однако это не единственная проблема, связанная с существующими вакцинами против сибирской язвы. Как было рассмотрено в **Разделе 1.4.1.4**, спонтанное

дезаминирование и протеолиз в фурин- и химотрипсин-чувствительных сайтах приводят к деградации РА. Использование именно рекомбинантного протективного антигена в вакцинах позволяет вносить определённые модификации в аминокислотную последовательность данного белка. Внесение аминокислотных замен в “проблемные” участки белка (сайты спонтанного дезаминирования и протеолиза) позволяет избежать ускоренной деградации антигена при хранении. В работе Verma с соавторами было продемонстрировано, что замена Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ на глутамин обеспечивает более высокий уровень стабильности полноразмерного rРА, не влияя на способность индуцировать выработку токсин-нейтрализующих антител. Глутамин - аминокислота, наиболее близкая к аспарагину по свойствам, однако не подверженная дезаминированию в течение времени, необходимого для хранения вакцинных препаратов (Verma *et al.*, 2018). Возможность внесения стабилизирующих замен в сайты протеолиза были исследованы в работе Ramirez. Полноразмерный rРА с заменами аминокислотных остатков ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ в фурин-чувствительном сайте на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷ и с делецией остатков ³¹³FF³¹⁴ в химотрипсин-чувствительном сайте, а также с заменой 308 остатка глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту (РА-SNKE-ΔFF-E308D), экспрессированный в нетоксигенном, неинкапсулированном (pXO1⁻, pXO2⁻) штамме *B. anthracis* ВН445, сохранил способность индуцировать выработку токсин-нейтрализующих антител (Ramirez *et al.*, 2002). Важно отметить, что данные замены не только способствуют увеличению стабильности rРА, но и приводят к утрате белком способности к транслокации EF и EF в цитозоль. Впоследствии замены, описанные в работе Ramirez с соавторами, легли в основу большого числа исследований, посвящённых разработке стабильной рекомбинантной вакцины против сибирской язвы. РА-SNKE-ΔFF-E308D, экспрессированный в *B. anthracis* штамма ВН445 и адсорбированный на гидроксиде алюминия, показал иммуногенность, сопоставимую с AVA, в первой фазе клинических испытаний (Bellanti *et al.*, 2012; идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT00114621). Модифицированный таким же образом rРА,

экспрессированный в *P. fluorescens*, продемонстрировал протективность в присутствии Alhydrogel® в исследовании на кроликах при заражении полностью вирулентным штаммом *B. anthracis* (Reed *et al.*, 2015). Впоследствии в статье Schneider с соавторами были описаны положительные результаты первой фазы клинических испытаний вакцины Px563L (Schneider *et al.*, 2021; идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT02655549). В качестве иммуногена вакцина также содержала rPA с описанными выше заменами в сайтах протеолиза, полученный в *P. fluorescens* (авторы работы называли белок mrPA). В качестве адъюванта для mrPA применили MPLA (Monophosphoryl-Lipid A – монофосфорил-липид A), агонист TLR-4 (Toll-Like-Receptor 4 – толл-подобный рецептор 4), упакованный в липосомы. Кроме разработок, основанных на модифицированном rPA с заменами в обоих сайтах протеолиза, были исследованы варианты rPA с делециями только фурин- или только химотрипсин-чувствительного сайта (¹⁶³SRKKRS¹⁶⁸ или ³¹³FF³¹⁴, соответственно). Данные белки, экспрессированные в *Brevibacillus brevis*, показали отсутствие цитотоксического эффекта в присутствии LF, а также иммуногенность и протективность при иммунизации с использованием любого из двух адъювантов: геля гидроксида алюминия Rehydrigel® HPA или Ribi-Trimix (MPLA + дикориномиколат трегалозы + «скелет клеточной стенки»; Sigma, Мумбаи, Индия) (Rhie *et al.*, 2005b). Примечательно, что последний продемонстрировал существенно большую эффективность с точки зрения индукции нейтрализующих антител, чем алюмосодержащий Rehydrigel® HPA.

Альтернативным подходом к решению проблемы нестабильности rPA при хранении могут стать лиофилизированные вакцинные рецептуры для интерназальной вакцинации. Было показано увеличение стабильности rPA в составе подобных вакцин по сравнению с rPA в жидких препаратах (Jiang *et al.*, 2006). Например, в работе Wang с коллегами была продемонстрирована высокая стабильность rPA в составе сухого препарата с активатором тучных клеток c48/80 (Wang *et al.*, 2012).

Поскольку сайты протеолиза, которые являются одной из причин нестабильности rPA, сосредоточены в доменах I и II белка, в научном сообществе популярна идея использования в составе субъединичной вакцины только индивидуального домена IV rPA. Выбор четвертого домена обусловлен тем, что именно в нём локализовано наибольшее количество протективных эпитопов (см. **Раздел 1.4.1**). В работе Flick-Smith с соавторами иммунизация мышей рекомбинантными белками, содержащими IV домен PA, обеспечивала высокую протективность при использовании Alhydrogel® в качестве адъюванта (Flick-Smith *et al.*, 2002). Однако разработки рекомбинантных вакцин, основанных на отдельных фрагментах PA, не ограничиваются использованием только его четвертого домена. Так, в 2008 году Yin с коллегами опубликовали работу, в которой описаны вирусоподобные частицы вируса гепатита В, экспонирующие 302-325 а. о. PA (домен II, данный участок содержит нейтрализующий эпитоп). Для их получения белок, состоящий из 1-144 а. о. корового белка вируса гепатита В, слитых с 302-325 а. о. PA, был экспрессирован в *E. coli*. Формирование вирусоподобных частиц из данного белка было подтверждено методом электронной микроскопии. Для полученного вакцинного кандидата была показана протективность на морских свинках против вирулентного штамма *B. anthracis* IVDC40048 (Yin *et al.*, 2008). В противовес приведённым исследованиям, в 2008 году было показано, что наибольший титр токсин-нейтрализующих антител наблюдается именно при иммунизации полноразмерным rPA (Abbound, Casadevall, 2008).

Наряду с использованием полноразмерного rPA или рекомбинантных белков, состоящих из его отдельных доменов, интерес представляют исследования, в которых rPA комбинируют с другими компонентами токсина сибирской язвы, клеточной стенки или капсулы *B. anthracis*. Были проведены исследования вакцинных препаратов, содержащих rPA, слитый с LF в составе единого рекомбинантного антигена. Химерный белок, содержащий первый домен LF и четвертый домен PA и экспрессированный в *E. coli*, продемонстрировал протективность, сопоставимую с полноразмерным rPA

(Baillie *et al.*, 2010). Wu с соавторами получили химерный белок LFn-DPA, представлявший собой DPA, rPA с заменой 427-го аминокислотного остатка фенилаланина на аспарагиновую кислоту (замена предотвращает транслокацию LF и EF через гептамерную пору), слитый на N-конце с 1-245 аминокислотными остатками LF. Выделенный из *E. coli* LFn-DPA оказался способен индуцировать выработку высокого титра антител к РА, а также к LF. Более того, была продемонстрирована кросс-реактивность индуцированных к LFn-DPA антител с EF, что объясняется гомологией N-концевых доменов белков EF и LF. Примечательно, что авторы предполагают использовать белок LFn-DPA не только в вакцинных препаратах против сибирской язвы, но и в качестве «антитоксина» уже после заражения реципиента сибирской язвой. Благодаря наличию в составе белка N-концевого домена LF, LFn-DPA способен конкурировать с LF и EF за лиганд-связывающий домен РА. В то же время, модифицированный протективный антиген DPA может конкурировать с РА за LF и EF, при этом не обеспечивая транслокацию данных белков в цитозоль из-за замены 427 остатка фенилаланина в последовательности DPA. В рамках исследования Wu с коллегами были показаны токсин-нейтрализующие свойства LFn-DPA как *in vitro*, так и *in vivo* на лабораторных мышцах (Wu *et al.*, 2010).

Белок BclA, компонент экзоспория *B. anthracis*, также может быть использован при разработке вакцины. Экспрессированный в *E. coli* химерный белок, представляющий собой С-концевой домен BclA, слитый с IV доменом РА, обеспечил стопроцентную протективность в мышцах против 10 LD₅₀ спор *B. anthracis* полностью вирулентного (pXO1⁺, pXO2⁺) штамма Ames (Majumder *et al.*, 2018). Вакцина, содержащая помимо rPA поли-γ-D-глутаминовую кислоту (ПДГК), формирующую капсулу *B. anthracis*, продемонстрировал полную защиту морских свинок после заражения 50 LD₅₀ спор *B. anthracis* pXO1⁺, pXO2⁺ штамма H9401 (Lee *et al.*, 2009). Полученный с использованием сортазы А конъюгат ПГДК с IV доменом РА показал способность индуцировать антитела как к РА, так и к ПГДК, а также обеспечил защиту

морских свинок от инфекции *B. anthracis* штамма Ames (pXO1⁺, pXO2⁺) (Garufi *et al.*, 2012). Стоит отметить, что наличие rPA в составе подобных вакцин, по-видимому, не обязательно. Так, поликлональные антитела, индуцированные в шимпанзе при иммунизации ПГДК, химически конъюгированной со столбнячным токсином, защитили мышей при заражении 10 LD₅₀ спор *B. anthracis* штамма Ames (Chen *et al.*, 2015). Также ПГДК, ковалентно связанная с наружным мембранным белком *Neisseria meningitidis* серотипа В, продемонстрировала 60% протективность в макаках резус при заражении 123 LD₅₀ спор *B. anthracis* штамма Ames (Chabot *et al.*, 2012). Помимо BclA и ПДГК, липопроtein GBAA0190, другой компонент экзоспория *B. anthracis*, также может служить в качестве иммуногена в составе вакцины против сибирской язвы. Рекомбинантный GBAA0190, названный r0190, был экспрессирован в *E. coli*. В результате иммунизации с гидроксидом алюминия именно композиция r0190 с rPA позволила добиться 50% протективности в морских свинках против заражения 30 LD₅₀ спор *B. anthracis* штамма H9401 (pXO1⁺ pXO2⁺) (Jeon *et al.*, 2021).

Таким образом, современные разработки в области субъединичных рекомбинантных вакцин против сибирской язвы сосредоточены вокруг различных вариантов полноразмерного rPA, его отдельных доменов, а также различных поверхностных белков *B. anthracis*.

1.5.2.4.2. Субъединичные вакцины на основе rPA, экспрессированного в растительной системе

Как правило, rPA для вакцин получают в бактериальных системах, но также существует направление исследований, изучающее растительные экспрессионные системы для получения rPA. Впервые rPA был экспрессирован в трансгенных табаке и томатах. Однако наблюдаемый уровень экспрессии белка оказался достаточно низок (Aziz *et al.*, 2002; Aziz *et al.*, 2005). В попытке решить эту проблему были разработаны растительные системы, экспрессирующие rPA в хлоропластах, которые демонстрировали

более высокий уровень экспрессии белка из-за достижения большего числа копий ДНК на клетку (Koza *et al.*, 2005, Gorantala *et al.*, 2014). В работе Koza с коллегами полноразмерный гРА, выделенный из трансгенных хлоропластов табака, при иммунизации с использованием гидроксида алюминия в качестве адъюванта продемонстрировал стопроцентную протективность против заражения LeTx. Уровень экспрессии гРА в листьях табака достигал 14,2% от общей массы растворимого белка (Koza *et al.*, 2005). Также важно отметить, что нативный РА при экспрессии в *B. anthracis* не подвергается гликозилированию. Следовательно, экспрессия в хлоропластах, в которых гликозилирование продуктов также не происходит, позволяет более корректно воспроизводить особенности посттрансляционных модификаций данного белка. При этом, несмотря на преимущества экспрессии гРА в хлоропластах, возможность экспрессии гРА в цитоплазме клеток растений продолжает исследоваться. В 2018 году была опубликована работа, в которой описана экспрессия в томатах с одной кассеты генов одновременно рекомбинантного N-концевого 20 кДа фрагмента РА, рекомбинантных антигенов *Shigella dysenteriae* и *Vibrio cholerae* (Davod *et al.*, 2018).

Альтернативным подходом для экспрессии гРА в растениях является транзистная экспрессия с использованием вектора на основе вируса табачной мозаики. Полученный таким образом в *Nicotiana benthamiana* гРА, названный РА83-FhCMB, при иммунизации в присутствии гидроксида алюминия в качестве адъюванта продемонстрировал протективность на кроликах против *B. anthracis* полностью вирулентного штамма Ames (pXO1+, pXO2+) (Chichester *et al.*, 2013). Данная разработка успешно прошла первую стадию клинических испытаний, продемонстрировав иммуногенность и безопасность на людях (Paolino *et al.*, 2022; идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT02239172). Однако при реализации данного подхода вновь встаёт вопрос о посттрансляционном гликозилировании гРА при экспрессии в растительной клетке. Mamedov с соавторами предложили изящное решение данной проблемы, использовав систему *in vivo* дегликозилирования: гРА

коэкспрессировался в *N. benthamiana* с N-гликозидазой F (Mamedov *et al.*, 2016) или с эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидазой (Mamedov *et al.*, 2017). В результате удалось получить биологически активный белок, способный индуцировать более высокий титр нейтрализующих антител, чем гликозилированная форма rPA.

1.5.2.4.3. Адьюванты, используемые для rPA в составе субъединичных вакцин

В современных лицензированных вакцинах на основе бесклеточных фильтратов культуры *B. anthracis* в качестве адьюванта применяется гель гидроксида алюминия, сульфат калия-алюминия или комбинация геля гидроксида алюминия с CPG7909 – CpG олигодезоксирибонуклеотидами, агонистами TLR-9 (Toll-Like Receptor 9, толл-подобный рецептор 9). Однако было показано, что хранение в присутствии геля гидроксида алюминия приводит к деградации rPA – ключевого компонента этих вакцин – и подавляет его способность индуцировать выработку токсин-нейтрализующих антител (D'Souza *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2012). В связи с этим, поиск новой платформы-носителя и адьюванта для субъединичных вакцин против сибирской язвы – одна из основных задач. В идеальном случае, подобные платформы должны быть не только безопасны для человека и биodeградируемы, но и не оказывать негативного влияния на антигенную специфичность основного белка-иммуногена вакцины. В данном разделе будут рассмотрены некоторые примеры адьювантов, используемых в субъединичных вакцинах на основе rPA, в дополнение к уже упомянутым в предыдущих главах.

В качестве потенциальных адьювантов для rPA рассматриваются вещества и частицы различной природы. Было показано, что Advax™, синтетический полисахардиный адьювант, полученный из дельта инулина, повышает иммуногенность rPA, позволяя получить значимо более высокий титр антител к rPA, чем при использовании rPA с гелем гидроксида алюминия

Anhydrogel[®] в качестве адъюванта (Feinen *et al.*, 2014). Добавление к композиции Advax[™] и rPA мурабутида, синтетического производного мурамилдипептида (иммуностимулирующий гликопептид, низкомолекулярный компонент клеточной стенки бактерий), позволило дополнительно повысить иммуногенность rPA. Иммунизация комбинированным препаратом rPA+ Advax[™]+мурабутид привела к формированию устойчивого В-клеточного иммунного ответа, что обеспечило защиту лабораторных мышей от *B. anthracis* штамма Sterne 7702 (pXO1⁺, pXO2⁻) при аэрозольном заражении спустя 18 месяцев после иммунизации. Титры антител к rPA, наблюдавшиеся после заражения, в 4 раза превышали титры к rPA в группе, иммунизированной rPA с Anhydrogel[®] (Feinen *et al.*, 2014). Для увеличения иммуногенности rPA можно применять другие бактериальные токсины. Использование холерного токсина в качестве адъюванта позволило существенно увеличить иммуногенность rPA при интраназальной вакцинации (Woo *et al.*, 2015). Были проведены исследования возможности использования термолабильного токсина *E. coli* в качестве адъюванта для rPA (Peachman *et al.*, 2012).

Упомянутое выше исследование Peachman с соавторами заслуживает отдельного внимания. В рамках данной работы была произведена оценка на кроликах иммуногенности и протективности пяти вакцинных препаратов, содержащих различные адъюванты:

- 1) rPA с гелем гидроксида алюминия Alhydrogel[®]
- 2) rPA с добавлением термолабильного энтеротоксина *E. coli*
- 3) rPA, упакованный в липосомы, содержащие MPLA
- 4) rPA, упакованный в липосомы, содержащие MPLA, в составе водно-масляной эмульсии
- 5) Частицы бактериофага T4, декорированные rPA (будут подробно рассмотрены далее)

гРА с добавлением термолабильного энтеротоксина *E. coli* вводился кроликам подкожно, остальные препараты – внутримышечно. При трёхкратной иммунизации водно-масляная эмульсия с гРА, упакованным в липосомы, содержащие MPLA, продемонстрировала наиболее высокую иммуногенность, значимо превосходящую иммуногенность гРА, адсорбированного на Alhydrogel®. При трёхкратной иммунизации все препараты, кроме частиц бактериофага Т4, декорированных гРА, обеспечили стопроцентную протективность при заражении кроликов ~100 LD₅₀ полностью вирулентного штамма *B. anthracis*. В группе, иммунизированной декорированными гРА частицами Т4, выжило 2 из 3 особей (Reachman *et al.*, 2012). К сожалению, различные пути введения препарата, маленькие размеры опытных групп и отсутствие контроля в виде гРА без добавления адъюванта не позволяют провести исчерпывающее сравнение эффективности рассмотренных адъювантов. Однако несмотря на это, данное исследование охватывает широкий спектр адъювантов различной природы, демонстрируя разнообразие используемых в настоящее время подходов к созданию вакцин против сибирской язвы. Помимо рассмотренной водно-масляной эмульсии, содержащей гРА, упакованный в липосомы с MLPA, существует множество других разработок на базе эмульсионных препаратов. Так, в 2007 году было показано, что мукозальная вакцинация гРА с использованием водно-масляной наноэмульсии в качестве адъюванта обеспечила протективность против ~1000 LD₅₀ спор *B. anthracis* штамма Ames у морских свинок (Bielinska *et al.*, 2007). Однако стоит отметить, что применение адъювантов подобной природы сопряжено с серьезными местными и системными побочными реакциями, что не удивительно, поскольку индукция сильного локального воспаления – один из механизмов их действия. В связи с этим, при наличии альтернативы стоит избегать использования водно-масляных эмульсий для вакцинации человека (Petrovsky *et al.*, 2015).

К передовым технологиям в области вакцин против сибирской язвы относятся препараты, содержащие в качестве адъюванта не эмульсионные

наночастицы различной природы. Применение наночастиц в качестве адъюванта и платформы-носителя потенциально позволяет не только стимулировать более интенсивную выработку антител к rPA, но и обеспечивать «депонирование» антигена на поверхности/внутри носителя с последующим постепенным его высвобождением в организме реципиента, а также дополнительно стабилизировать склонный к деградации rPA. В исследовании Bento с коллегами упаковка активатора тучных клеток c48/80 в наночастицы хитозана и использование полученных частиц в качестве платформы-адъюванта позволили снизить дозу rPA при интраназальной иммунизации мышей с сохранением титра нейтрализующих антител по сравнению с иммунизацией раствором композиции свободного c48/80 с rPA (Bento *et al.*, 2015). В работе Malik с соавторами были продемонстрированы адъювантные свойства наночастиц аналогичной природы, полученных из триметилхитозана (TMX). Было рассмотрено три варианта вакцинного препарата:

- 1) rPA, упакованный в наночастицы TMX (rPA-TMX)
- 2) rPA-TMX с добавлением CpG олигодезоксирибонуклеотидов
- 3) rPA-TMX с добавлением полирибоинозиновой/полирибоцитидиловой кислоты

Все три препарата при различных способах иммунизации обеспечили индукцию высоких титров антител к rPA, существенно превышающих титры, индуцированные при иммунизации rPA с добавлением CpG или полирибоинозиновой/полирибоцитидиловой кислоты в отсутствие наночастиц. Также все три препарата продемонстрировали протективность в исследовании на лабораторных мышах при заражении спорами *B. anthracis* штамма Ames (Malik *et al.*, 2018). Примечательно, что при иммунизации rPA-TMX преимущественно наблюдалось формирование Th2 иммунного ответа, в то время как в случае двух комплексных препаратов иммунный ответ был смещён в сторону Th1, что не удивительно, поскольку и CpG, и

полирибоинозиновая/полирибозитидиловая кислота являются индукторами Th1-специфичного иммунного ответа. Таким образом, в данном случае наночастицы позволяют усилить эффект гетерологичной адъювантной системы, не изменяя направленность формируемого при использовании данного адъюванта иммунного ответа.

Решением проблемы, связанной с использованием алюмосодержащих адъювантов в AVA и AVP, может стать использование в качестве адъюванта наночастиц гидроксида алюминия с меньшим размером. Такие частицы демонстрируют намного большую эффективность в стимуляции иммунного ответа, чем применяемый в AVA адъювант Alhydrogel[®], который состоит из более крупных частиц геля гидроксида алюминия. Более того, уменьшение размера частиц гидроксида алюминия привело к снижению локальной воспалительной реакции в месте введения препарата (Li *et al.*, 2014). Однако подобные адъюванты ещё только предстоит изучить с точки зрения влияния на стабильность и антигенные свойства rPA, поскольку есть основания полагать, что по этим параметрам они не отличаются стандартных алюмосодержащих адъювантов. Напротив, показанным стабилизирующим эффектом в отношении rPA обладают амфифильные частицы биоразлагаемых полиангидридов, способные выступать в качестве депо антигена и обеспечивать его постепенное высвобождение в окружающую среду (Petersen *et al.*, 2012). Также депонирование антигена с явно выраженной быстрой (>50% за один день) и долгой (до 75% за 28 дней) стадиями высвобождения рекомбинантного домена IV PA было показано для наночастиц из полилактид-ко-гликолида – сополимера полимолочной и гликолевой кислот. Авторы исследования делают акцент на том, что даже однократная иммунизация рекомбинантным доменом IV PA, упакованным в такие наночастицы, приводит к формированию у лабораторных мышей протективного иммунного ответа, способного защитить их при заражении спорами *B. anthracis* штамма Sterne (pXO1⁺, pXO2⁻) (Manish *et al.*, 2013, 2016).

В качестве примера наночастиц вирусной природы можно привести наночастицы бактериофага Т4. rРА был слит с белком НОС (highly antigenic outer capsid protein – внешний белок-антиген капсида бактериофага Т4), после чего НОС⁺ частицы бактериофага Т4 был декорирован химерным белком rРА-НОС. Итоговые конструкции обладали иммуногенными свойствами в отсутствие адъюванта и вызывали активную выработку токсин-нейтрализующих антител против сибирской язвы (Shivachandra *et al.*, 2006). Подобный подход впоследствии был реализован в ряде других исследований (Peachman *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2011). Другим примером являются рекомбинантные частицы вируса Flock House (вирус сверчка, семейство *Nodaviridae*), содержащие в составе белка оболочки РА-связывающий домен рецептора ANTRXR2. Иммунизация композицией данных частиц с rРА, который успешно связывается с РА-связывающим доменом в их составе, привела к формированию высокого титра токсин-нейтрализующих антител у крыс, что обеспечило защиту последних от заражения LeTx. Примечательно, что в отсутствие rРА модифицированные частицы вируса Flock House показали токсин-нейтрализующие свойства *in vitro* благодаря возможности связывать РА в составе токсина и тем самым препятствовать его взаимодействию с клетками. Это позволяет говорить о потенциале использования данных частиц не только в качестве компонента для вакцины против сибирской язвы, но и при терапии заболевания (Manayani *et al.*, 2007).

Широкий спектр свойств, возможность депонирования и стабилизации rРА и возможность различных модификаций делают использование наночастиц в целом и биodeградируемых наночастиц вирусной природы в частности перспективным подходом к разработке адъювантов для нового поколения субъединичных вакцин против сибирской язвы.

1.6. Животные модели, используемые для изучения сибирской язвы

Для настоящего исследования необходимо было выбрать адекватную животную модель для исследования иммуногенности и протективности

вакцинного кандидата против сибирской язвы. В связи с этим, в данном разделе будут рассмотрены животные модели, используемые при изучении данной инфекции.

Выбор модели для изучения сибирской язвы основывается на том, какая из двух основных целей преследуется: исследование патофизиологии инфекции или анализ эффективности превентивных или же терапевтических средств, либо комбинации этих целей. Модельные объекты различаются как по степени выраженности клинической картины заболевания и её сходству с клинической картиной, наблюдаемой у человека, так и по восприимчивости к инфекции. Важно отметить, что у особей видов, более восприимчивых к действию токсина *B. anthracis*, на момент смерти наблюдается менее высокий уровень бактериемии, и наоборот, что позволяет изучать различные проявления инфекции. Основными моделями для изучения сибирской язвы являются мыши, крысы, кролики, морские свинки и приматы (Goossens, 2009).

1.6.1. Мыши

Из-за относительной дешевизны, высокой скорости репродукции, небольших размеров и доступности лабораторные мыши являются самой распространённой моделью для изучения сибирской язвы, особенно на ранних этапах исследований. Препараты сибирской язвы вводятся различными способами: интраназально, внутрибрюшинно, подкожно, интрахеально. Различные линии мышей при этом демонстрируют принципиально разный уровень восприимчивости к сибирской язве (Welkos *et al.*, 1986). Сравнение чувствительности к полностью вирулентному штамму *B. anthracis* Ames для линий мышей A/J, BALB/c, C57BL, и Swiss Webster провели Heine с соавторами (Heine *et al.*, 2007). В результате было показано, что наиболее устойчивой среди исследованных линий мышей является линия BALB/c, а наименее устойчивой – линия A/J.

Важной особенностью является высокая восприимчивость отдельных инбредных линий мышей, дефектных по пятому компоненту комплемента

плазмы крови, к инфекции токсин-продуцирующими неинкапсулированными штаммами (pXO1⁺, pXO2⁻) (например, штамм Sterne), использование которых не является опасным при работе в лабораторных условиях (Welkos *et al.*, 2016). Так, линия A/J обладает высокой чувствительностью к подобным аттенированным штаммам и активно используется в связанных с ними модельных исследованиях (Welkos *et al.*, 1986).

Однако при этом, в отличие от всех остальных животных моделей и человека, мыши характеризуются уникальной восприимчивостью к дефектным по генам токсина инкапсулированным штаммам *B. anthracis* (Heninger *et al.*, 2006). При этом восприимчивость мышей к pXO1⁻, pXO2⁺ штаммам выше, чем к pXO1⁺, pXO2⁻, то есть, именно капсула является основным токсичным для мышей фактором. (Welkos, 1991). Также имеются сведения о том, что при вакцинации отдельных линий мышей РА-содержащие вакцины, адсорбированные на гидроксид алюминия, не демонстрируют протективность против полностью вирулентных штаммов *B. anthracis*. Так, данное явление было продемонстрировано для мышей A/J и CBA/J на полностью вирулентном штамме V1B (Welkos, Friedlander 1988). Также многие этапы развития клинической картины сильно разнятся у мышей и человека.

Таким образом, даже несмотря на то, что определённые линии мышей используются при исследовании вакцинных препаратов с последующим инфицированием аттенированными штаммами *B. anthracis*, мышьяная модель скорее подходит лишь для первичной оценки перспективности вакцинных кандидатов, изучения ранних этапов инфекции, бактериологии, а также для получения первичных антител для методов иммунохимического лабораторного анализа.

1.6.2. Крысы

Наряду с мышами крысы являются не слишком сложной для содержания и воспроизведения животной моделью. Хотя крысы очень устойчивы к спорам

B. anthracis, они крайне восприимчивы к введению токсина сибирской язвы. Быстро наступающий летальный исход при введении LeTx является давно известной особенностью крыс, и исследования 2008 года вновь подтвердили этот факт (Gupta *et al.*, 2008). Данная особенность крыс (например, широко используемой линии Fisher 344) активно используется для оценки эффективности терапевтических средств, таких как моноклональные антитела (Little *et al.*, 1988). Также крысы пригодны для оценки безопасности вакцин против сибирской язвы. Так, на крысах проводились оценки токсичности, безопасности и отсутствия негативного влияния на репродуктивные функции и развитие плода для вакцины AV7909 (в 2023 году лицензирована под маркой CYFENDUS™) (Mylchreest *et al.*, 2020; Rao *et al.*, 2021).

1.6.3. Морские свинки

Морские свинки широко используются для оценки вирулентности штаммов *B. anthracis*, оценки эффективности антигенов и адъювантов в составе вакцин против сибирской язвы и других связанных с сибирской язвой исследований (Bielisnka *et al.*, 2007; Hennin *et al.*, 2023; Garufi *et al.*, 2012; Jeon *et al.*, 2021). Морские свинки являются одобренной моделью для тестирования эффективности AVA согласно рекомендациям управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) (21 CFR 620.23). В частности, исследования эффективности совместно с терапией антибиотиками и анализ необходимого количества вакцинаций для наиболее современной из лицензированных вакцин против сибирской язвы, AV7909 (в 2023 году лицензирована под маркой CYFENDUS™), проводились на морских свинках (Perry *et al.*, 2020; Hennin *et al.*, 2023).

Размер морских свинок достаточен для удобного сбора относительно больших количеств биологических образцов, при этом не слишком велик, таким образом, содержание большого количества особей не доставляет особенных трудностей. Наиболее широко используемой биологической

моделью для исследования сибирской язвы являются морские свинки линии Hartley. Использование других линий морских свинок также возможно. При выборе линии животных важно учитывать, что одна и та же линия может иметь разную восприимчивость к различным штаммам и изолятам *B. anthracis*. Так, для морских свинок линии Hartley были показаны различия в протективности AVA против различных изолятов *B. anthracis* (Fellows *et al.*, 2001). Тем не менее, корректный выбор пары модель-патоген позволяет избежать данной проблемы и добиться при заражении 100% летального исхода в группе отрицательного контроля и подавляющей выживаемости в группе, иммунизированной протективным вакцинным препаратом. Важным преимуществом морских свинок по сравнению с мышами и крысами является адекватная картина протективности при использовании в исследовании полностью вирулентных (pXO1⁺, pXO2⁺) штаммов *B. anthracis*, что крайне важно на более поздних этапах изучения вакцин.

Таким образом, морские свинки прекрасно подходят для исследования вакцинных кандидатов против сибирской язвы, являясь идеальным сочетанием эффективности, цены и удобства в работе.

1.6.4. Кролики

Кролики – крупные и дорогостоящие лабораторные животные, что ограничивает использование их в массовых экспериментах с большими выборками. При этом кролики являются превосходной моделью для оценки эффективности вакцин против сибирской язвы, в частности, вакцин на основе rPA. Так, на самцах белых новозеландских кроликов показан долгосрочный протективный иммунитет против аэрозольного инфицирования полностью вирулентным штаммом *B. anthracis* Ames после вакцинации препаратом, содержащим rPA (Little *et al.*, 2006). В исследовании Fellows с соавторами на белых новозеландских кроликах была показана высокая протективность AVA против вирулентных штаммов *B. anthracis* (Fellows *et al.*, 2001).

1.6.5. Приматы

Исследования на приматах стоят очень дорого. Для испытания вакцин активно используются макаки резус (*Macaca mulatta*), макаки циномолгус (*Macaca flavicularis*) и африканская зеленая обезьяна (*Chlorocebus aethiops*). Поскольку физиологически и иммунологически обезьяны очень похожи на человека, они активно используются для оценки эффективности и безопасности вакцинных и терапевтических средств. Приматы с давних пор являются объективно лучшей моделью для изучения как клинической картины сибирской язвы (Gleiser *et al.*, 1963), так и эффективности вакцинных препаратов, включая AVA (Fellows *et al.*, 2001), а также для изучения наличия корреляции между протективностью и эффективностью выработки антител к РА у вакцинированных особей (Chen *et al.*, 2014).

Таким образом, из рассмотренных вариантов мыши представляются наиболее целесообразной моделью для первичной оценки иммуногенности и получения сывороток крови с целью их дальнейшего использования в иммунохимических методах. В то же время для оценки протективности вакцинных препаратов против сибирской язвы более пригодной моделью представляются морские свинки, а также кролики и приматы, если бюджет исследования позволяет использовать достаточное количество животных для обеспечения адекватного размера выборки. Крысы же являются хорошей моделью только для исследования токсин-нейтрализующих свойств и безопасности того или иного препарата, но не для оценки протективности при полноценной инфекции.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие химические реактивы: бромистый этидий, бромфеноловый синий, Кумасси бриллиантовый синий G-250, β -меркаптоэтанол («Serva», Германия). Акриламид, дитиотреитол, додецилсульфат натрия (ДСН), глицерин, Тритон X-100 («Promega», «Sigma», США). Уксусная кислота («Реахим», Россия). Канамицин («Phytotechnology laboratories», США). Изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид (ИПТГ) («Anatrace», США). Хлорид натрия, хлорид калия, гидрофосфат натрия, гидрофосфат калия («Лаверна», Россия). Бактотриптон, трис, мочевиная («Gerbu», Германия). Бактериальный агар («Difco», США). Гуанидин хлорид, N,N'-метиленабисакриламид, дезоксихолат натрия, ацетат натрия, водонасыщенный фенол, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин («PanReas AppliChem», Испания). Агароза, полный и неполный адъюванты Фрейнда, сухое молоко («Sigma-Aldrich», США). Твин-20 («Хеликон», Россия). Ni^{2+} -нитрилотриацетатная агароза (Ni-NTA-агароза) («QIAGEN», Германия). Ампициллин («MP Biomedicals», США). Формвар («SPI-Chem», США). Хемилюменисцентный субстрат Amersham™ ECL™ для пероксидазы хрена, мембрана Amersham™ Hybond® P из поливинилиденфторида (ПВДФ) («GE Healthcare — Life Sciences», США). Смесь амфолинов («Bio-RAD», США).

Для приготовления рабочих растворов использовали деионизированную воду, очищенную с применением ионообменных установок. Для отдельных реакций и экспериментов использовалась деионизированная вода, дополнительно очищенная системой Milli-Q (система Simplicity UV, «Merck Millipore», США) (далее - Milli-Q).

Для анестезии лабораторных мышей использовали препараты Золетил-100 («Valdefarm», Франция) и Ксила («Интерхеми веркен «Де Аделаар» Эести АС», Эстония).

В работе использовали антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с флуорофором Alexa 546 (C = 2 мг/мл, «Invitrogen»,

США) или с пероксидазой хрена ($C = 0,8$ мг/мл, «Jackson ImmunoResearch Inc.», США), антитела против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с флуорофором CFTM 488A ($C = 2$ мг/мл, «Merck», США) или с пероксидазой хрена ($C = 1,3$ мг/мл, «HyTest», Россия), а также антитела против иммуноглобулинов морской свинки, конъюгированные с пероксидазой хрена ($C = 0,8$ мг/мл, «Jackson ImmunoResearch Inc.», США). Также в исследовании использованы нейтрализующие моноклональные антитела к РА, которые были любезно предоставлены нашими коллегами к.х.н. Т. К. Алиевым и А. А. Паниной (Государственный научный центр ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН).

В работе использовали буферы для эндонуклеазной рестрикции Fast Digest и Fast Digest Green («Thermo Scientific», США), буферы для эндонуклеазной рестрикции White и Orange («SibEnzyme», Россия), буфер для проведения ПЦР Encyclo и смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) («Евроген», Россия), буфер для реакций лигирования и аденозинтрифосфат (АТФ) («Fermentas», Литва). В работе использовали следующие ферменты: Т4-ДНК-лигаза («Fermentas», Литва); эндонуклеазы рестрикции SphI, PstI и HindIII («SibEnzyme», Россия), эндонуклеазы рестрикции Fast Digest BamHI, Fast Digest PstI и Fast Digest HindIII («Thermo Scientific», США), смесь полимераз Encyclo («Евроген», Россия).

2.1. Получение сферических частиц (СЧ) из вируса табачной мозаики (ВТМ)

Полипропиленовые пробирки объёмом 1,5 мл («Eppendorff», Германия), содержащие 1 мл исходного раствора ВТМ с концентрацией 2 мг/мл, инкубировали в термостате Термит («ДНК-Технология», Россия) при $+98$ °C в течение пяти минут. Раствор перемешивали на Vortex. Затем охлаждали при -20 °C в течение 15 минут и снова перемешивали на Vortex. После чего проводили повторную инкубацию при $+98$ °C в течение двух минут.

2.2. Электрофоретический анализ белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях

Электрофорез проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970) в приборе Mini-PROTEAN Tetra System («Bio-RAD», США), в пластинах ПААГ, состоящих из разделяющего и концентрирующего гелей. Размер пластин составлял 100x73x1 мм. Разделяющий гель (нижний) имел линейный градиент концентрации акриламида от 8% до 20% и N,N'-метиленбисакриламида от 0,08% до 0,2%, а также содержал 0,125М трис-HCl (pH 8,8) и 0,1% ДСН. Концентрирующий гель (верхний) содержал 3,8% акриламида, 0,1% N,N'-метиленбисакриламида, 0,1М трис-HCl (pH 6,8), а также 0,09% ДСН. Для нанесения пробы на ПААГ использовали буфер, содержащий глицерин (10%), додецилсульфат натрия (ДСН) (1%), β-меркаптоэтанол (100 мМ), 50 мМ трис-HCl (pH 6,8), бромфеноловый синий (0,0025%). После смешивания с буфером пробу белка нагревали в течение пяти минут при +96 °С.

Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (25мМ трис, 0,192М глицин, 0,1% ДСН; pH 8,4) в течение часа. Напряжение поддерживали равным 200 В. Гели окрашивали Кумасси G-250 в течение 40 минут. При электрофоретическом анализе белков, меченых ФИТЦ или РИТЦ, детекция флуоресцентного сигнала проводилась до окрашивания гелей. Для удобства интерпретации результатов в одну из лунок геля наносили пробу из набора маркерных белков (2-250 кДа, «Bio-Rad», США; 10-250 кДа, 10-260 кДа, 10-170 кДа, «Thermo Fisher Scientific», США). Изображения гелей получали с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc XRS+ («BioRad», США).

2.3. Получение плазмид, кодирующих рекомбинантные антигены сибирской язвы

Для получения экспрессионных конструкций аминокислотные последовательности rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m были подвергнуты «обратной трансляции» *in silico*. Полученные нуклеотидные

последовательности были оптимизированы с учетом частоты встречаемости кодонов в *Escherichia coli*. Процедуру оптимизации последовательностей проводили с использованием программы EditSeq (набор программного обеспечения Lasergene 11, «DNASTAR», США) и алгоритма GenScript (<https://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table>). При разработке конструкций учитывалась частота встречаемости кодонов в *E. coli*, а также исключалось использование последовательностей, потенциально обладающих регуляторными свойствами. Последовательности rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m были клонированы в вектор pQE-30 по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Конструкции pQE-30-rPA(1+2)m и pQE-30-rPA(3+4)m были получены компанией «Евроген» (Россия), с их использованием в настоящей работе была получена конструкция pQE-30-rPA83m. Полученные нуклеотидные последовательности rPA(1+2)m, rPA(3+4)m и rPA83m приведены ниже.

rPA(1+2)m

ATGA G A G G A T C G C A T C A C C A T C A C C A T C A C G G A T C C G A A G T G A A A C A G G A A A A C C G T C T G
 C T G A A C G A A A G C G A A T C C A G C T C T C A G G G C C T G C T G G G C T A T T A C T T C A G C G A T C T G A A C T T
 T C A G G C T C C G A T G G T T G T G A C C A G C T C T A C C A C C G G T G A T C T G A G C A T T C C G A G C T C T G A A C
 T G G A A A A C A T T C C G A G C G A A A A C C A G T A C T T T C A G T C T G C G A T T T G G T C T G G C T T C A T C A A A
 G T G A A A A A A T C T G A T G A A T A C A C T T T G C G A C C T C T G C T G A C A A C C A T G T G A C C A T G T G G G T
 G G A C G A T C A G G A A G T G A T C A A C A A A G C G A G C A A C A G C A A C A A A A T T C G T C T G G A A A A A G G
 T C G T C T G T A T C A G A T C A A A A T T C A G T A T C A G C G T G A A A A T C C G A C C G A A A A A G G T C T G G A C T
 T C A A A C T G T A T T G G A C C G A T A G C C A G A A C A A A A A G A A G T G A T T A G C A G C G A C A A C C T G C A
 G C T G C C G G A A C T G A A A C A G A A A T C C A G C C A G T C T A G C A A C A A A G A A T C T A C C A G C G C T G G T
 C C G A C C G T T C C G G A T C G T G A T A A C G A T G G C A T T C C G G A T A G C C T G G A A G T G G A A G G C T A C A
 C C G T G G A T G T G A A A A A C A A A C G C A C C T T T C T G T C T C C G T G G A T C A G C A A C A T T C A T G A A A A G
 A A A G G C C T G A C C A A A T A C A A A A G C T C T C C G G A A A A A T G G A G C A C T G C G T C T G A T C C G T A T A
 G C G A T T T T G A A A A A G T G A C C G G T C G C A T T G A C A A A A A C G T G A G C C C G G A A G C A C G T C A T C C
 G C T G G T T G C A G C G T A T C C G A T T G T G C A T G T G G A C A T G G A A A A C A T C A T T C T G A G C A A A A A C G
 A A G A T C A G A G C A C C C A G A A C A C C G A T T C T C A G A C C C G T A C C A T T A G C A A A A A C A C C T C T A C
 C T C T C G C A C C C A C A C C A G C G A A G T G C A T G G C A A C G C G G A A G T G C A T G C G T C T G A C A T T G G T
 G G C A G C G T G A G C G C A G G C T T T A G C A A C A G C A A C T C C A G C A C C G T G G C G A T T G A T C A T T C T C T
 G A G C C T G G C A G G T G A A C G C A C C T G G G C T G A A A C C A T G G G T C T G A A C A C A G C A G A T A C A G C T
 C G T C T G A A C G C T A A C A T C C G C T A T G T G A A C A C C G G C A C A G C A C C G A T C T A C A A C G T T C T G C C
 G A C C A C C A G C C T G G T G C T G G G C A A A A A C C A G A C C C T G G C G A C C A T C A A A G C G A A A G A A A A C
 C A G C T G T C T C A G A T T C T G G C A C C G A A C A A C T A C T A T C C G A G C A A A A A C C T G G C T C C G A T T G C
 G C T G A A C G C A C A G G A T G A C T T C T A G C A C C C C G A T C A C C A T G A A C T A C A A C C A G T T T C T G G
 A A C T G G A A A A A A C C A A A C A G C T G C G T C T G G A T A C C G A T C A G G T G T A T G G C A A C A T T G C G A C
 C T A C A A C T T T G A A A A C G G T C G C G T T C G T G T G G A T A C C G G C A G C A A C T G G T C T G A A G T G C T G C
 C G C A G A T T C A G G A A A C C A A A G C T T A A T T A G

rPA(3+4)m

*ATG*AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCACCGCTCGTATCATCTTCAACGGTA
AAGACCTGAACCTGGTTGAACGTCGTATCGCTGCTGTTAACCCGAGTGACCCGCTGGAAACC
ACCAAACCGGACATGACCTGAAAGAAGCACTGAAAATCGCTTTCGGTTTCAACGAACCGA
ACGGTAACCTGCACTACCAGGGTAAAGACATCACCGAATTCGACTTCAACTTCGACCAGCA
GACCTCTCAGAACATCAAAAACAGCTGGCTGAACTGAACGCTACCAACATCTACACCGTTC
TGGACAAAATCAAACCTGAACGCTAAAATGAACATCCTGATCCGTGACAAACGTTTCCACTAC
GACCGTAACAACATCGCTGTTGGTGCTGACGAATCTGTTGTTAAAGAAGCTCACCGTGAAGT
TATCAACTCTTCTACCGAAGGTCTGCTGCTGAACATCGACAAAGACATCCGTAAAATCCTGT
CTGGTTACATTGTTGAAATCGAAGACACCGAAGGTCTGAAAGAAGTTATCAACGACCGTTAC
GACATGCTGAACATCTCTTCTCTGCGTCAGGACGGTAAACCTTCATCGACTTCAAAAAATA
CAACGACAAACTGCCGCTGTACATCTCTAACCCGAACCTACAAAGTTAACGTTTACGCTGTTA
CCAAAGAAAACACCATCATCAATCCGTCTGAACAGGGTGACACCTCTACCCAGGGTATCAA
GAAAATCCTGATCTTCTCCAAAAAAGGTTACGAAATCGGTAAAGCTTAATTAG

rPA83m

*ATG*AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGAAGTGAAACAGGAAAACCGTCTG
CTGAACGAAAGCGAATCCAGCTCTCAGGGCCTGCTGGGCTATTACTTCAGCGATCTGAACTT
TCAGGCTCCGATGGTTGTGACCAGCTCTACCACCGGTGATCTGAGCATTCCGAGCTCTGAAC
TGGAACAAATTCCGAGCGAAAACAGTACTTTCAGTCTGCGATTTGGTCTGGCTTCATCAAA
GTGAAAAAATCTGATGAATACACCTTTGCGACCTCTGCTGACAACCATGTGACCATGTGGGT
GGACGATCAGGAAGTGATCAACAAAGCGAGCAACAGCAACAAAATTCGTCTGGAAAAAGG
TCGTCTGTATCAGATCAAAATTCAGTATCAGCGTGAAAATCCGACCGAAAAAGGTCTGGACT
TCAAACGTATTGGACCGATAGCCAGAACAAAAAAGAAGTGATTAGCAGCGACAACCTGCA
GCTGCCGGAACCTGAAACAGAAATCCAGCCAGTCTAGCAACAAAGAATCTACCAGCGCTGGT
CCGACCGTTCCGGATCGTGATAACGATGGCATTCCGGATAGCCTGGAAGTGGAAGGCTACA
CCGTGGATGTGAAAAACAAACGCACCTTTCTGTCTCCGTGGATCAGCAACATTCATGAAAAG
AAAGGCCTGACCAAATACAAAAGCTCTCCGGAATAATGGAGCACTGCGTCTGATCCGTATA
GCGATTTTGAAAAAGTGACCGGTGCGATTGACAAAAACGTGAGCCCGGAAGCACGTCATCC
GCTGGTTGCAGCGTATCCGATTGTGCATGTGGACATGGAAAACATCATTCTGAGCAAAAACG
AAGATCAGAGCACCCAGAACACCGATTCTCAGACCCGTACCATTAGCAAAAACACCTCTAC
CTCTCGCACCCACACCAGCGAAGTGATGGCAACGCGGAAGTGCATGCGTCTGACATTGGT
GGCAGCGTGAGCGCAGGCTTTAGCAACAGCAACTCCAGCACCGTGCGGATTGATCATTCTCT
GAGCCTGGCAGGTGAACGCACCTGGGCTGAAACCATGGGTCTGAACACAGCAGATACAGCT
CGTCTGAACGCTAACATCCGCTATGTGAACACCGGCACAGCACCGATCTACAACGTTCTGCC
GACCACCAGCCTGGTGCTGGGCAAAAACAGACCCTGGCGACCATCAAAGCGAAAGAAAAC
CAGCTGTCTCAGATTCTGGCACCGAACAACTACTATCCGAGCAAAAACCTGGCTCCGATTGC
GCTGAACGCACAGGATGACTTCTTAGCACCCCGATCACCATGAACTACAACCAGTTTCTGG
AACTGGAAAAAACCAAACAGCTGCGTCTGGATACCGATCAGGTGTATGGCAACATTGCGAC
CTACAACCTTTGAAAACGGTCGCGTTCGTGTGGATACCGGCAGCAACTGGTCTGAAGTGCTGC
CGCAGATTCAGGAAACCACCGCTCGTATCATCTTCAACGGTAAAGACCTGAACCTGGTTGAA
CGTCGTATCGCTGCTGTTAACCCGAGTGACCCGCTGGAAACCACCAAACCGGACATGACCCT
GAAAGAAGCACTGAAAATCGCTTTCGGTTTCAACGAACCGAACGGTAACCTGCACTACCAG
GGTAAAGACATCACCGAATTCGACTTCAACTTCGACCAGCAGACCTCTCAGAACATCAAAA
ACCAGCTGGCTGAACTGAACGCTACCAACATCTACACCGTTCTGGACAAAATCAAACCTGAAC
GCTAAAATGAACATCCTGATCCGTGACAAACGTTTCCACTACGACCGTAACAACATCGCTGT
TGGTGCTGACGAATCTGTTGTTAAAGAAGCTCACCGTGAAGTTATCAACTCTTCTACCGAAG
GTCTGCTGCTGAACATCGACAAAGACATCCGTAAAATCCTGTCTGGTTACATTGTTGAAATC
GAAGACACCGAAGGTCTGAAAGAAGTTATCAACGACCGTTACGACATGCTGAACATCTCTTC
TCTGCGTCAGGACGGTAAACCTTCATCGACTTCAAAAAATACAACGACAAACTGCCGCTGT
ACATCTCTAACCCGAACCTACAAAGTTAACGTTTACGCTGTTACCAAAGAAAACACCATCATC
AATCCGTCTGAACAGGGTGACACCTCTACCCAGGGTATCAAGAAAATCCTGATCTTCTCCAA
AAAAGGTTACGAAATCGGTAAAGCTTAATTAG

Старт-кодоны и стоп-кодоны выделены жирным курсивом. Последовательности, кодирующие гексагистидиновую метку, выделены жирным. Сайты рестрикции BamHI и HindIII на 5'- и 3'-концах смысловых участков последовательности, соответственно, подчёркнуты. Сайты рестрикции SphI и PstI, использованные для получения плазмиды pQE-30-rPA83m в **Разделе 2.4**, выделены жирным и подчёркнуты.

2.4. Получение конструкции pQE-30-rPA83m

Получение конструкции pQE-30-rPA83m было проведено на основе конструкций pQE-30-rPA(1+2)m и pQE-30-rPA(3+4)m и включало следующие этапы:

- 1) Получение с помощью ПЦР фрагментов ДНК, соответствующих 3'-концу смыслового участка гена rPA(1+2)m (продукт назван ПЦР1), или 5'-концу смыслового участка гена rPA(3+4)m с добавлением на 5'-конце 20 п.н., соответствующих двадцати 3'-концевым п.н. ПЦР1 (ПЦР2). Разделение фрагментов ДНК в 1% агарозном геле и их выделение из геля.
- 2) Получение на основе фрагментов ПЦР1 и ПЦР2 с помощью ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов фрагмента ДНК, соответствующего 3'-концу смыслового участка гена rPA(1+2)m на 5'-конце и 5'-концу смыслового участка гена rPA(3+4)m на 3'-конце (ПЦР3). Фенольное переосаждение ДНК в ПЦР-смеси, разделение фрагментов ДНК в 1% агарозном геле и их выделение из геля.
- 3) Препаративная рестрикция векторов pQE-30-rPA(1+2)m и pQE-30-rPA(3+4)m, разделение фрагментов ДНК в 1% агарозном геле и их выделение из геля.
- 4) Лигирование в одну стадию полученных в пункте 3 фрагментов pQE-30-rPA(1+2)m и pQE-30-rPA(3+4)m, а также фрагмента ПЦР3 с получением итоговой конструкции pQE-30-rPA83m.

- 5) Трансформация компетентных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue лигазной смесью, полученной в пункте 4, накопление трансформированной культуры и выделение из неё плазмидной ДНК pQE-30-rPA83m.
- 6) Аналитическая рестрикция полученной конструкции pQE-30-rPA83m.

2.4.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Дизайн праймеров, необходимых для проведения ПЦР, осуществляли вручную, используя нуклеотидные последовательности pQE-30-rPA(1+2)m и pQE-30-rPA(3+4)m. Температуру отжига праймеров определяли по формуле $t^{\circ}\text{C} = 4(\text{G}+\text{C})+2(\text{A}+\text{T})-12$. Анализ специфичности праймеров к соответствующим участкам ДНК и возможности их неспецифического отжига проверяли с использованием программы Vector NTI Advance[®] 11.0 («Thermo Fisher Scientific», США). Синтез олигонуклеотидов был осуществлён компанией «Евроген» (Россия). Последовательности праймеров, использованных в работе, представлены в **Таблице 2**.

Таблица 2. Названия и нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для проведения ПЦР

Название	Нуклеотидная последовательность
SphIFwd	5'-ACGCGGAAGTGCATGCGTCT-3'
rPA(1+2)mRev	5'- <u>GGTTTCCTGAATCTGCGGCA</u> -3'
rPA(3+4)mFwd	5'- <u>TGCCGCAGATTCAGGAAACCACCGCTCGTATCATCTTCAAC</u> -3'
PstIRev	5'-CTGGTACTGCAGGTTACCGT-3'

Праймеры SphIFwd и rPA(1+2)mRev комплементарны матрице pQE-30-rPA(1+2)m, а праймеры rPA(3+4)mFwd и PstIRev – матрице pQE-30-rPA(3+4)m. Праймеры SphIFwd и PstIRev комплементарны участкам матрицы, содержащим сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции SphI и PstI, соответственно. Праймер rPA3+4Fwd помимо участка, комплементарного 5'-концевому участку смысловой последовательности rPA(3+4)m, содержит в своем составе последовательность длиной 20 нуклеотидов, комплементарную

3'-концевому смысловой последовательности rPA(1+2)m (эти 20 нуклеотидов подчеркнуты в **Таблице 2**).

Смешивание всех компонентов реакции осуществляли во льду. Установку пробирок, содержащих ПЦР-смесь, в термоциклер производили после набора прибором температуры первичной денатурации (+94 °C). Для предотвращения испарения поверх ПЦР-смеси наслаивали равный объем минерального масла. Амплификацию проводили в термоциклере Терцик («ДНК-технология», Россия).

2.4.1.1. Получение ДНК-фрагментов, соответствующих 3'-концевой части гена rPA(1+2)m и 5'-концевой части гена rPA(3+4)m

Для получения ДНК-фрагментов, соответствующих 3'-концевой части гена rPA(1+2)m и 5'-концевой части гена rPA(3+4)m, были проведены реакции ПЦР1 и ПЦР2 на матрицах векторов pQE-30-rPA(1+2)m и pQE-30-rPA(3+4)m соответственно. Для ПЦР1 использовали прямой праймер SphIFwd и обратный праймер rPA(1+2)mRev. Для ПЦР2 использовали прямой праймер rPA(3+4)mFwd и обратный праймер PstIRev. Схема и условия проведения каждой из стадий представлены в **Таблице 3**.

Таблица 3. Схема последовательности этапов и условий проведения ПЦР1 и ПЦР2

Стадия	Температура	Время	Количество циклов
Первичная денатурация	+94 °C	3 мин	-
Денатурация	+94 °C	30 сек	30
Отжиг праймеров	+50 °C	30 сек	
Элонгация	+72 °C	45 сек	
Хранение	+10 °C	-	-

ПЦР проводили в объеме 50 мкл, содержащем 180 нг соответствующей ДНК-матрицы, буфер Encyclo («Евроген», Россия), смесь дНТФ в концентрации 0,2мМ каждого дНТФ, смесь полимераз Encyclo («Евроген», Россия) и по 20 пкмоль прямого и обратного праймеров.

2.4.1.2. ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов

ПЦР-смесь объемом 50 мкл содержала эквимольные количества ДНК-продуктов ПЦР1 (195 нг, длина продукта 530 п.н.) и ПЦР2 (70 нг, длина продукта 188 п.н.), имеющих комплементарные участки длиной 20 нуклеотидов, а также буфер Encyclo («Евроген», Россия), смесь дНТФ (0,2мМ каждого) и смесь полимераз Encyclo («Евроген», Россия).

ПЦР проводилась в две стадии. На первой стадии происходило достраивание комплементарных участков ДНК в сторону 3'-концов от перекрывающегося фрагмента. На второй стадии в ПЦР-смесь добавляли по 20 пмоль концевых праймеров SphIFwd и PstIRev, благодаря чему проводилась амплификация достроенного продукта. Схема и условия проведения каждой из стадий представлены в **Таблице 4**.

Таблица 4. Схема и условия проведения ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов

Стадия		Температура	Время	Количество циклов
Первичная денатурация		+94 °C	3 мин	-
Первая стадия ПЦР	Денатурация	+94 °C	30 сек	5
	Отжиг праймеров	+50 °C	30 сек	
	Элонгация	+72 °C	45 сек	
Вторая стадия ПЦР	Денатурация	+94 °C	30 сек	30
	Отжиг праймеров	+50 °C	30 сек	
	Элонгация	+72 °C	45 сек	
Дополнительная стадия элонгации		+72 °C	3 мин	-
Хранение		+4 °C	-	-

Итоговый продукт, полученный в результате ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов, был назван ПЦР3.

2.4.2. Фенольное переосаждение ДНК

Объем ПЦР-смеси доводили до 200 мкл водой Milli-Q, затем добавляли равный объем водонасыщенного фенола. Полученный раствор перемешивали три минуты на Vortex, затем центрифугировали три минуты при 13600 об/мин при комнатной температуре (центрифуга Eppendorf Minispin, «Eppendorf», Германия). После центрифугирования отбирали водную фазу, к ней добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия и 4 объема 96% этилового спирта. Затем смесь инкубировали в течение 30 минут при -70 °С, после чего центрифугировали 10 минут при 13600 об/мин при +4 °С (центрифуга Eppendorf 5415 D, «Eppendorf», Германия). Осадок после центрифугирования промывали 600 мкл 70% спирта и центрифугировали пять минут при 13600 об/мин при +4 °С (центрифуга Eppendorf 5415 D, «Eppendorf», Германия). После этого тщательно отбирали спирт, осадок высушивали при +55 °С до полного испарения спирта. Высушенный осадок растворяли в 20 мкл Milli-Q при +55 °С.

2.4.3. Электрофоретический анализ и разделение ДНК в 1% агарозном геле

Для электрофоретического анализа ДНК переводили в раствор, содержащий 1% глицерина и 0,0025% бромфенолового синего. Пробы наносили в лунки 1% агарозного геля, приготовленного в буфере TAE (40 мМ трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, 0,5 мг/л бромистого этидия; pH 8,0). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 70 В в буфере TAE. Использовали маркеры длины ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix («Thermo Fisher Scientific», США). Изображения гелей получали при ультрафиолетовом освещении с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc XRS+ («BioRad», США).

2.4.4. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Участок агарозного геля, содержащий нужный фрагмент ДНК, вырезали из геля при освещении УФ ($\lambda = 365$ нм). Для выделения фрагментов ДНК из

агарозного геля использовали набор «Gel Extraction Kit» фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США) согласно протоколу.

2.4.5. Препаративная рестрикция ДНК

Рестрикцию вектора pQE-30-rPA(1+2)m проводили в 30 мкл рестрикционной смеси, содержащей однократный White буфер («SibEnzyme», Россия), по 20 единиц эндонуклеаз рестрикции SphI и HindIII («SibEnzyme», Россия) и 920 нг ДНК pQE-30-rPA(1+2)m.

Рестрикцию вектора pQE-30-rPA(3+4)m проводили в 30 мкл рестрикционной смеси, содержащей однократный Fast Digest буфер («Thermo Fisher Scientific», США), по 1 мкл эндонуклеаз рестрикции Fast Digest PstI и Fast Digest HindIII («Thermo Fisher Scientific», США) и 1050 нг ДНК pQE-30-rPA(3+4)m.

Рестрикцию продукта ПЦР3, полученного в результате проведения ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов, проводили в 30 мкл рестрикционной смеси, содержащей однократный Orange буфер («SibEnzyme», Россия), по 20 единиц эндонуклеаз рестрикции SphI и PstI («SibEnzyme», Россия) и 726 нг ДНК ПЦР.

Во всех случаях рестрикционную смесь инкубировали при +37 °С в течение 16 часов.

2.4.6. Лигирование фрагментов ДНК

Лигирование проводили в объеме 50 мкл, содержащем однократный буфер для Т4-ДНК лигазы («Fermentas», Литва), 0,2мМ АТФ, 1 единицу Т4-ДНК лигазы («Fermentas», Литва), а также три фрагмента ДНК:

- 1) Вставка ПЦР3 (688 п.н.), подвергнутая рестрикции по сайтам SphI и PstI, 153 нг
- 2) Фрагмент вектора pQE30-rPA(3+4)m (589 п.н., от сайта PstI до сайта HindIII), 126 нг

3) Фрагмент вектора pQE30-rPA(1+2)m (4340 п.н., от сайта BamHI до сайта SphI), 306 нг

Смесь инкубировали в течение 1 часа при температуре +14 °С затем ещё 1 час при температуре +25 °С.

2.4.7. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток

Для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli* штамма XL1-Blue использовали «Набор для выделения плазмидной ДНК» фирмы «Евроген» (Россия) согласно протоколу.

2.4.8. Аналитическая рестрикция ДНК

Аналитическую рестрикцию плазмидной ДНК, выделенной из клонов клеток *E. coli* штамма XL1-Blue, полученных после трансформации лигазной смесью, проводили по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Рестрикцию проводили в объеме 15 мкл, содержащем однократный буфер Fast Digest Green («Thermo Fisher Scientific», США), по 0,5 мкл эндонуклеаз рестрикции Fast Digest BamHI и Fast Digest HindIII («Thermo Fisher Scientific», США) и 150-500 нг плазмидной ДНК соответствующего клона. Смесь инкубировали в течение 20 минут при температуре +37 °С.

2.5. Трансформация бактериальных клеток

50-100 мкг плазмидной ДНК, кодирующей белок интереса, или 20 мкл лигазной смеси добавляли к культуре компетентных клеток *Escherichia coli* (штамм SG13009 при экспрессии рекомбинантных белков, штамм XL1-Blue для накопления целевой плазмиды). Затем инкубировали культуру при 0 °С в течение 20 минут. После этого культуру нагревали 90 секунд при +42 °С, а затем инкубировали во льду пять минут. Далее к культуре добавляли четыре объёма среды 2xYT (1,6% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl) и инкубировали 45 минут при +37 °С. Суспензию клеток высевали на чашку Петри со средой YT с агаром (0,8% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,25% NaCl, 1,5% агар) с селективными антибиотиками - 100 мкг/мл ампициллин (как для SG13009, так и для XL1-Blue), 50 мкг/мл канамицин (только для SG-

13009). Клетки на чашках Петри выращивали в течение ночи в термостате при +37 °C.

2.6. Экспрессия рекомбинантного белка

Полученные в результате трансформации клоны *E. coli* штамма SG13009, содержащие плазмиду с нуклеотидной последовательностью белка интереса, выращивали в течение ночи в 3 мл среды 2xYT, содержащей селективные антибиотики (100 мкг/мл ампицилин, 50 мкг/мл канамицин) в термостатическом шейкере при +37 °C и 180 об/мин.

6 мл полученной ночной культуры добавляли к 200 мл свежей среды 2xYT с селективными антибиотиками (конечная концентрация антибиотиков: 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина) и выращивали три часа в термостатическом шейкере при +37 °C и 180 об/мин. После этого добавляли 400 мкл индуктора экспрессии целевого белка ИПТГ (до концентрации 2мМ) и растили культуру при +37 °C в течение 4 часов (rPA(3+4)m и rPA(1+2)m) или при +20 °C в течение 6 часов (rPA83m). Затем культуру центрифугировали 10 минут при +4 °C и 5000 об/мин (ротор JA-14, центрифуга Avanti JXN-30 «Beckman», США). Осадок замораживали в центрифужной пробирке при -20 °C.

2.7. Хроматографическая очистка His₆-рекомбинантного белка на Ni²⁺-нитрилотриацетатной агарозе (Ni-NTA-агарозе)

Хроматографию His₆-белка проводили по методике, основанной на протоколе «The QIAexpressionist» («QIAGEN», Германия) с использованием ряда изменений. Осадок клеток, полученный в предыдущем пункте, лизировали в 5 мл буфера А с добавлением дезоксихолата натрия (6М гуанидин-HCl; 0,1М NaH₂PO₄; 0,01М трис-HCl; дезоксихолат натрия 0,2%; pH 8,0) на орбитальном шейкере PSU-10i («Biosan», Латвия) в течение одного-двух часов при комнатной температуре и 160-170 об/мин. Лизат клеток центрифугировали 15 минут при +4 °C и 9000 об/мин (ротор JA-14, центрифуга Avanti JXN-30 «Beckman», США).

Супернатант, собранный после лизирования клеток, наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (1,6x1,8 см, $V_{\text{колонки}} = 17$ мл, $V_{\text{сорбента}} = 1,6$ мл). Снизу к колонке присоединяли шланг, соединенный с насосом MINIPULS3 («Gilson», США), прогонявшим жидкость из колонки через шланг. Сорбцию белка проводили в течение часа путем закиливания колонки. Затем колонку последовательно промывали следующими буферами: 1) 10 мл буфера А с дезоксихолатом натрия, 2) 10 мл буфера А без дезоксихолата натрия (6М гуанидин хлорид; 0,1М NaH_2PO_4 ; 0,01М трис- HCl pH 8,0), 3) 15 мл буфера В (8М мочеина, 0,1М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01М трис- HCl ; pH 8,0), 4) 30 мл буфера С (аналогичный состав; pH 6,3). Затем отсоединяли шланг, одновременно начиная собирать фракции по 2 мл, при этом последовательно добавляя 2 мл буфера D (аналогичный состав; pH 5,9) и 2 мл буфера Е (аналогичный состав; pH 4,5). Одновременно с добавлением буфера Е сбор фракций приостанавливали и проводили инкубацию в течение 20 минут. Затем из колонки продолжали отбирать фракции по 2 мл, добавляя при этом ещё 2 мл буфера Е и 2 мл буфера F (8М мочеина, 0,2М уксусная кислота). После добавления буфера F проводили ещё одну инкубацию в течение 10 минут. Остатки белка смывали, добавляя ещё 4 мл буфера F и продолжая собирать фракции по 2 мл. Затем колонку уравнивали буфером В до значения pH 8,0 и хранили в буфере А. Состав собранных фракций анализировали методом электрофоретического анализа в 8-20% ДСН-ПААГ.

2.8. Диализ

Для перевода полученных фракций белка в водный раствор использовали метод диализа. Диализ проводили против деионизированной воды Milli-Q в диализных мешках с размером пор 12-14 кДа и диаметром 6 мм или 16 мм («Servapor», Германия) в течение четырёх часов со сменой воды каждый час.

2.9. Определение концентрации белка

Концентрацию рекомбинантных белков определяли методом УФ спектрофотометрии (спектрофотометр U-2900 UV-VIS, «Hitachi», Япония) при длине волны 280 нм (коэффициент экстинкции $E_{280\text{nm}}$ 0,1% составлял 0,954 для rPA83m, 1,164 для rPA(1+2)m и 0,496 для rPA(3+4)m) или 205 нм (в случае белков, меченых ФИТЦ или РИТЦ, $E_{205\text{nm}}$ составляет 31 для всех белков). $E_{280\text{nm}}$ 0,1% для рекомбинантных белков рассчитывали с использованием онлайн-сервиса PROTPARAM (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://expasy.org/>).

2.10. Иммунизация лабораторных мышей

Для получения поликлональной мышинной сыворотки к рекомбинантным белкам проводили трёхкратную иммунизацию белых беспородных мышей с промежутком в две недели. Препарат вводили интраперитонеально, проба объёмом 100 мкл была приготовлена в PBS (7мМ Na_2HPO_4 ; 1,5мМ K_2HPO_4 ; 137мМ NaCl ; 2,7мМ KCl ; pH 7,4) и содержала 10 мкг белка интереса, а также равный объем адьюванта Фрейнда. Для первой иммунизации использовался полный адьювант Фрейнда, для двух последующих - неполный адьювант Фрейнда. Через две недели после третьей иммунизации проводили отбор крови. Непосредственно перед отбором крови животных подвергали анестезии. Для этого каждой мыши внутривентриально вводили смесь препаратов Золетил-100 и Ксилазин объёмом 300 мкл в PBS. Действующими веществами препарата Золетил-100 являются тилетамина гидрохлорид и золазепам гидрохлорид, концентрация обоих веществ в конечном растворе для анестезии составляла 1,5 мг/мл. Действующим веществом препарата Ксилазин является ксилазина гидрохлорид, его концентрация в конечном растворе для анестезии составляла 1,2 мг/мл. Эвтаназию животных проводили методом дислокации шейного позвонка в соответствии с нормами биоэтики. Образцы крови оставляли на два часа при комнатной температуре, затем инкубировали ночь при +4 °C.

2.11. Получение сыворотки крови

Пробирки с образцами крови центрифугировали 4 минуты при комнатной температуре при 14500 об/мин (центрифуга Eppendorf Minispin, «Eppendorf», Германия). Супернатант отбирали в новые пробирки и центрифугировали 5 секунд при комнатной температуре при 14500 об/мин (центрифуга Eppendorf Minispin, «Eppendorf», Германия). Супернатант переносили в новые пробирки. Полученную сыворотку хранили при +4 °C.

2.12. Вестерн-блот анализ

Для вестерн-блот анализа предварительно проводили электрофорез в градиентном ДСН-ПААГ 8-20%. После электрофореза белки из геля переносили на мембрану Amersham™ Hybond-P™ из ПВДФ. Мембрану предварительно смачивали 96% этиловым спиртом. Электроперенос осуществляли в приборе MINI PROTEAN II («Biorad», США) в буфере, содержащем 0,25М трис, 0,192М глицин, 1% ДСН, 20% этиловый спирт. Время переноса составляло 16-18 часов.

После переноса мембрану инкубировали в 5% растворе сухого молока в буфере tTBS (0,01М трис-HCl (pH 7,4), 0,15М NaCl, 0,05% твин-20) в течение часа. Затем мембрану три раза отмывали по 10 минут в буфере tTBS. Далее проводили инкубацию с соответствующими первичными антителами (поликлональная мышьяная сыворотка к rPA83 или нейтрализующие моноклональные антитела к PA), разведёнными в 5% растворе молока на tTBS (разведение первичных антител – 1:5000), в течение часа. Затем отмывали 3 раза по 10 минут в буфере tTBS. После этого инкубировали в течение часа со вторичными противовидовыми (мышь или человек) антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, разведёнными в 5% растворе молока в tTBS (разведение вторичных антител – 1:10000). Отмывали от вторичных антител два раза по 10 минут в буфере tTBS, а также один раз 10 минут в буфере TBS (0,1М трис-HCl (pH 7,4), 0,15М NaCl). Мембрану обрабатывали субстратом Amersham™ ECL™ и детектировали

хемилюминисцентный сигнал с помощью системы гельдокументирования ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США).

2.13. Изоэлектрофокусирование

Для 2Д-электрофореза с последующим окрашиванием Кумасси G-250, изоэлектрофокусирование проводили в стеклянных трубках (2,4x180 мм), заполненных 4% ПААГ, приготовленном в 9М растворе мочевины, содержащем 2% Тритон X-100 и 0,4% смесь амфолинов с рН 4,6-10. 10 мкг rPA83m, инкубированного семь дней при +4 °С или +37 °С, наносили на “кислый” конец колонки геля. Изоэлектрофокусирование проводили три часа при 1400 В/ч в приборе Model 175 Tube Cell («Bio-RAD», США). Затем производили разделение фракций белка во втором измерении, по молекулярной массе. Для этого колонки помещали на верхний край ДСН ПААГ и проводили электрофорез.

Эксперимент проведён совместно с д.б.н. Л. И. Ковалёвым (ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН).

Для 2Д-электрофореза с последующим флуоресцентным анализом 3 мкг rPA83m, инкубированного семь дней при +4 °С или +37 °С, метили 400 пмоль активированного эфира Cyanine 2 (Cy2, #3A041) или Cyanine 5 (Cy5, #3C041), соответственно («Lumipore RUS», Россия), в соответствии с протоколом разработчика. К образцам добавляли дитиотреитол (0,75%) и 0,4% смесь амфолинов с рН 3-10. Изоэлектрофокусирование проводили на стрипах с иммобилизованным нелинейным градиентом рН 3-10 («Bio-RAD», США) в приборе PROTEAN i12 IEF («Bio-RAD», США). После этого стрипы инкубировали 30-45 минут в буфере следующего состава: 6М мочевины, 0,375М трис-НСl, 40% глицерин, 2% ДСН, 2% дитиотреитол, рН 8,8. После этого стрипы помещали на верхний край 12% ДСН ПААГ (0,1x20x20 см, «Хеликон», Россия) и фиксировали 1% агарозой, содержащей 0,01% бромфеноловый синий. Электрофорез проводили при 120-200В в течение 5-7 часов. Гели сканировали с помощью прибора TYRHOON FLA950 («GE

Healthcare», США), при разрешении 100 мкм. 473 нм и 635 нм лазеры были использованы для детекции $\text{Cu}2$ и $\text{Cu}5$, соответственно. Эмиссионный фильтр DBR1 (530DF20/665LP) был использован для детекции $\text{Cu}2$ (515-545 нм) и $\text{Cu}5$ (>665 нм).

Эксперимент проведён совместно с к.х.н. Д. А Сковрцовым и И. В. Жиркиной (Кафедра химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова).

2.14. Иммунофлуоресцентная микроскопия

На покровное стекло наносили 70-100 мкл формвара (0,4% раствор формвара в дихлорэтаноле), инкубировали в течение двух минут, после чего остатки формвара удаляли и оставляли стекло сохнуть на 10 минут. На покровное стекло, покрытое формваром, наносили 150 мкл образца. Инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Затем удаляли остатки образца.

Далее наносили 300 мкл блокирующего раствора (1% БСА, 0,05% твин-20 в PBS). Блокирование проводили в течение часа при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора на стёкла наносили 100 мкл блокирующего раствора, содержащего соответствующие первичные антитела в разведении или 1/100. С первичными антителами инкубировали в течение часа. К отрицательным контролям первичные антитела не добавляли. Остатки раствора антител удаляли и отмывали несвязавшиеся антитела раствором для отмывки (0,25% БСА, 0,05% твин-20 в PBS). Отмывка проводилась три раза по 5 минут на орбитальном шейкере PSU-10i («Biosan» Латвия) при 80 об/мин. Затем проводилась обработка вторичными антителами. На стёкла наносили 100 мкл блокирующего раствора, содержащего противовидовые антитела к IgG мыши, конъюгированные с флуорофором Alexa546 в разведении 1/200 или противовидовые антитела к IgG человека, конъюгированные с флуорофором CFTM488A в разведении 1/100. После связывания вторичных антител стёкла три раза отмывали раствором для

отмывки, затем отмывали 5 минут в PBS, и в конце промывали Milli-Q. Стёкла с готовым препаратом высушивали на воздухе в течение ночи без доступа света.

Непосредственно перед микроскопическим исследованием образца на предметное стекло наносили 10 мкл раствора 1,4-диазидабицикло[2.2.2]октана (DABCO – 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane). На каплю DABCO на предметном стекле помещали покровное стекло образцом вниз. Края покровного стекла фиксировали. Затем препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа «Axiovert 200M» («Carl Zeiss», Германия), снабженного интегрированной камерой «ORCAII-ERG2» («Hamamatsu Photonics», Япония).

2.15. Иммунизация и заражение морских свинок

Морские свинки были получены в центре «Андреевка» (ФГБУ Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Россия).

Все эксперименты на морских свинках были выполнены совместно с Т. Б. Кравченко, к.м.н. И. В. Бахтеевой, к.б.н. А. И. Борзиловым, к.б.н. И. Т. Комбаровым, к.б.н. В. С. Тимофеевым, к.м.н. Г. М. Титаревой (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»).

В эксперименте участвовало восемь групп морских свинок, иммунизированных следующими препаратами:

- 1) rPA83m, n = 10
- 2) rPA83m+СЧ ВТМ (массовое соотношение 1:10), n = 10
- 3) rPA83m+Al(OH)₃ (массовое соотношение 1:10), n = 10
- 4) rPA83m, инкубированный 28 дней при +37 °С, n = 10
- 5) rPA83m+СЧ ВТМ (массовое соотношение 1:10), инкубированный 27 дней при +37 °С, n = 10

6) rPA83m+Al(OH)₃ (массовое соотношение 1:10), инкубированный 27 дней при +37 °C, n = 10

7) СЧ ВТМ, n = 5

8) Только PBS, n = 5

Концентрация rPA83m составляла 0,1 мкг/мкл (группы 1-6), концентрация СЧ ВТМ и Al(OH)₃ составляла 1 мкг/мкл (группы 2, 3, 5, 6, 7). Все образцы были приготовлены в PBS, объём доз для иммунизации составлял 0,3 мл. Перед иммунизацией препараты были тщательно перемешаны. В группах 1-6 было по пять самок и самцов, в группе 7 – три самки и два самца, в группе 8 – две самки и три самца. Возраст животных составлял 6-8 недель, вес до иммунизации – 275±25 г. Животные дважды были иммунизированы подкожно во внутреннюю часть верхней половины бедра. Интервал между первой и второй иммунизациями составил 28 дней, на 48-й день после первой иммунизации проводился отбор крови из краевой ушной вены.

Морских свинок заражали интраназально спорами *Bacillus anthracis* штамма 81/1 (pXO1⁺, pXO2⁺). Доза составляла 2500 спор на животное. Спустя 20 дней после первого заражения выжившие особи были заражены повторно, на этот раз доза составляла 25000 спор на животное. В течение 21 дня после второго заражения животные были под наблюдением. Затем оставшиеся в живых морские свинки были подвергнуты эвтаназии методом ингаляции CO₂.

2.16. Непрямой твердофазный ИФА

Раствор антигена с концентрацией 10 мкг/мл наносили на 96-луночный планшет средней сорбции («Greiner bio-one», Германия) по 100 мкл на лунку. Сорбция антигена проводилась в течение ночи при +4 °C. Затем планшет промывали пять раз промывочным раствором, содержащем 0,1% твин-20 в PBS, по 300 мкл на лунку, с помощью системы автоматической промывки Wellwash («Thermo Scientific», США). Все дальнейшие промывки планшета осуществлялись аналогично. Далее на планшет наносили блокирующий раствор (1% сухое молоко в PBS) по 300 мкл на лунку и инкубировали два часа

при комнатной температуре. После блокирования планшет промывали и наносили исследуемые сыворотки в трехкратных разведениях в блокирующем растворе (12 разведений, начиная от 1/30). Планшет с сыворотками инкубировали при +4 °C в течение ночи. После этого планшет снова отмывали и наносили вторичные противовидовые антитела (морская свинка), конъюгированные с пероксидазой хрена (исходная концентрация антител – 2 мг/мл, разводили 1:10000 в блокирующем растворе). Инкубацию со вторичными антителами проводили в течение часа при +37 °C и 100 об/мин в термошейкере ST-3L («ELMI», Россия). После этого планшет отмывали и наносили раствор, содержащий субстрат – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин – по 100 мкл на лунку. Реакцию останавливали спустя 10 минут с помощью нанесения 2М H₂SO₄ в объеме 100 мкл на лунку. Поглощение при $\lambda = 450$ нм измеряли с помощью системы Multiskan FC («Thermo Scientific», США). Титр сыворотки определялся как величина, обратная разведению сыворотки, при котором поглощение было равно среднему значению фонового сигнала + 3SD.

2.17. Включение флуоресцентной метки ФИТЦ или РИТЦ в рекомбинантные белки rPA(1+2)m и rPA(3+4)m

К раствору rPA(1+2)m или rPA(3+4)m в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,1) добавляли 1/10 объёма раствора ФИТЦ или РИТЦ в ДМСО (1 мг/мл), тщательно перемешивая. Итоговый раствор инкубировали в течение ночи при +4 °C в темноте, а затем проводили диализ против PBS в диализных мешках с размером пор 12-14 кДа и диаметром 6 мм («Servapor», Германия) в течение четырёх часов со сменой воды каждый час.

Для флуоресцентного анализа композиции СЧ ВТМ с мечеными флуорофорами белками, наносили на покровное стекло, покрытое формваром, а затем помещали покровное стекло на предметное стекло, покрытое DABCO, аналогично **Разделу 2.14**. Препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия),

снабженного интегрированной камерой ORCAII-ERG2 («Hamamatsu Photonics», Япония).

2.18. Статистическая обработка результатов

Для сравнения стабильности rPA83m свободного и в композиции с СЧ ВТМ использовали критерий Уилкоксона-Манна-Уитни. В каждый день эксперимента сравнивались показатели стабильности rPA83m в свободном препарате и rPA83m в композиции с СЧ ВТМ ($n = 5$, если не указано обратного).

Для попарного сравнения титров антител в различных группах иммунизации использовали критерий Уилкоксона-Манна-Уитни. Попарное сравнение проводилось для титров к rPA83m между группами, иммунизированными каждым неинкубированным и соответствующим инкубированным препаратом, а также между титрами к СЧ ВТМ и rPA83m в группах, иммунизированных препаратами rPA83m+СЧ.

Для сравнения титров к rPA83m и к СЧ ВТМ в трёх и более группах использовали тест Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна для множественных сравнений.

Для сравнения показателей выживаемости морских свинок после заражения использовали тест Гехана-Бреслоу-Уилкоксона, для корректировки p -значений при множественных сравнениях применялся метод Холма-Бонферрони.

Статистически значимыми считались результаты сравнения при $p < 0,05$. Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью программы GraphPadPrism 9.1.0 (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, USA).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сибирская язва – инфекционное заболевание, вызываемое грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Случаи возникновения сибирской язвы у человека и сельскохозяйственных животных регистрируются по всему земному шару ежегодно.

Вакцинация – основной способ борьбы с этой инфекцией, как и с большинством других заболеваний бактериальной или вирусной природы. К недостаткам лицензированных вакцин против сибирской язвы относятся невозможность использования совместно с терапией антибиотиками, низкий профиль безопасности, обусловленный содержанием всех трёх компонентов токсина *B. anthracis*, а также деградация главного вакцинного белка-антигена – протективного антигена сибирской язвы (РА) – в присутствии гидроксида алюминия (адъювант в вакцинах BioThraxTM и CYPHENDUSTM). Это определяет необходимость создания новой, стабильной, безопасной и эффективной вакцины против сибирской язвы.

3.1. Стабильность рекомбинантного полноразмерного РА

В основном, исследования, связанные с разработкой вакцины против сибирской язвы, сфокусированы на рекомбинантных субъединичных вакцинах. При этом протективный антиген (protective antigen, РА) является основным компонентом при разработке рекомбинантных вакцин против данного заболевания. РА не токсичен в отсутствие двух других компонентов токсина сибирской язвы: фактора летальности (lethal factor, LF) и фактора отёчности (edema factor, EF) – поскольку функционирует только в качестве переносчика, обеспечивающего транслокацию LF и EF в цитозоль клетки-мишени. В то же время, наличия антител к РА достаточно для нейтрализации токсина *B. anthracis* и для защиты от инфекции (Taft, Weiss, 2008). РА – относительно крупный белок (735 а. о., 83 кДа), состоящий из четырёх доменов. Пространственная структура РА представлена на **Рисунке 4**.

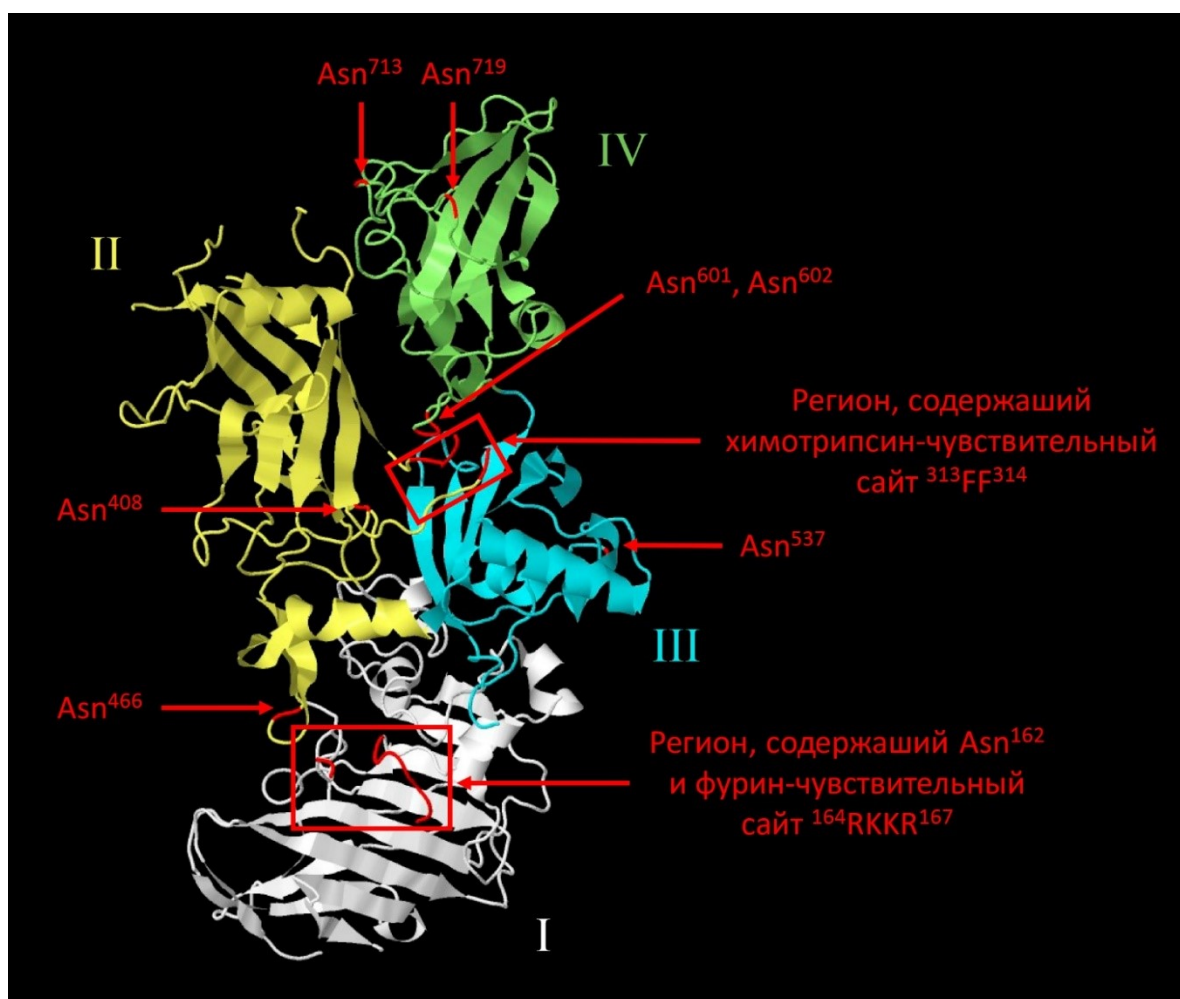


Рисунок 4. Структура протективного антигена сибирской язвы (РА)

Четыре домена (I-IV) выделены белым, желтым, голубым и зелёным, соответственно. Красным выделены подверженные спонтанному дезаминированию остатки Asn¹⁶², Asn⁴⁰⁸, Asn⁴⁶⁶, Asn⁵³⁷, Asn⁶⁰¹, Asn⁶⁰², Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹, а также остатки 160-180 (регион содержит остаток Asn¹⁶² и сайт расщепления фурином ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷) и остатки 300-320 (регион содержит сайт расщепления химотрипсином ³¹³FF³¹⁴).

Пространственная модель выполнена с помощью Jmol (<http://www.jmol.org>) на основании данных из открытой базы PDB (PDB: 1ACC; Petosa *et al.*, 1997; Berman *et al.*, 2000).

Известно, что именно полноразмерный РА (РА83) при иммунизации способен индуцировать формирование наиболее эффективного протективного иммунного ответа (Abbound, Casadevall, 2008). Однако склонность данного белка к деградации является основным фактором, лимитирующим возможность создания на его основе эффективной рекомбинантной вакцины. Низкая стабильность РА главным образом обусловлена наличием сайтов протеолиза и спонтанным дезаминированием а. о. аспарагина в составе белка. РА содержит два сайта протеолиза: фурин-чувствительный сайт ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ в домене I и химотрипсин-чувствительный сайт ³¹³FF³¹⁴ в домене II. Из 65

аминокислотных остатков аспарагина, распределённых по всем четырём доменам РА, в наибольшей степени дезаминированию подвержены восемь: Asn¹⁶², Asn⁴⁰⁸, Asn⁴⁶⁶, Asn⁵³⁷, Asn⁶⁰¹, Asn⁶⁰², Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ (Zomber *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 2007). На **Рисунке 4** красным цветом отмечены оба сайта протеолиза и подверженные спонтанному дезаминированию остатки аспарагина.

На первом этапе работы мы провели оценку стабильности полноразмерного (молекулярная масса 83 кДа) рекомбинантного РА (rРА83 – recombinant РА83). Было произведено искусственное “состаривание” rРА83 при +25 °С (**Рисунок 5**). Инкубация при +25 °С – один из подходов к изучению стабильности белка (Zomber *et al.*, 2005), который позволяет не только наблюдать изменения в течение разумного временного промежутка, но и моделировать нарушение холодной цепи при хранении и транспортировке вакцинного препарата. В этом же эксперименте проводилось изучение возможности стабилизировать rРА83 путём образования его композиции со сферическими частицами (СЧ), полученными в результате термической перестройки вируса табачной мозаики (ВТМ). При создании кандидатных вакцин против сибирской язвы в качестве носителя, адъюванта и стабилизатора для рекомбинантного РА активно применяются частицы различной природы, в том числе полученные из вирусов бактерий и животных (Shivachandra *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2008; Peachman *et al.*, 2012). Данных о возможности использования частиц вирусов растений при создании вакцины на основе rРА83 в настоящее время нет. Ранее в нашем научном коллективе было впервые продемонстрировано, что ряд вирусов растений с капсидом, имеющим спиральный тип симметрии, могут быть подвергнуты термической перестройке (Atabekov *et al.*, 2011; Трифонова *и др.*, 2015; Nikitin *et al.*, 2016; Трифонова *и др.*, 2017). Наиболее впечатляющие результаты были получены при работе с вирусом табачной мозаики (ВТМ): нагревание ВТМ до высоких температур приводит к образованию сферических частиц, сформированных белком оболочки ВТМ с изменённой вторичной структурой. СЧ ВТМ хорошо

охарактеризованы, была показана их безопасность и возможность их использования в качестве адъювантов для ряда антигенов, имеющих вирусную природу, таких как антигены SARS-CoV-2, вируса краснухи, вируса бешенства и вируса Пуумала (Никитин *и др.*, 2011; Karpova *et al.*, 2012; Trifonova *et al.*, 2014; Никитин *и др.*, 2016; Trifonova *et al.*, 2017; Nikitin *et al.*, 2018a,b,c; Evtushenko *et al.*, 2020; Kurashova *et al.*, 2020; Kovalenko *et al.*, 2022). СЧ ВТМ обладают высокими адсорбционными свойствами и способны образовывать композицию с белками интереса независимо от их размера и аминокислотного состава. Предположительно, это позволяет СЧ ВТМ играть роль депо антигена и осуществлять его презентацию иммунной системе (Trifonova *et al.*, 2017). В связи с этим мы выдвинули предположение, что СЧ ВТМ могут увеличивать стабильность гРА83.

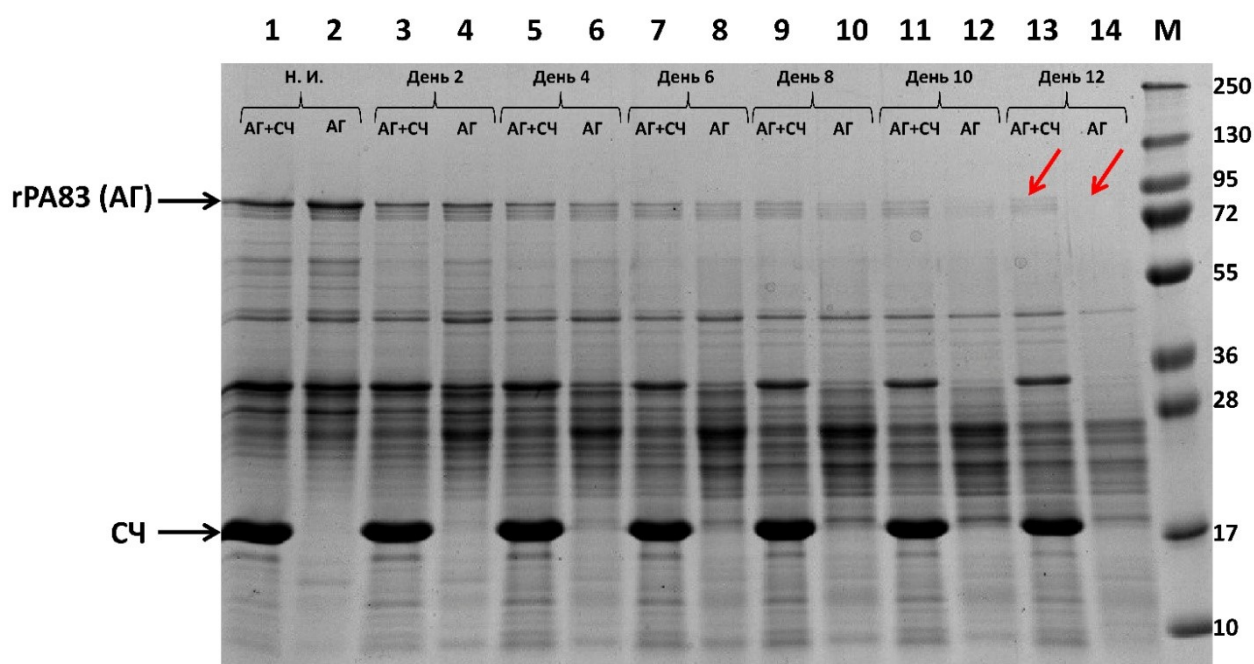


Рисунок 5. Сферические частицы (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ) стабилизируют рекомбинантный РА (гРА83)

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – композиции гРА83+СЧ. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 – свободный гРА83. 1, 2 – неинкубированные образцы (Н.И.). 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14 – образцы, инкубированные при +25 °С в течение 2, 4, 6, 8, 10 или 12 дней, соответственно. М – маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены справа). Красные стрелки указывают на значительное различие в стабильности между свободным гРА83 и гРА83 в композиции с СЧ ВТМ. Объём анализируемых проб составлял 10 мкл. АГ – антиген – гРА83.

Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

Препараты свободного гРА83 и гРА83 в композиции с СЧ ВТМ были инкубированы при +25 °С в течение 12 дней. Концентрация гРА83 составляла 0,4 мкг/мкл, концентрация СЧ ВТМ – 1 мкг/мкл. Выбор концентраций продиктован попыткой обеспечить адекватную визуализацию при электрофоретическом анализе профиля полос, соответствующих продуктам деградации гРА83. Отбор проб для анализа производился раз в 2 дня, пробы хранились при -70 °С и анализировались одновременно в конце эксперимента (**Рисунок 5**).

Начиная с восьмого дня инкубации, полоса на геле, соответствующая полноразмерной (83 кДа) форме гРА83, более чётко детектируется в образце гРА83 в композиции с СЧ ВТМ (**Рисунок 5, дорожка 9**), чем в образце свободного гРА83 (**Рисунок 5, дорожка 10**). На 12 день эксперимента полоса, соответствующая полноразмерной форме гРА83, всё ещё детектируется в образце, содержащем СЧ (**Рисунок 5, дорожка 13**), и не детектируется этим методом в случае свободного антигена (**Рисунок 5, дорожка 14**). Наличие в препарате полноразмерного гРА83 с молекулярной массой 83 кДа крайне важно, поскольку именно он способен наиболее эффективно индуцировать формирование протективного иммунного ответа (Taft, Weiss, 2008). Таким образом, продемонстрирована стабилизация гРА83 с помощью СЧ ВТМ.

3.2. Дизайн и получение модифицированного полноразмерного протективного антигена сибирской язвы – гРА83m

Использование платформы-носителя – эффективный, но не единственный и не самый распространённый подход для стабилизации гРА83. Двумя основными причинами нестабильности РА являются протеолиз и спонтанное дезаминирование. В литературе описаны успешные попытки повысить стабильность белка путём внесения замен в основные подверженные деградации участки РА. В 1994 году была опубликована работа Singh с соавторами, в которой впервые описан стабилизирующий эффект внесения замен в сайт протеолиза фурином (¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷) и делеции химотрипсин-

чувствительного сайта ($^{313}\text{FF}^{314}$) (Singh *et al.*, 1994). Позднее, в 2002 году Ramirez с соавторами описали получение мутантного rPA83, в котором последовательность фурин-чувствительного сайта $^{164}\text{RKKR}^{167}$ была заменена на $^{164}\text{SNKE}^{167}$, остатки $^{313}\text{FF}^{314}$ были делетированы, а также была произведена замена 308 остатка глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту. Данный белок был получен в нетоксигенном, неинкапсулированном (pXO1⁻, pXO2⁻) штамме *B. anthracis*. Внесённые замены не оказали негативного влияния на способность белка индуцировать выработку токсин-нейтрализующих антител (Ramirez *et al.*, 2002). Впоследствии данные замены использовались в ряде других работ, в которых были получены и исследованы вакцинные кандидаты на основе модифицированного rPA83, экспрессированного не только в *B. anthracis* (Bellanti *et al.*, 2012; идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT00114621), но и в других бактериях, таких как *Pseudomonas fluorescens* (Reed *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2021; идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT02655549). В 2018 году Verma с соавторами показали, что замена Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ на глутамин положительно сказывается на стабильности белка, и что данные замены также не влияют на способность белка индуцировать выработку токсин-нейтрализующих антител (Verma *et al.*, 2018). Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ - одни из наиболее подверженных спонтанному дезаминированию остатков аспарагина в последовательности PA (Zomber *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 2007). При этом они расположены в рецептор-связывающем участке белка и входят в состав важных нейтрализующих эпитопов (Singh *et al.*, 1991; Little *et al.*, 1996; Sivasubramanian *et al.*, 2008). Дезаминирование по остаткам Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ приводит к снижению титра токсин-нейтрализующих антител (D'Souza *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2018). При этом скорость дезаминирования Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ увеличивается при адсорбции на гель гидроксида алюминия AlhydrogelTM, который используется в качестве адъюванта в лицензированных вакцинах AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed – вакцина против сибирской язвы адсорбированная, BiothraxTM, Emergent BioSolutions Inc., США) и CYPHENDUSTM (Emergent BioSolutions Inc., США). Замена остатков

аспарагина на глутамин обусловлена не только схожестью свойств данных аминокислот, но и существенно более высоким полупериодом дезаминирования глутамина по сравнению с аспарагином (Verma *et al.*, 2018).

Основываясь на положительных результатах приведённых исследований, мы разработали последовательность модифицированного rPA83, содержащую как замены в сайтах протеолиза, так и замены подверженных дезаминированию остатков аспарагина на глутамин. В качестве отправной точки была взята последовательность PA Uniprot Q08G54. Фурин-чувствительный сайт ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ был заменён на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷, химотрипсин-чувствительный сайт ³¹³FF³¹⁴ был делетирован, остатки Asn¹⁶², Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ были заменены на глутамин. Asn¹⁶² описан в работе Zomber с соавторами как один из наиболее подверженных дезаминированию остатков аспарагина в составе PA. Он расположен в непосредственной близости к фурин-чувствительному сайту PA: ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷. Поскольку в данный участок молекулы в любом случае планировалось внести замены, которые потенциально могут привести к некоторому локальному изменению свойств белка, было принято решение также заменить Asn¹⁶² на глутамин в дополнение к заменам 713 и 719 остатков, реализованным в работе Verma с коллегами (Zomber *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2018). Полученный белок был назван rPA83m (rPA83 modified). Схема строения rPA83m и аминокислотная последовательность белка представлены на **Рисунке 6**.

На основании аминокислотной последовательности rPA83m была получена экспрессионная конструкция pQE-30-rPA83m. Разработанная конструкция предназначена для экспрессии в *Escherichia coli* и кодирует гексагистидиновую метку для очистки методом металл-аффинной хроматографии. Поэтому ожидаемая молекулярная масса rPA83m, рассчитанная по аминокислотной последовательности с помощью сервиса ProtParam EXPaSy (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://expasy.org/>), несколько превышала молекулярную массу нативного PA и составила 84 кДа. *E. coli* – одна из стандартных экспрессионных систем, применяемых для

получения рекомбинантных белков. Использование *E. coli* позволяет, в частности, избежать накопления в культуре бактерий-продуцентов большого количества секретируемых протеаз, что характерно для бактерий рода *Bacillus* и негативно сказывается на стабильности PA (Singh *et al.*, 1994).

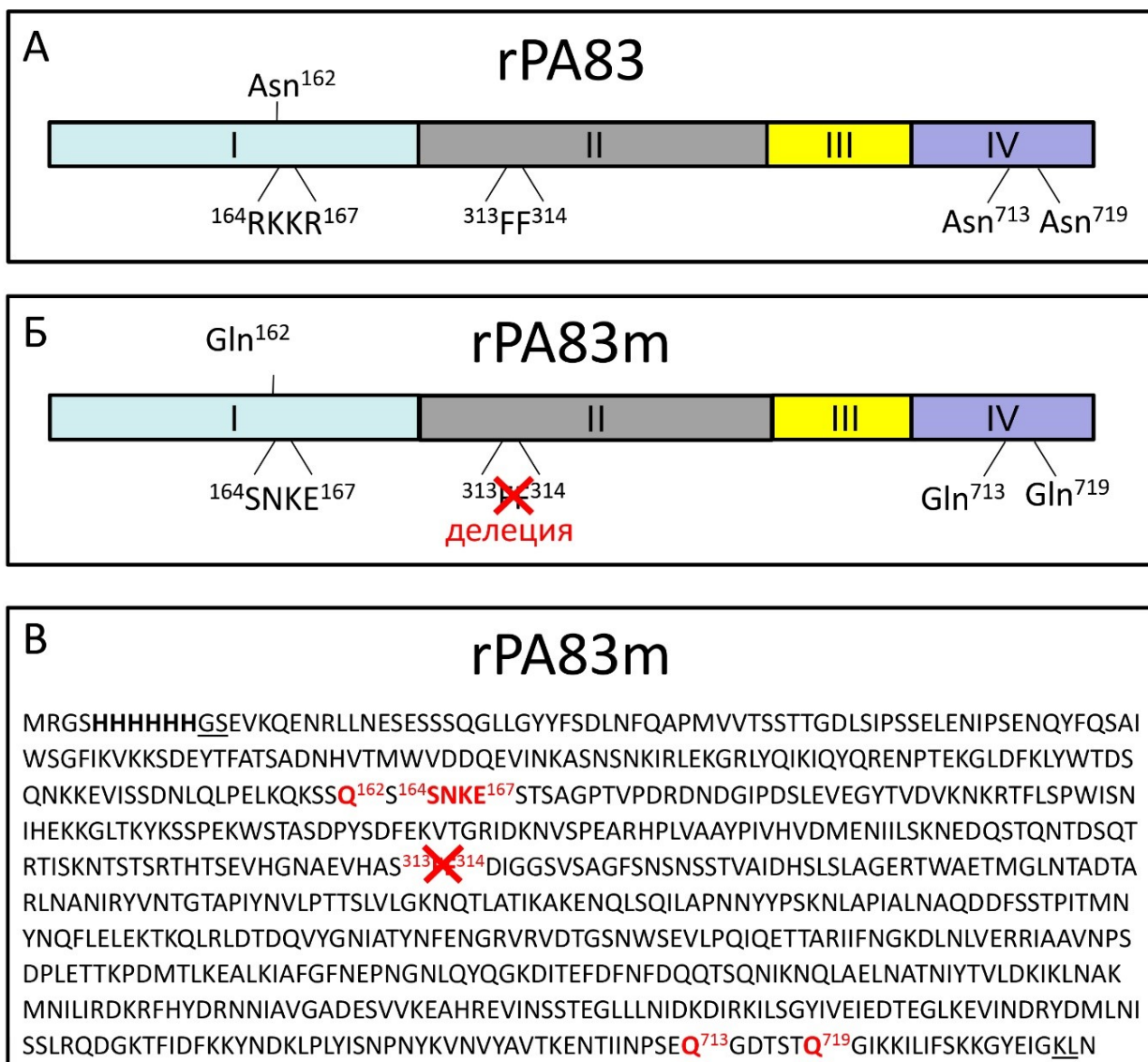


Рисунок 6. Сравнение доменной организации rPA83 (**А**) и модифицированного рекомбинантного PA (rPA83m) (**Б**), аминокислотная последовательность rPA83m (**В**)

В последовательности rPA83m произведены замены в фурин- и химотрипсин-чувствительных сайтах (фрагмент $^{162}\text{RKKR}^{167}$ был заменён на $^{162}\text{SNKE}^{167}$ в сайте расщепления фурином, фрагмент $^{313}\text{FF}^{314}$ был удалён в сайте расщепления химотрипсином), а также замена остатков Asn^{162} , Asn^{713} и Asn^{719} на Gln.

В аминокислотной последовательности rPA83m замены выделены красным. Гексакгистидиновая метка выделена жирным шрифтом. Аминокислотные остатки, соответствующие сайтам рестрикции, использованным для клонирования в вектор pQE-30, подчёркнуты. Номера аминокислотных остатков указаны в координатах нативного PA.

Был осуществлён подбор оптимальных условий экспрессии для rPA83m. Понижение в системе температуры с +37 °C до +20 °C после индукции экспрессии белка с плазмиды pQE-30-rPA83m с помощью добавления ИПТГ приводило к увеличению содержания полноразмерного белка в препарате. Для обеспечения высокого выхода белка при таких условиях суммарное время выращивания культуры *E. coli* было увеличено с 7 до 9 часов. По-видимому, данная особенность связана с коэкспрессионной деградацией rPA83m при +37 °C. Коэкспрессионные изменения немодифицированного rPA83 – известное явление. Так, Zomber с коллегами наблюдали >50% дезаминирования по остаткам Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ даже в свежесекретированном белке (Zomber *et al.*, 2005). И хотя само по себе дезаминирование не приводит к разрушению полипептидной цепи, а остатки Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ в последовательности rPA83m были заменены на остатки глутамина, нельзя исключать возможность иных коэкспрессионных процессов, приводящих к деградации белка. После подбора оптимальных условий rPA83m был накоплен в *E. coli* штамма SG13009, выделен и переведён в водный раствор методом диализа. На **Рисунке 7** представлен результат электрофоретического анализа 4 мкг rPA83m (**Рисунок 7, дорожка 1**). Для сравнения на этом же рисунке приведена дорожка, содержащая 4 мкг немодифицированного rPA83 (**Рисунок 7, дорожка 2**).

По интенсивности полос, соответствующих белковым фрагментам с молекулярной массой меньше, чем у полноразмерной формы белка, видно, что rPA83m удалось получить с более высокой долей полноразмерной формы от общей белковой фракции. Мы считаем экспрессию белка с молекулярной массой 84,1 кДа в *E. coli* успешным результатом, поскольку, как правило, в этой бактериальной системе получают менее крупные белки.

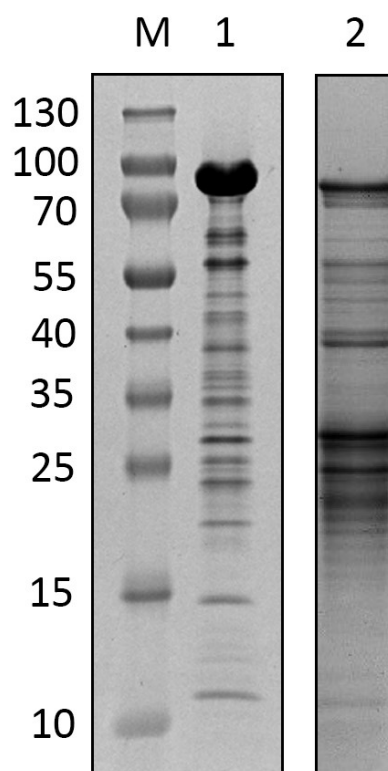


Рисунок 7. Выделенный и очищенный белок rPA83m

1 – rPA83m, 4 мкг

2 – rPA83, 4 мкг

М – маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены слева)

Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

3.3. Серологическая характеристика rPA83m

Важной характеристикой полученного белка rPA83m является его антигенная специфичность. В настоящей работе для её изучения были использованы поликлональная мышьяная сыворотка к rPA83 и химерные моноклональные антитела (МАТ) к РА, для которых была ранее продемонстрирована токсин-нейтрализующая активность (Панина *и др.*, 2011). На **Рисунке 8** представлены результаты вестерн-блот анализа, демонстрирующего эффективное взаимодействие rPA83m как с поликлональной сывороткой к rPA83 (**Рисунок 8Б, дорожка 1**), так и с нейтрализующими МАТ к РА (**Рисунок 8В, дорожка 1**). В качестве положительного контроля в вестерн-блоте был использован rPA83 (**Рисунок 8Б,В, дорожка 5**), а в качестве отрицательных контролей – белок оболочки ВТМ (**Рисунок 8Б,В, дорожка 4**) и лизат компетентных клеток *E. coli* штамма

SG13009 (**Рисунок 8Б,В, дорожка 6**). Для более детального изучения взаимодействия rPA83m с антителами к РА были исследованы два рекомбинантных белка, содержащих домены I-II rPA83m (rPA(1+2)m, **Рисунок 8А,Б,В, дорожка 2**) или домены III-IV rPA83m (rPA(3+4)m, **Рисунок 8А,Б,В, дорожка 3**). В последовательности обоих белков были внесены такие же аминокислотные замены, как при дизайне rPA83m. Оба двухдоменных белка взаимодействовали с поликлональной сывороткой к rPA83 (**Рисунок 8Б, дорожки 2 и 3**). Однако с нейтрализующими МАТ к РА провзаимодействовал только rPA(3+4)m (**Рисунок 8В, дорожка 3**). Это указывает на то, что эпитоп, который узнают данные МАТ, локализован либо в домене III, либо в домене IV РА.

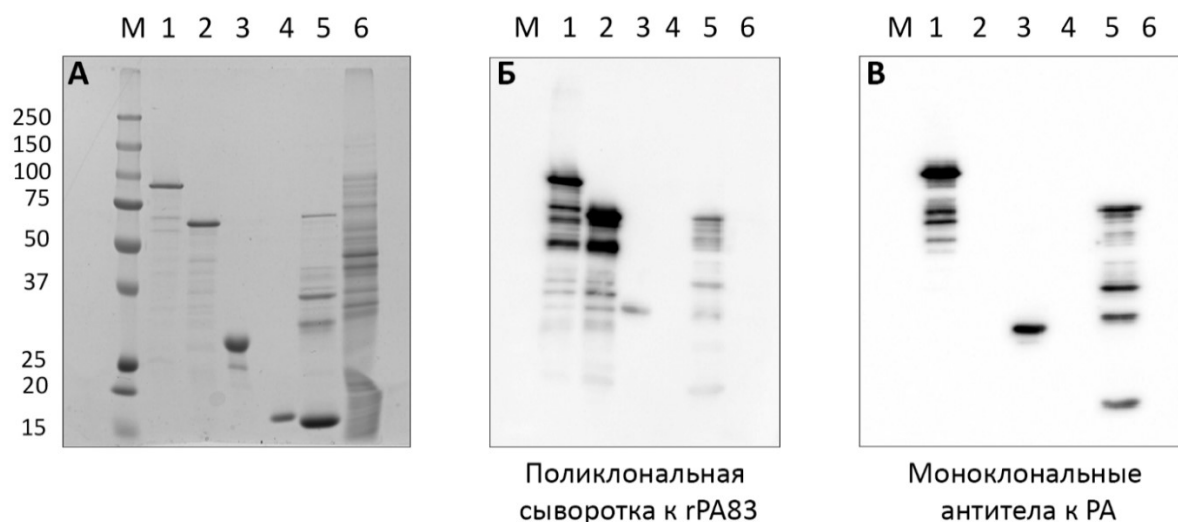


Рисунок 8. Взаимодействие rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с антителами к РА

А. Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

Б. Вестерн-блот с поликлональной мышинной сывороткой к rPA83.

В. Вестерн-блот с химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА.

Для обоих вестерн-блотов использовались вторичные противовидовые антитела (**Б** – мышь, **В** – человек), конъюгированные с пероксидазой хрена.

1 – rPA83m; **2** – rPA(1+2)m; **3** – rPA(3+4)m; **4** – вирус табачной мозаики (отрицательный контроль); **5** – rPA83 (положительный контроль); **6** – лизат клеток *E. coli* штамма SG13009 (отрицательный контроль). **М** - маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены слева).

В дополнительном эксперименте мы показали, что использованные в работе нейтрализующие МАТ к РА взаимодействуют с рекомбинантным белком, представляющим собой домен IV РА (**Приложение 1А, дорожка 2**), а

также с рекомбинантным доменом IV РА с заменами остатков Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ на глутамин (**Приложение 1А, дорожка 3**). Следовательно, эпитоп, который узнают данные МАТ, локализован именно в домене IV РА.

Таким образом, было продемонстрировано, что стабилизирующие замены в последовательности rРА83m не влияют на взаимодействие белка ни с поликлональной сывороткой к немодифицированному варианту белка, ни с как минимум одним нейтрализующим МАТ к РА.

3.4. Стабильность rРА83m свободного и в композиции с СЧ ВТМ

На следующем этапе работы мы сравнили стабильность rРА83m и немодифицированного rРА83. Наиболее наглядно продемонстрировать существенно большую стабильность rРА83m по сравнению с rРА83 удалось после длительного “состаривания” белка при +4 °С (**Рисунок 9**). Это стандартная температура хранения вакцинных препаратов.

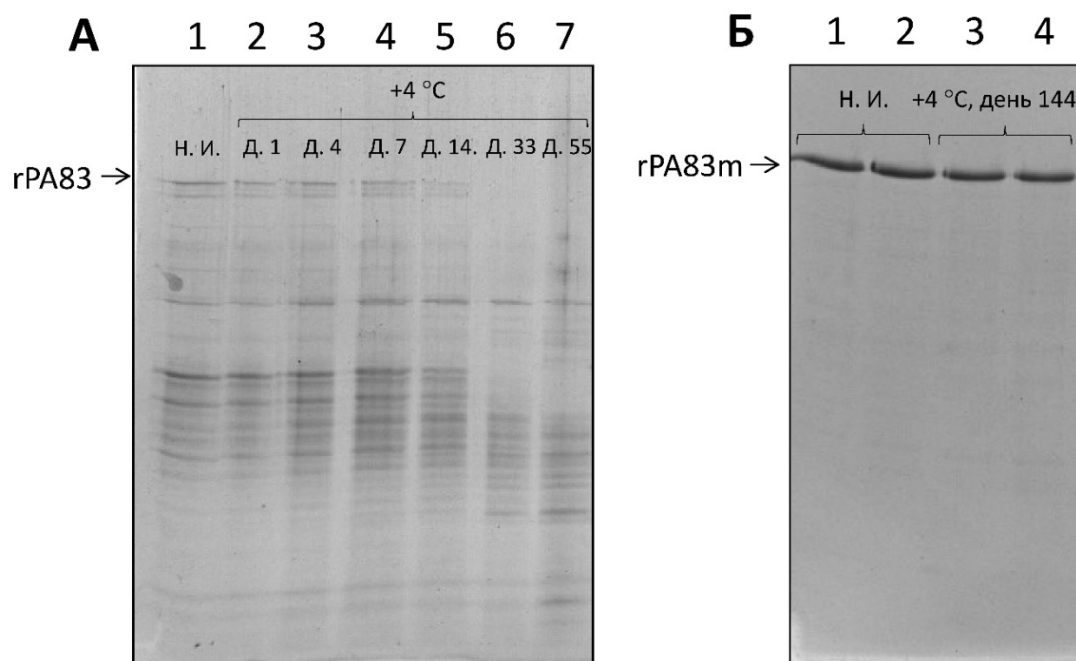


Рисунок 9. Стабильность rРА83 (**А**) и rРА83m (**Б**)

А. 1 – неинкубированный rРА83 (**Н.И.**); 2-7 – rРА83, инкубированный при +4 °С в течение 1, 4, 7, 14, 33 или 55 дней, соответственно.

Б. 1, 2 – неинкубированный rРА83m (**Н.И.**); 3, 4 – rРА83m, инкубированный при +4 °С в течение 144 дней.

rРА83 и rРА83m инкубировались в концентрации 0,2 мкг/мкл и 0,1 мкг/мкл, соответственно. На гель наносились пробы объёмом 10 мкл.

Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

Образцы гРА83 и гРА83m хранились при +4 °C в течение 144 дней. Раз в несколько дней производился отбор проб для анализа, пробы хранились при -70 °C и были проанализированы одновременно в конце эксперимента. Полноразмерный гРА83 не детектировался, начиная с 33-го дня эксперимента (**Рисунок 9А, дорожка 6**). В то же время, для гРА83m интенсивность полосы, соответствующей полноразмерной форме белка, не изменилась даже спустя 144 дня инкубации при +4 °C (**Рисунок 9Б, дорожки 3-4**).

Помимо содержания полноразмерной формы белка, другим важным параметром, требующим изучения, было изменение изоэлектрической точки (pI) белка с течением времени, поскольку дезаминирование остатков аспарагина приводит к понижению pI. В работе Zomber с соавторами было показано, что даже образец неинкубированного гРА83 обладает выраженной неоднородностью по pI, а инкубация +25 °C приводит к сильному изменению профиля изоформ белка, которые заметны уже на седьмой день инкубации и отчётливо видны на 14 день (Zomber *et al.*, 2005). В связи с этим, в настоящей работе методом изоэлектрофокусирования была произведена оценка pI образцов гРА83m, инкубированных при +4 °C (контроль) или при +37 °C в течение семи дней. Инкубация при +37 °C применяется для моделирования “ускоренного состаривания” белка. Например, такой вариант был использован для оценки подверженности дезаминированию остатков Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ в работе Zomber с соавторами (Zomber *et al.*, 2005). Результаты 2D-электрофоретического анализа, представленные на **Рисунке 10**, продемонстрировали, что для гРА83m, инкубированного при +4 °C (помечен флуорофором Cy2 – зеленый, **Рисунок 10В,Д**) и гРА83m, инкубированного при +37 °C (помечен флуорофором Cy5 – красный, **Рисунок 10Г,Д**), изоэлектрическая точка совпадала (**Рисунок 10Д**). При этом в обоих образцах отчётливо детектировалась мажорная точка с определённой молекулярной массой и pI. Сильной гетерогенности по pI не было обнаружено, несмотря на использование более жёстких температурных условий инкубации, чем в статье Zomber с коллегами (+37 °C вместо +25 °C) (Zomber *et al.*, 2005). Таким

образом, было показано, что аминокислотные замены в составе rPA83m существенно увеличивают стабильность рекомбинантного РА.

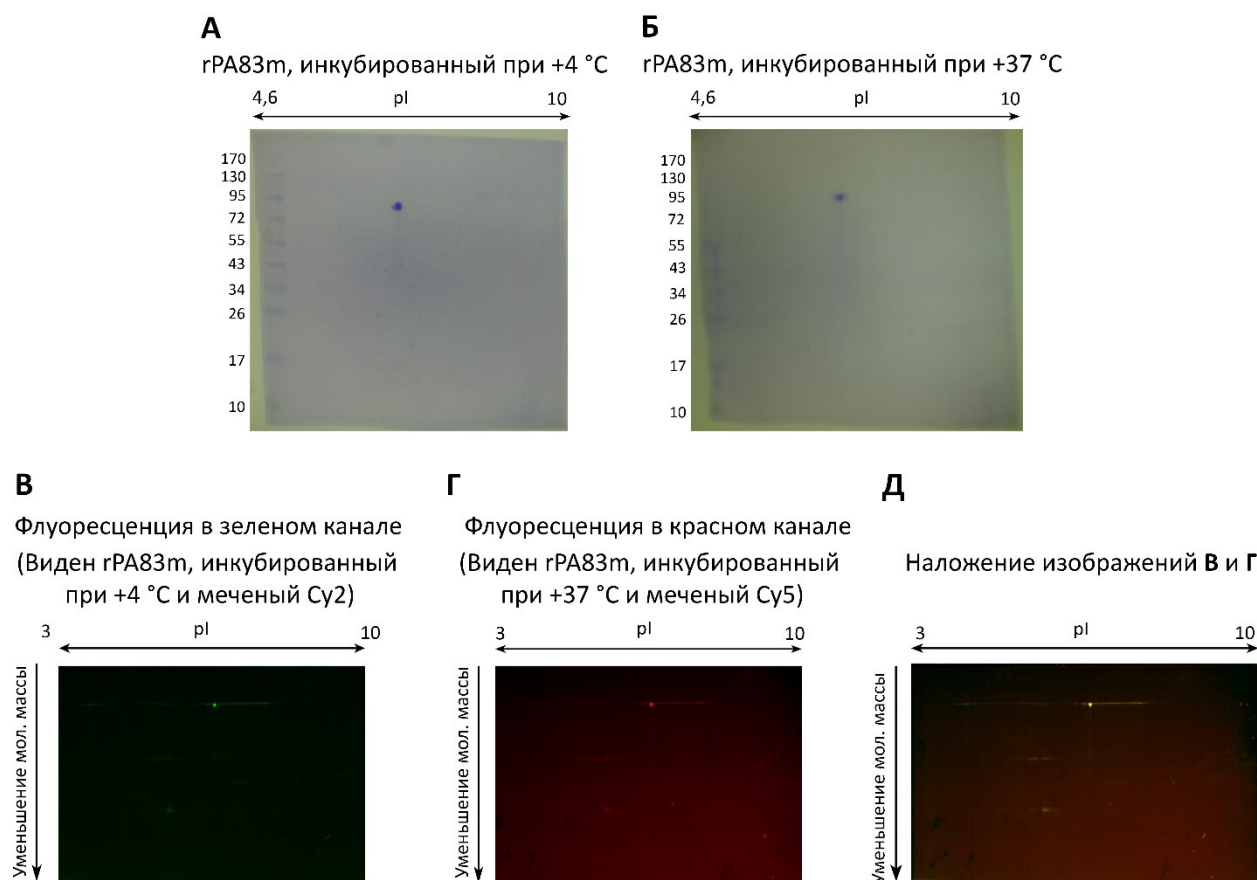


Рисунок 10. Изоэлектрическая точка rPA83m не изменяется в результате инкубации при +37 °C в течение 7 дней

А, Б. 2D-электрофорез rPA83m, инкубированного в течение 7 дней при +4 °C (**А**) или при +37 °C (**Б**).

Молекулярные массы белков в кДа представлены слева. Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

В, Г. Одновременный 2D-электрофоретический анализ образцов rPA83m, инкубированных в течение 7 дней при +4 °C (образец, меченый Cy2) или +37 °C (образец, меченый Cy5). Изображение получено в режиме флуоресценции в зеленом (**В**) или красном (**Г**) канале.

Д. Наложение изображений **В** и **Г**.

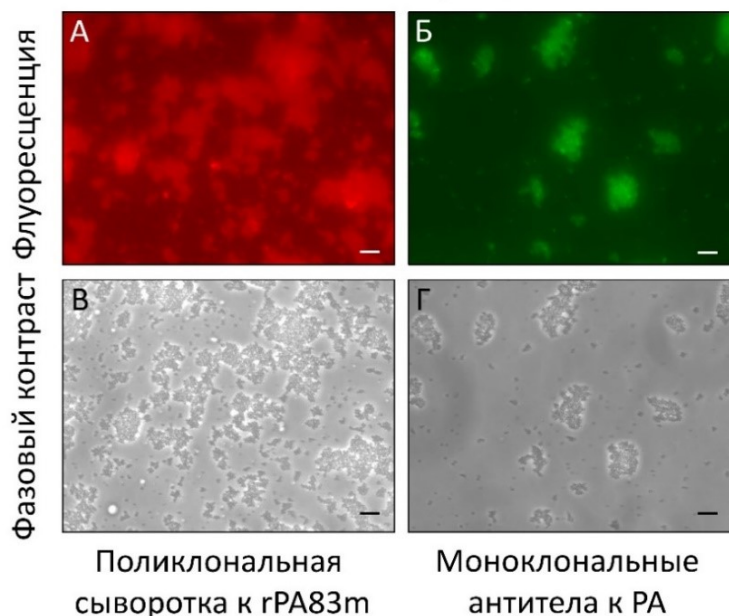
В результате, оба способа стабилизации rPA83: внесение стабилизирующих замен в последовательность белка и использование СЧ ВТМ в качестве платформы-стабилизатора, – продемонстрировали свою эффективность.

Затем перед нами встал вопрос о возможности одновременного использования и синергетическом эффекте двух подходов к стабилизации rPA83m при создании вакцинного препарата. Прежде всего было принято

решение исследовать возможность адсорбции rPA83m на поверхности СЧ. В работах по изучению противовирусных вакцинных кандидатов – композиций антигенов интереса с СЧ ВТМ – массовое соотношение антиген:СЧ, как правило, составляло 1:10 или было приближено к этому значению (Trifonova *et al.*, 2017; Kovalenko *et al.*, 2022). В связи с этим, в данном эксперименте и далее массовое соотношение rPA83m:СЧ также составляло 1:10. Композиции rPA83m с СЧ (были обработаны поликлональной мышиной сывороткой к rPA83m (**Рисунок 11А,В**) или нейтрализующими МАТ к РА (**Рисунок 11Б,Г**), а затем – противовидовыми вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором. Препараты исследовали методом микроскопии. В опытных образцах наблюдался флуоресцентный сигнал (**Рисунок 11А,Б**), распределённый по контурам СЧ, наблюдаемым в соответствующих образцах в режиме фазового контраста (**Рисунок 11В,Г**). В контрольных образцах, не обработанных первичными антителами, флуоресцентный сигнал не детектировался. (**Рисунок 11Д,Е**). Это указывает на адсорбцию rPA83m на поверхности СЧ ВТМ и специфичное взаимодействие rPA83m в составе композиции rPA83m+СЧ ВТМ как с поликлональной сывороткой к rPA83m, так и с нейтрализующими МАТ. Следовательно, бактериальный антиген rPA83m может быть адсорбирован на поверхности СЧ вирусной природы, и сохраняет при этом свою антигенную специфичность.

гРА83m+СЧ

Опытные образцы



Отрицательные контроли без первичных антител

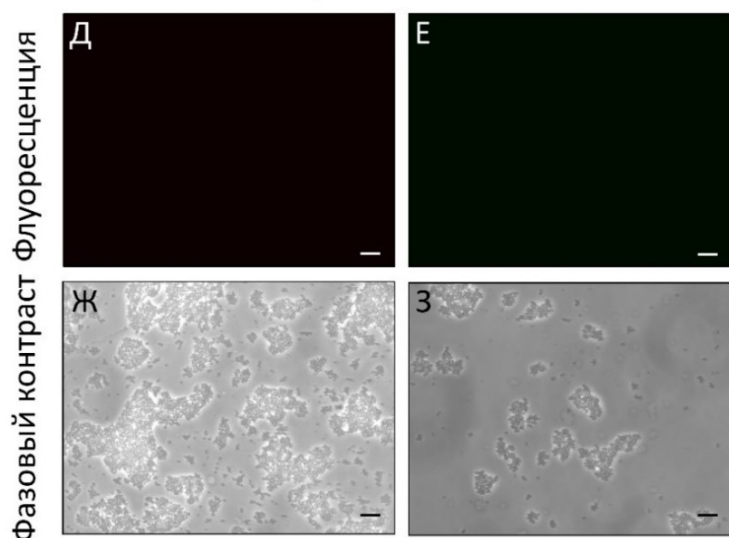


Рисунок 11. гРА83m адсорбируется на поверхности СЧ ВТМ с сохранением антигенной специфичности

А, В. Композиция гРА83m+СЧ ВТМ, обработанная поликлональной мышинной сывороткой к гРА83m и вторичными противовидовыми антителами (мышь), конъюгированными с Alexa Fluor® 546.

Б, Г. Композиция гРА83m+СЧ ВТМ, обработанная химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА и вторичными противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с CF™ 488A.

Д, Е, Ж, З. Препараты, аналогичные А, Б, В, Г, соответственно, не обработанные первичными антителами.

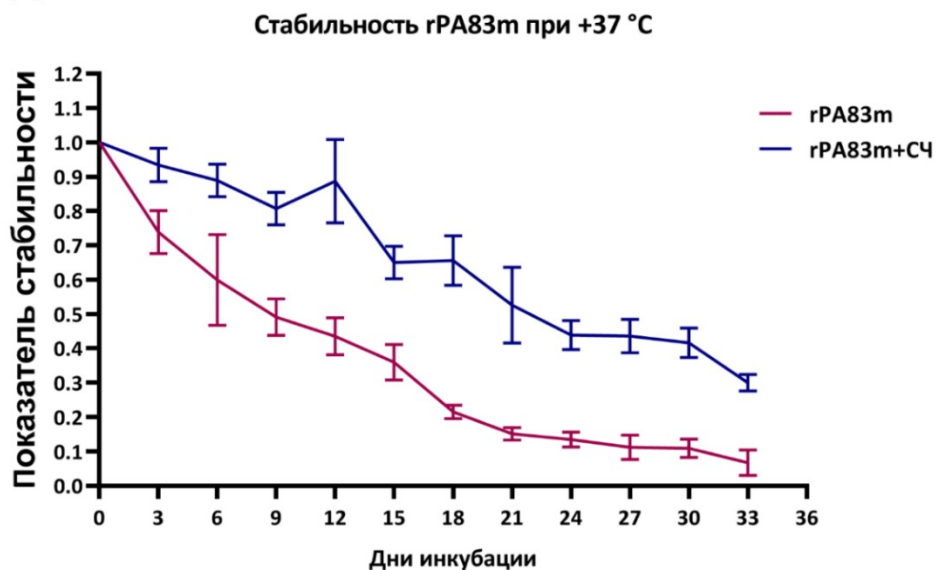
(А, В), (Б, Г), (Д, Ж), (Е, З) – изображения, попарно полученные в режиме флуоресценции и фазового контраста, соответственно.

Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.

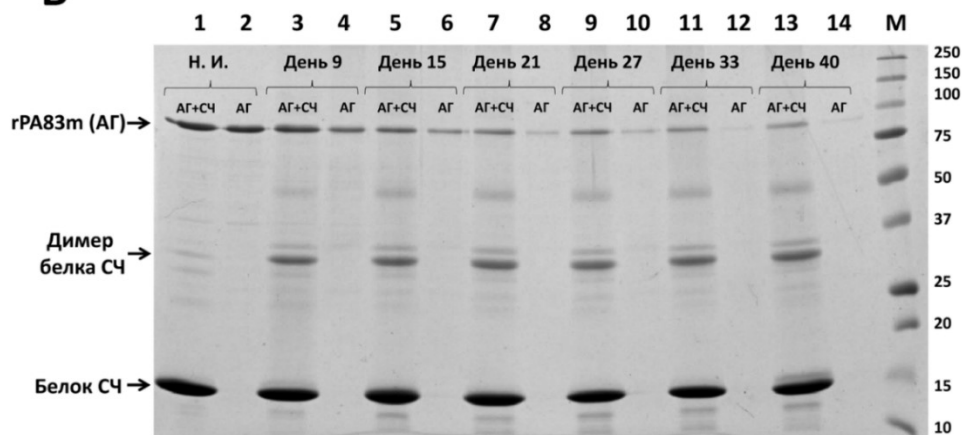
При дальнейшем изучении стабилизирующего эффекта СЧ свободный rPA83m и rPA83m в композиции с СЧ ВТМ инкубировали при +37 °С, для того чтобы моделировать ускоренное “состаривание” белка. Выбор условий инкубации был продиктован желанием проследить разницу в стабильности rPA83m в обоих препаратах вплоть до полной деградации белка в одном из них. Учитывая повышенную стабильность rPA83m по сравнению с rPA83, добиться этого при комнатной температуре и тем более при +4 °С за разумный временной промежуток не представлялось возможным.

В первую очередь, как и для немодифицированного rPA83, изучалась динамика содержания полноразмерной формы белка в препарате течение инкубации. В данном случае анализ предполагал статистическую обработку результатов, поэтому эксперимент был выполнен в пяти повторностях. Образцы свободного rPA83m и композиции rPA83m+СЧ инкубировали при +37 °С в течение 33 дней. Концентрация rPA83m составляла 0,1 мкг/мкл, концентрация СЧ ВТМ – 1 мкг/мкл. Отбор образцов для анализа проводился каждые 3 дня. Образцы исследовались методом электрофореза в 8-20% ДСН ПААГ. На каждый гель наносились пять опытных образцов с одинаковым временем инкубации и два контрольных образца (пробы аналогичного состава, не подвергнутые инкубации при +37 °С) для каждой группы. Для оценки стабилизирующего эффекта СЧ был введён показатель стабильности – величина, описывающая соотношение массы полноразмерной формы белка до и после инкубации. Показатель определялся по формуле $(X/X_{k1} + X/X_{k2})/2$, где X – объём полосы, соответствующей полноразмерной форме белка, в дорожке опытного образца, а X_{k1} и X_{k2} – аналогичная величина для двух контрольных образцов. Расчёты показателя стабильности здесь и далее осуществлялись с использованием программного обеспечения Image Lab™ Software Version 6.1 для гель-документирующей системы ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad Laboratories, США). Результаты исследования представлены на **Рисунке 12А**.

А



Б



Состав образца	Показатель стабильности					
	День 9	День 15	День 21	День 27	День 33	День 40
гРА83m+СЧ	0,79	0,56	0,38	0,29	0,24	0,23
гРА83m	0,53	0,3	0,11	0,09	0,04	0,05

Рисунок 12. СЧ ВТМ стабилизируют гРА83m при +37 °С

А. График, иллюстрирующий стабильность гРА83m свободного и в составе композиций с СЧ ВТМ. Планки погрешностей соответствуют 95% доверительным интервалам.

Б. Электрофоретический анализ стабилизирующего действия СЧ ВТМ на гРА83m.

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – композиция гРА83m+СЧ; **2, 4, 6, 8, 10, 12, 14** – свободный гРА83m. **1, 2** – неинкубированные образцы (Н.И.); **3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14** – образцы, инкубированные в течение 9, 15, 21, 27, 33 или 40 дней, соответственно. **М** – маркеры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены справа). **АГ** – антиген – гРА83m. Показатели стабильности гРА83m в виде свободного белка и в композиции с СЧ представлены в таблице. Они рассчитаны как среднее арифметическое из значений, полученных на основе результатов двух электрофоретических анализов (**Рисунок 12Б и Приложение 2**).

Каждая точка на графике представляет собой среднее геометрическое ($n = 5$) значений показателя стабильности в каждый день эксперимента для свободного rPA83m (**Рисунок 12А, красный график**) и rPA83m в составе композиций с СЧ ВТМ (**Рисунок 12А, синий график**). В каждый из дней инкубации показатель стабильности rPA83m в композиции с СЧ ВТМ значимо превышал показатель стабильности свободного rPA83m. В группе rPA83m+СЧ даже спустя 33 дня инкубации при +37 °С в недеградированной форме сохранилось более 30% от изначальной массы полноразмерного rPA83m, при том, что подобные условия хранения являются крайне жёсткими для белковых препаратов и, в частности, вакцин.

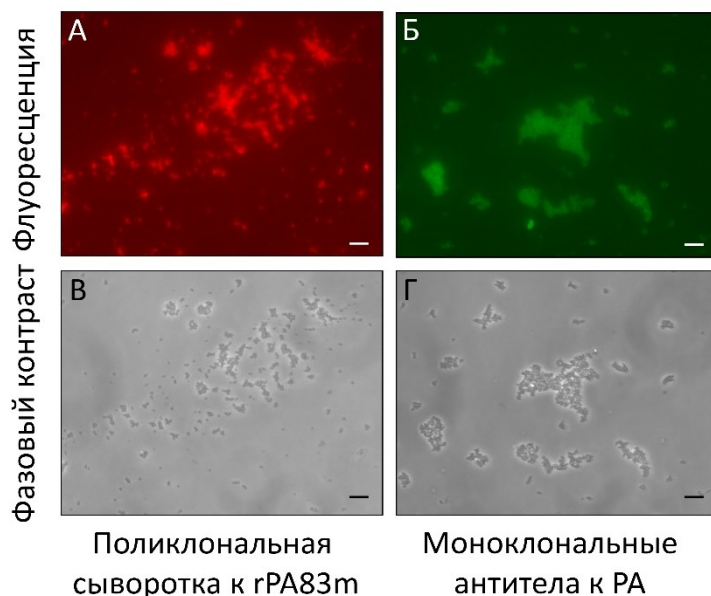
Для визуальной оценки результатов эксперимента был поставлен отдельный электрофорез в двух повторностях (пробы, проанализированные на каждом геле, инкубировались независимо друг от друга) (**Рисунок 12Б и Приложение 2**). На гель наносились пробы свободного rPA83m или rPA83m в композиции с СЧ ВТМ, инкубированные при +37 °С в течение 9, 15, 21, 27, 33 или 40 дней. После завершения инкубации все пробы хранились при -70 °С до анализа методом электрофореза. В препарате композиции rPA83m+СЧ ВТМ (**Рисунок 12Б и Приложение 2, дорожки 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13**) полоса, соответствующая полноразмерной форме rPA83m, с течением времени уменьшается намного медленнее, чем в случае свободного rPA83m (**Рисунок 12Б и Приложение 2, дорожки 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14**). Данные наблюдения подтверждаются значениями коэффициента стабильности для каждого препарата в каждой контрольной точке, приведёнными в таблице внизу **Рисунка 12Б**.

Таким образом, было показано, что при +37 °С стабильность rPA83m существенно повышается при адсорбции на поверхности СЧ ВТМ. В дополнение к общей стабильности антигена, важно удостовериться в отсутствии возникающих при хранении модификаций, не сопровождающихся разрывом полипептидной цепи или изменением заряда, но приводящих к потере белком своей антигенной специфичности. Так, при хранении rPA83 в

присутствии геля гидроксида алюминия Alhydrogel[®], который широко применяется как в лицензированных вакцинах (Biothrax[™] и CYPHENDUS[™]), так и в современных разработках вакцинных препаратов, происходят изменения в структуре белка, которые отражаются на профиле индуцируемых rPA83 антител и приводят к снижению их токсин-нейтрализующей активности (Wagner *et al.*, 2012). В связи с этим, была исследована способность поликлональной мышиной сыворотки к rPA83m и нейтрализующих МАТ к РА взаимодействовать с rPA83m в составе композиций rPA83m+СЧ, инкубированных при +37 °С в течение 40 дней. Взаимодействие антител с антигеном изучалось с помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии, результаты представлены на **Рисунке 13**. Аналогично эксперименту, результаты которого представлены на **Рисунке 11**, было показано, что и в “состаренных” образцах rPA83m остаётся адсорбированным на поверхности всех СЧ ВТМ и сохраняет свои антигенные свойства: возможность взаимодействовать и с поликлональной сывороткой к rPA83m (**Рисунок 13А**), и с нейтрализующими МАТ (**Рисунок 13Б**).

Инкубация при +37 °С

Опытные образцы



Отрицательные контроли без первичных антител

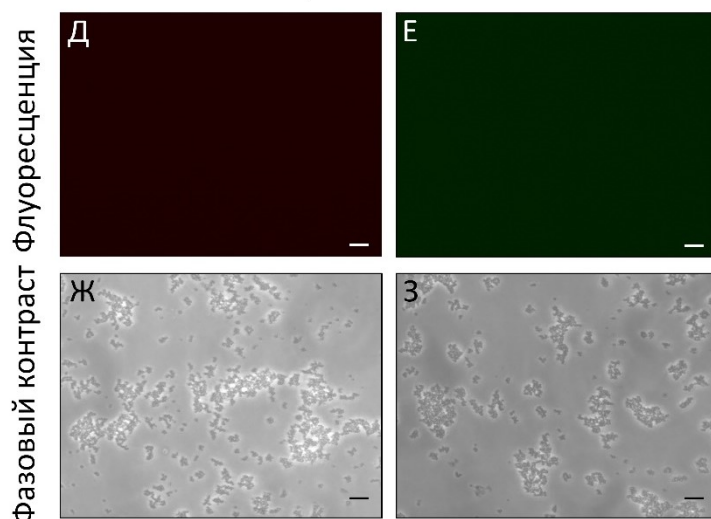


Рисунок 13. rPA83m сохраняет антигенную специфичность в составе композиций rPA83m+СЧ ВТМ, инкубированных при +37 °С в течение 40 дней

А, В. Композиция rPA83m+СЧ ВТМ, обработанная поликлональной мышинной сывороткой к rPA83m и вторичными противовидовыми антителами (мышь), конъюгированными с Alexa Fluor® 546.

Б, Г. Композиция rPA83m+СЧ ВТМ, обработанная химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА и вторичными противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с CFTM 488А.

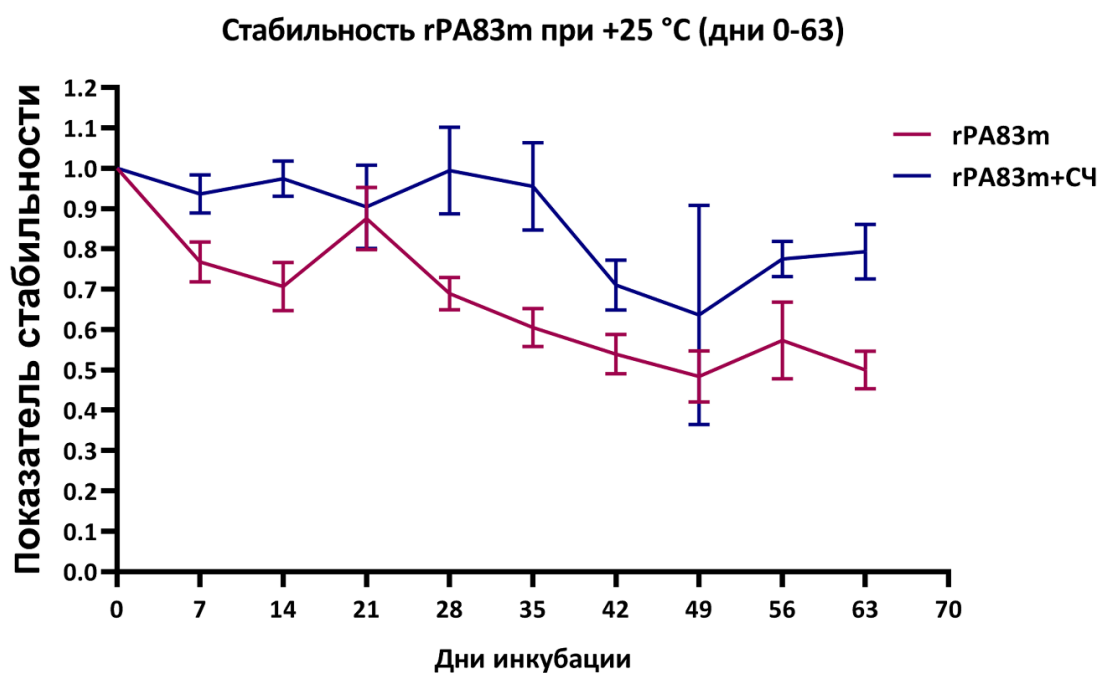
Д, Е, Ж, З. Препараты, аналогичные А, Б, В, Г, соответственно, не обработанные первичными антителами.

(А, В), (Б, Г), (Д, Ж), (Е, З) – изображения, попарно полученные в режиме флуоресценции и фазового контраста, соответственно.

Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.

В дополнение к исследованию стабильности полноразмерного rPA83m при +37 °C были проведены два аналогичных эксперимента при +25 °C (**Рисунок 14**) и +4 °C (**Рисунок 15**). Для “состаривания” при +25 °C потребовалось два независимых эксперимента. Сначала были подготовлены образцы с расчётом на 63 дня проведения опыта с отбором проб раз в неделю, но в результате стабильность свободного rPA83m оказалась выше ожидаемой: около 50% от изначальной массы полноразмерной формы белка сохранилось даже спустя 63 дня инкубации (**Рисунок 14А**). При этом во всех контрольных точках, кроме дней 21 и 49, для rPA83m в композиции с СЧ наблюдался значимо более высокий показатель стабильности, чем для свободного белка (отсутствие разницы на 21 и 49 день эксперимента, скорее всего, связано с техническими проблемами при выполнении анализа). Второй эксперимент (**Рисунок 14Б**) был поставлен в расчёте на гораздо более длинный временной промежуток и предусматривал отбор проб раз в две недели. В результате, коэффициент стабильности свободного rPA83m приблизился к значению 0,1 только на 231 день инкубации. При этом для rPA83m в композиции с СЧ это значение ни разу не опускалось ниже 0,45 и было значимо выше, чем в случае свободного белка, во всех контрольных точках, кроме дней 119 и 203 (что, скорее всего, также связано с техническими проблемами при выполнении анализа).

А



Б

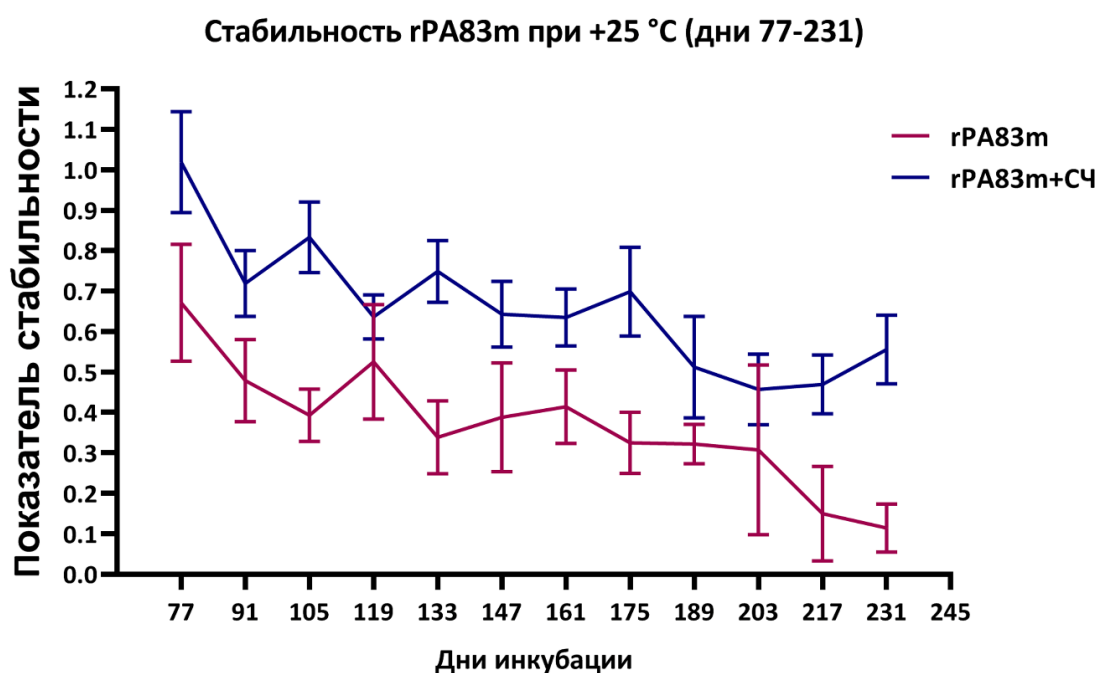


Рисунок 14. СЧ ВТМ стабилизируют rPA83m при +25 °C

Были проведены два независимых эксперимента: для дней 0-63 (А) и для дней 77-231 (Б). На графиках для каждого дня инкубации представлен показатель стабильности свободного rPA83m (красный) и rPA83m в составе композиции с СЧ (синий). Показатель стабильности был рассчитан путём сравнения инкубированных ($n = 5$, кроме группы rPA83m в дни 21, 91, 175, 203 и группы rPA83m+СЧ в день 175; в указанных $n = 4, 4, 3, 3$ и 4, соответственно) и двух неинкубированных образцов, использованных в качестве стандарта.

Планки погрешностей соответствуют 95% доверительным интервалам.

Показатель стабильности определён с помощью электрофореза в 8-20% ПААГ.

Аналогичный эксперимент при +4 °С был поставлен для изучения стабильности rPA83m в свободной форме и в композиции с СЧ ВТМ в стандартных условиях хранения вакцинных препаратов (**Рисунок 15**). Принимая во внимание, что инкубация rPA83m при +4 °С в течение 144 дней не привела к изменениям, заметным при электрофоретическом анализе (**Рисунок 9Б**), эксперимент был рассчитан на длительное время с отбором проб для анализа раз в 12 дней.

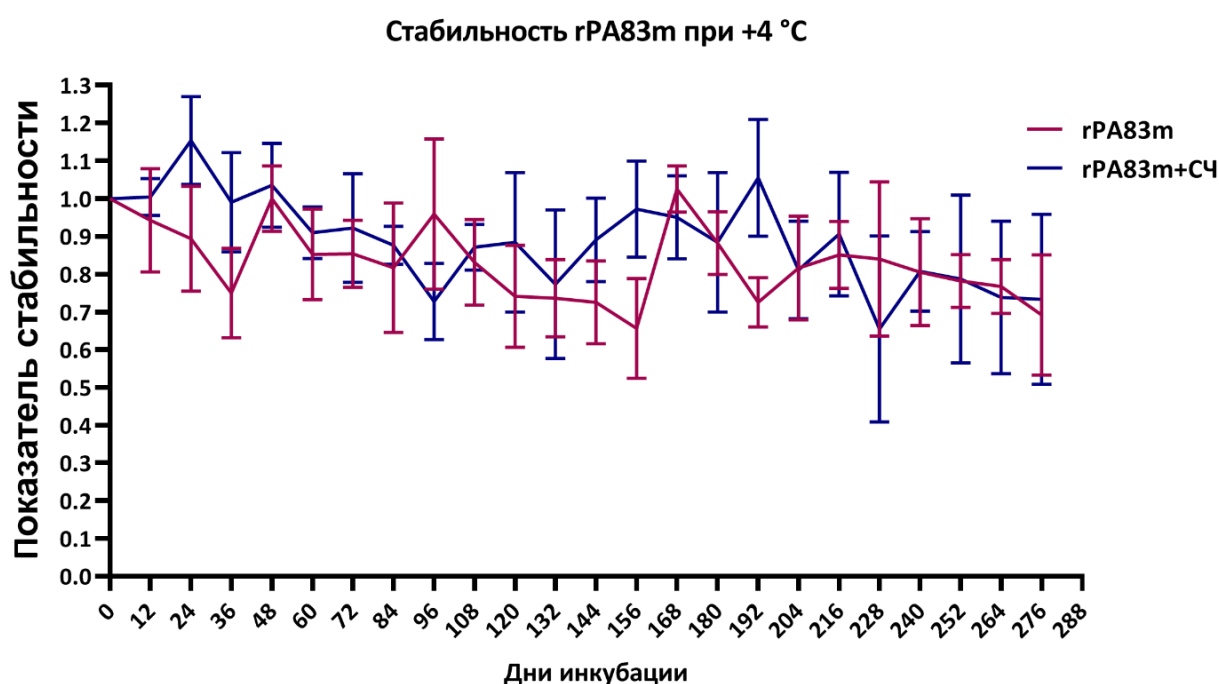


Рисунок 15. rPA83m обладает высокой стабильностью как в виде свободного белка, так и в композиции с СЧ ВТМ при +4 °С

На графике для каждого дня инкубации представлен показатель стабильности свободного rPA83m (красный) и rPA83m в составе композиции с СЧ (синий). Показатель стабильности был рассчитан путём сравнения инкубированных ($n = 5$, кроме группы rPA83m в день 72 и группы rPA83m+СЧ в день 264; в указанных точках $n = 4$ и 3, соответственно) и двух неинкубированных образцов, использованных в качестве стандарта.

Планки погрешностей соответствуют 95% доверительным интервалам.

Показатель стабильности определён с помощью электрофореза в 8-20% ПААГ.

В результате, спустя 276 дней инкубации в обеих группах сохранилось не менее 65% от изначальной массы белка в полноразмерной форме (**Рисунок 15**). В данном случае стабилизирующий эффект СЧ в отношении rPA83m не наблюдался, однако, скорее всего, это связано с высокой стабильностью

гРА83m даже без дополнительной стабилизации. Учитывая результаты, полученные при + 37 °С (Рисунок 12) и при +25 °С (Рисунок 14), можно предположить, что при более длительном хранении препаратов (год и более) стабилизирующий эффект СЧ ВТМ мог бы быть зафиксирован и при +4 °С.

Полученные результаты показали целесообразность комбинации двух подходов к стабилизации гРА83: внесения стабилизирующих аминокислотных замен в последовательность белка и использования платформы-стабилизатора. Композиция гРА83m и СЧ, легла в основу вакцинного кандидата против сибирской язвы, работа с которым была продолжена на животной модели.

3.5. Иммуногенность и протективность вакцинного кандидата – гРА83m в композиции с СЧ ВТМ

Следующим, ключевым этапом работы было определение иммуногенности и протективности вакцинного кандидата гРА83m+СЧ на морских свинках. Морские свинки – удобная летальная модель для изучения протективности вакцин против сибирской язвы. По сравнению с лабораторными мышами, морские свинки не столь восприимчивы к капсуле *B. anthracis*, что позволяет применять при инфицировании животных полностью вирулентные (токсиногенные инкапсулированные рХО1⁺, рХО2⁺) штаммы возбудителя. Это приближает экспериментальные условия к реальным при заражении человека или животного диким штаммом сибирской язвы. В случае же лабораторных мышей, для которых капсула бактерии является основным фактором вирулентности, даже проверенные варианты вакцин могут не демонстрировать протективности против рХО1⁺, рХО2⁺ штаммов *B. anthracis* (Welkos, Friedlander 1988; Welkos, 1991). Морские свинки являются одобренной моделью для тестирования эффективности АВА, согласно рекомендациям управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) (21 CFR 620.23).

Для оценки иммуногенности и протективности вакцинного кандидата (rPA83m в композиции с СЧ ВТМ) была произведена иммунизация морских свинок агути различными вариантами препаратов, содержащих rPA83m. Опытные препараты включали свободный rPA83m, композицию rPA83m+СЧ, комбинацию rPA83m+Al(OH)₃ (массовое соотношение антиген:платформа в обоих препаратах составляло 1:10), а также три аналогичных препарата, инкубированных в течение 27 дней при +37 °С (условия ускоренного “состаривания” белка). rPA83m в комбинации с Al(OH)₃ использовали в экспериментах для сравнения, поскольку применение Al(OH)₃ в качестве адъюванта – стандартный подход при создании вакцины против сибирской язвы (Brown *et al.*, 2010; Bellanti *et al.*, 2012). Иммунизация “состаренными” препаратами была проведена для оценки влияния стабилизации rPA83m с помощью СЧ ВТМ на сохранение иммуногенности и протективности вакцинного кандидата после длительного хранения. Длительность инкубации была подобрана на основании результатах анализа стабильности rPA83m, представленных на **Рисунке 12**. Инкубация в течение 27 дней при +37 °С приводит к разрушению половины полноразмерного rPA83m в композиции с СЧ ВТМ, а также более чем 80% полноразмерного белка в случае свободного антигена. При этом именно полноразмерный rPA83 способен обеспечить наиболее эффективное формирование протективного иммунного ответа против сибирской язвы (Abbound, Casadevall, 2008). В качестве контролей в эксперименте были использованы группы, иммунизированные СЧ или только PBS. Таким образом, было сформировано 8 групп морских свинок. Животные в каждой группе были дважды подкожно иммунизированы одним из опытных или контрольных препаратов с интервалом в 28 дней. Дизайн эксперимента и описание групп иммунизации представлены на **Рисунке 16**.



Морские свинки агути
Средний вес: 275 ± 25 г
Возраст: 6-8 недель



№ группы	Описание препарата	Инкубация	Количество животных	Выжило после первого заражения
1	rPA83m	-	10 (5 ♀+5 ♂)	10 (5 ♀+5 ♂)
2	rPA83m+СЧ	-	10 (5 ♀+5 ♂)	10 (5 ♀+5 ♂)
3	rPA83m + Al(OH) ₃	-	10 (5 ♀+5 ♂)	8 (5 ♀+3 ♂)
4	rPA83m	27 дней при +37 °С	10 (5 ♀+5 ♂)	10 (5 ♀+5 ♂)
5	rPA83m+СЧ	27 дней при +37 °С	10 (5 ♀+5 ♂)	9 (5 ♀+4 ♂)
6	rPA83m + Al(OH) ₃	27 дней при +37 °С	10 (5 ♀+5 ♂)	9 (4 ♀+5 ♂)
7 (контроль)	СЧ	-	5 (3 ♀+2 ♂)	4 (3 ♀+1 ♂)
8 (контроль)	PBS	-	5 (2 ♀+3 ♂)	3 (1 ♀+2 ♂)

Рисунок 16. Дизайн эксперимента по определению иммуногенности и протективности препаратов на основе rPA83m. Все препараты для иммунизации были приготовлены в PBS, объём пробы для иммунизации составлял 0,3 мл.

Спустя 48 дней после первой иммунизации был произведён отбор крови у всех морских свинок из каждой группы. До этого момента раз в 3 дня проводились измерения массы тела животных. На данном этапе эксперимента не было зафиксировано смертей, а также отклонений во внешнем виде или поведении ни в одной группе. Динамика веса морских свинок, иммунизированных опытными препаратами или СЧ ВТМ, не отличалась от динамики веса животных, иммунизированных только PBS. Графики, отражающие динамику веса животных в период с первой иммунизации до отбора крови, представлены в **Приложении 3**. Состояние лабораторных животных в период после иммунизации является одним из критериев безопасности вакцинных препаратов. Отсутствие отклонений у морских

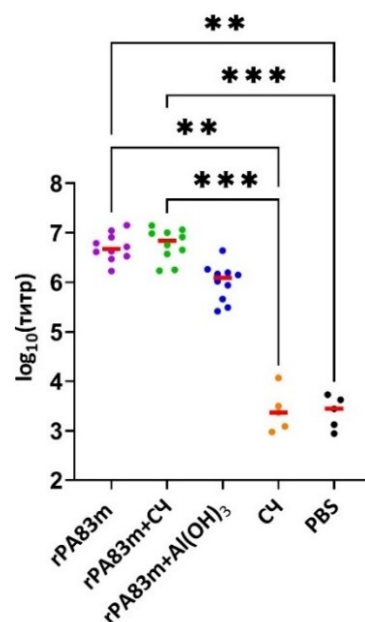
свинок говорит в пользу того, что rPA83m и СЧ ВТМ не оказывают негативного воздействия на организм млекопитающих.

Для сывороток крови каждого животного методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа был установлен титр IgG к rPA83m. Проводилось сравнение иммуногенности как неинкубированных (**Рисунок 17А**), так и инкубированных препаратов (**Рисунок 17Б**). Сравнение иммуногенности неинкубированных препаратов (**Рисунке 17А**) показало, что титры антител к rPA83m, индуцированные как свободным rPA83m (медиана титра $4,74 \times 10^6$), так и композицией rPA83m+СЧ (медиана титра $6,94 \times 10^6$), были статистически значимо выше, чем титры антител к rPA83m в сыворотках крови морских свинок, иммунизированных СЧ (медиана титра $1,80 \times 10^3$) или PBS (медиана титра $1,77 \times 10^3$). В то же время, в данном эксперименте не было выявлено разницы между титрами антител к rPA83m, выработанными в ответ на иммунизацию rPA83m+Al(OH)₃ (медиана титра $1,22 \times 10^6$) и любым из контрольных препаратов.

Таким образом, была продемонстрирована иммуногенность rPA83m как в свободной форме, так и в композиции с СЧ ВТМ. Важно отметить, что rPA83m оказался весьма иммуногенным белком даже в отсутствие адъюванта. По-видимому, это можно объяснить его большим размером. Как правило, иммуностимулирующее действие адъювантов ярко выражено именно в случае небольших антигенов. Поэтому, несмотря на то, что для СЧ ВТМ была ранее продемонстрирована способность усиливать иммунный ответ на различные рекомбинантные антигены вирусной природы с меньшей молекулярной массой (Trifonova *et al.*, 2017, Nikitin *et al.*, 2018c; Evtushenko *et al.*, 2020; Kurashova *et al.*, 2020; Kovalenko *et al.*, 2022), они не оказали влияния на титр антител, вырабатываемых к rPA83m. В нашем исследовании в первую очередь СЧ ВТМ были использованы в качестве стабилизатора для rPA83m. При этом, в отличие от гидроксида алюминия, СЧ ВТМ не оказали негативного влияния на иммуногенность rPA83m, что положительно характеризует их как платформу-носитель для данного белка.

А

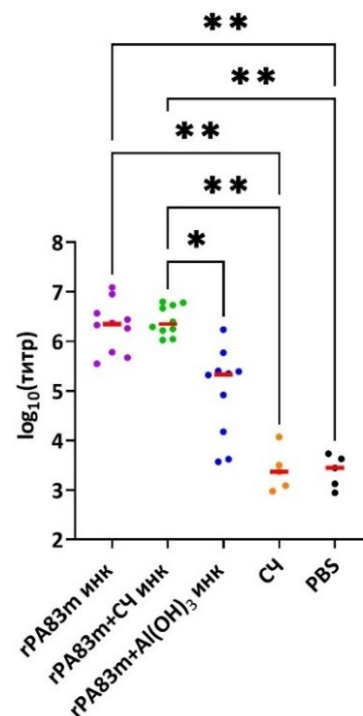
Сравнение иммуногенности неинкубированных препаратов rPA83m



Группа иммунизации	Медиана титров IgG к rPA83m
rPA83m	$4,73 \times 10^6$
rPA83m+C4	$6,94 \times 10^6$
rPA83m+Al(OH) ₃	$1,22 \times 10^6$
C4	$1,80 \times 10^3$
PBS	$1,77 \times 10^3$

Б

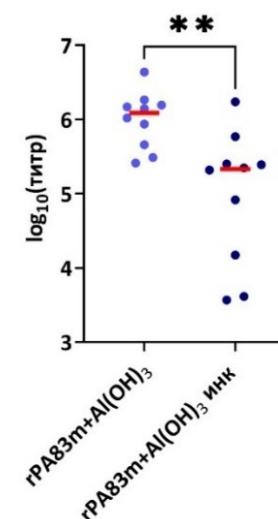
Сравнение иммуногенности препаратов rPA83m, инкубированных при +37 °C



Группа иммунизации	Медиана титров IgG к rPA83m
rPA83m инк	$2,23 \times 10^6$
rPA83m+C4 инк	$2,21 \times 10^6$
rPA83m+Al(OH) ₃ инк	$2,16 \times 10^5$
C4	$1,80 \times 10^3$
PBS	$1,77 \times 10^3$

В

Сравнение иммуногенности препаратов rPA83m+Al(OH)₃, неинкубированного и инкубированного при +37 °C



Группа иммунизации	Медиана титров IgG к rPA83m
rPA83m+Al(OH) ₃	$1,22 \times 10^6$
rPA83m+Al(OH) ₃ инк	$2,16 \times 10^5$

Рисунок 17. Сравнение иммуногенности различных препаратов rPA83m

А. Неинкубированные препараты rPA83m. **Б.** Препараты rPA83m, инкубированные 27 дней при +37 °C (инк) **В.** Сравнение иммуногенности неинкубированного и инкубированного препаратов rPA83m+Al(OH)₃. ●, титр сыворотки одной морской свинки; —, медиана.

Р-значения рассчитывались с использованием теста Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна для множественных сравнений (А, Б) или теста Уилкоксона-Манна-Уитни для сравнения двух групп (В). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Медианы титров IgG к rPA83m для каждой группы приведены в таблицах. Данные по титрам для каждого животного представлены в **Приложении 4**.

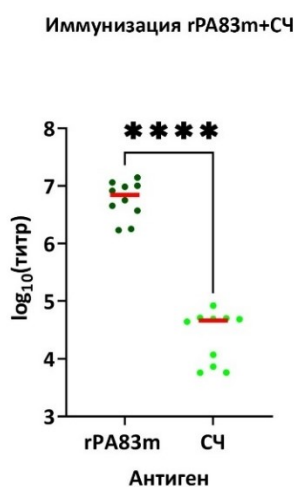
Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

В случае “состаренных” препаратов (**Рисунок 17Б**) наблюдалась аналогичная картина с одним важным дополнением. В данном случае иммуногенность rPA83m в композиции с СЧ ВТМ (медиана титра $2,21 \times 10^6$) была значимо выше, чем в комбинации с $Al(OH)_3$ (медиана титра $2,16 \times 10^5$), причём наблюдалась более чем десятикратная разница в значении титра антител. Более того, попарное сравнение иммуногенности каждого неинкубированного препарата с соответствующим инкубированным препаратом показало, что только в случае комбинации rPA83m с гидроксидом алюминия наблюдалось значимое падение иммуногенности в результате ускоренного “состаривания” белка (**Рисунок 17В**). В совокупности с опубликованными ранее исследованиями, демонстрирующими негативное влияние гидроксида алюминия на стабильность rPA83 (Wagner *et al.*, 2012), полученные результаты ещё раз подтверждают, что, несмотря на широкое использование, гидроксид алюминия не является оптимальным адъювантом-носителем для rPA83m. Данные по титрам IgG к rPA83m для каждого отдельного животного в каждой группе представлены в **Приложении 4**.

При характеристике вакцинного препарата, в состав которого помимо антигена входит носитель белковой природы, необходимо оценивать вклад антител, формируемых к такому носителю, в общий индуцируемый вакциной иммунный ответ. Для этого мы определили титры IgG к СЧ, вырабатываемые при иммунизации неинкубированным и инкубированным препаратами rPA83m+СЧ, а также СЧ и PBS. В сыворотках крови морских свинок, иммунизированных неинкубированным или инкубированным препаратом rPA83m+СЧ или только СЧ, наблюдалось формирование антител к СЧ. Титр антител к СЧ ВТМ в каждой из трёх групп был значимо выше, чем в группе, иммунизированной PBS. При этом различия между этими тремя группами обнаружено не было. Важно, что титр антител к rPA83m был статистически значимо выше титра антител к СЧ при иммунизации как неинкубированным (**Рисунок 18А**, медиана $6,94 \times 10^6$ против $4,63 \times 10^4$), так и инкубированным (**Рисунок 18Б**, медиана $2,21 \times 10^6$ против $2,35 \times 10^4$) препаратом rPA83m+СЧ. В

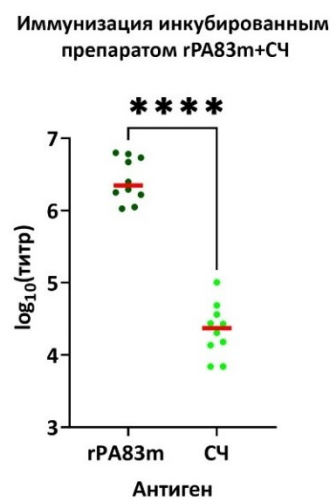
обоих случаях антител к rPA83m вырабатывалось примерно в 100 раз больше, чем к платформе-носителю. Данные по титрам IgG к СЧ для каждого отдельного животного в каждой группе представлены в **Приложении 5**. Полученные результаты соотносятся с проведёнными ранее исследованиями профиля антител, вырабатываемых при иммунизации вакцинными кандидатами на основе СЧ BTM против краснухи и SARS-CoV-2 (Trifonova *et al.*, 2017; Kovalenko *et al.*, 2022).

А



Неинкубированный препарат rPA83m+СЧ	
Антиген в ИФА	Медиана титров IgG
rPA83m	6,94x10 ⁶
СЧ	4,63x10 ⁴

Б



Инкубированный препарат rPA83m+СЧ	
Антиген в ИФА	Медиана титров IgG
rPA83m	2,21x10 ⁶
СЧ	2,35x10 ⁴

Рисунок 18. Вклад антител, вырабатываемых к СЧ BTM, в иммунный ответ на препарат rPA83m+СЧ BTM неинкубированный (**А**) и инкубированный 27 дней при +37 °С (**Б**)

●, титр сыворотки одной морской свинки; —, медиана.

P-значения рассчитывались с использованием теста Уилкоксона-Манна-Уитни.

*****P* < 0.0001.

Медианы титров IgG к rPA83m и к СЧ для каждой группы иммунизации приведены в таблицах внизу рисунка. Полные данные по титрам к СЧ представлены в **Приложении 5**. Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Дальнейшим этапом работы стало изучение протективности различных препаратов на основе rPA83m. На следующий день после отбора крови (49-й день после первой иммунизации) все морские свинки были подкожно заражены токсиногенным инкапсулированным (pXO1⁺, pXO2⁺) штаммом *B. anthracis* 81/1. Информация об LD₅₀ для данного штамма бактерии разнится в

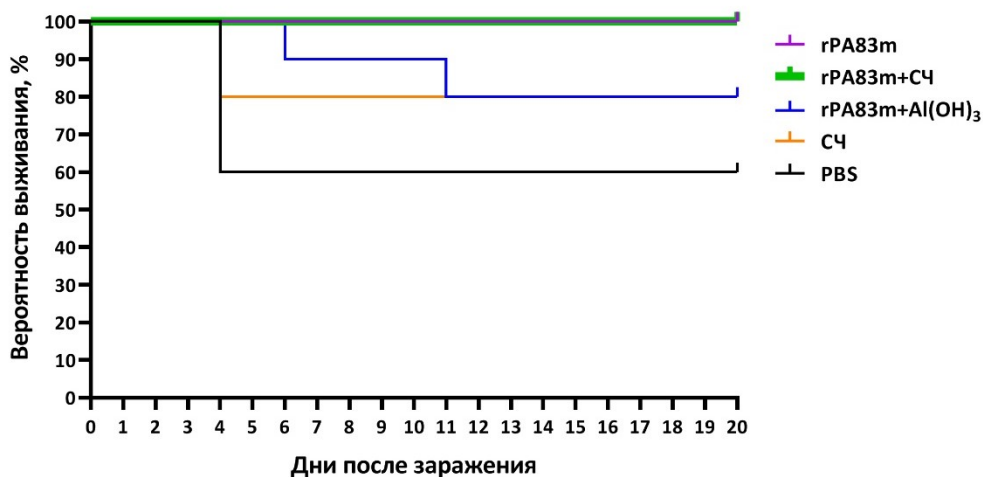
литературе. Согласно работе Buravtseva с соавторами, полулетальная доза для морских свинок лежит в промежутке 32-182 спор *B. anthracis* 81/1, а в более поздней работе Barkova с коллегами приводится значение LD₅₀, равное 20 спорам бактерии (Buravtseva *et al.*, 1999; Barkova *et al.*, 2005). В настоящем исследовании использовали усреднённое значение из этих двух работ и приняли LD₅₀ равной 50 спор на животное. Ранее было показано, что заражение полностью вирулентным штаммом (pXO1⁺, pXO2⁺) возбудителя сибирской язвы в дозе, равной эквиваленту 50 LD₅₀ *B. anthracis* штамма Ames (pXO1⁺, pXO2⁺) может привести к гибели животных даже в вакцинированной группе (Fellows *et al.*, 2007). На основании этих данных было принято решение использовать для заражения 50 LD₅₀ спор *B. anthracis* штамма 81/1, что составляет 2500 спор на животное. После заражения в течение 20 дней производился учёт смертности морских свинок в каждой группе. Результаты анализа представлены на **Рисунке 19**. Спустя 20 дней с момента заражения в группах, иммунизированных неинкубированными препаратами rPA83m, смертность не превышала 20%, в группах, иммунизированных инкубированными препаратами rPA83m – 10%, а также она не превышала 20% и 40% для контрольных групп, иммунизированных СЧ или PBS, соответственно. Статистических различий в выживаемости между различными экспериментальными группами обнаружено не было. Известно, что для каждой линии морских свинок и каждого штамма и даже изолята *B. anthracis* существуют свои летальные дозы возбудителя. По всей видимости, доза в 2500 спор на животное оказалась недостаточной для выявления разницы в способности сопротивляться инфекции между иммунными и неиммунными группами морских свинок.

Дизайн эксперимента



А

Протективность неинкубированных препаратов rPA83m



Б

Протективность препаратов rPA83m, инкубированных при +37 °C

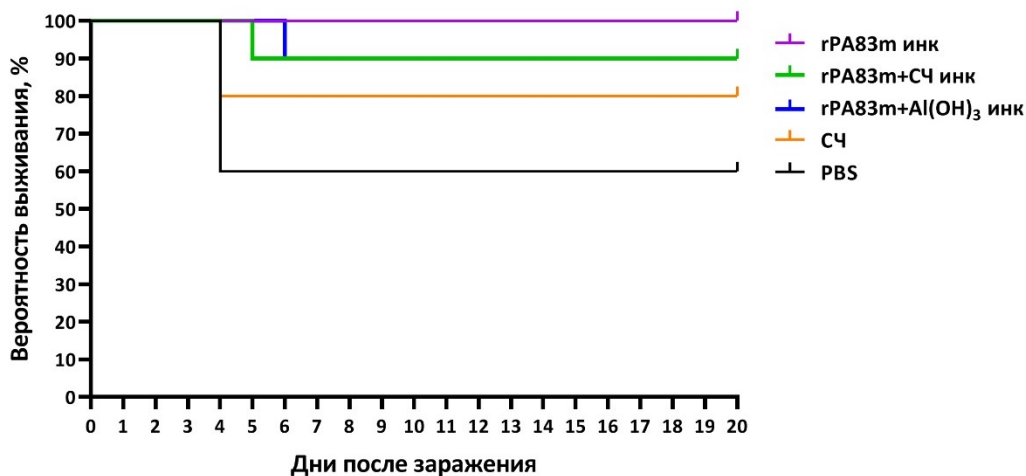


Рисунок 19. Протективность препаратов rPA83m при первом заражении морских свинок спорами *B. anthracis* штамма 81/1

Кривые выживаемости морских свинок, иммунизированных неинкубированными (А) или инкубированными 27 дней при +37 °C (инк) (Б) препаратами свободного rPA83m, rPA83m+CЧ ВТМ, rPA83m+Al(OH)₃, а также CЧ ВТМ или только PBS.

Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

В связи с низким уровнем смертности в контрольных группах, спустя 20 дней после первого заражения было проведено второе заражение выживших особей. Доза *B. anthracis* штамма 81/1 в этот раз была увеличена в десять раз и составила 25000 спор на животное. В течение 20 дней после второго заражения также производился учёт смертности морских свинок в каждой из групп. Результаты представлены на **Рисунке 20**. В группе морских свинок, иммунизированных только PBS, наблюдалась стопроцентная смертность уже на четвёртый день после заражения. Из этого можно сделать вывод, что даже если после первого заражения у животных произошло формирование иммунитета к *B. anthracis* 81/1, его в любом случае оказалось недостаточно для защиты против второго заражения большей дозой патогена. Следовательно, в опытных группах способность животных сопротивляться инфекции обусловлена именно протективным эффектом вакцинных препаратов. Выживаемость животных в группах, иммунизированных неинкубированными препаратами свободного rPA83m или композиции rPA83m с СЧ ВТМ, была статистически значимо выше, чем в контрольных группах (данные выживаемости в контрольных группах, иммунизированных СЧ или только PBS были объединены для формирования выборки адекватного размера). Более того, иммунизация препаратом rPA83m+СЧ обеспечила стопроцентную протективность против токсиногенного инкапсулированного штамма *B. anthracis* (**Рисунок 20А**, зелёный график). При этом выживаемость в группе, иммунизированной неинкубированным препаратом rPA83m в композиции с гидроксидом алюминия, не отличалась от контрольных групп, а также была статистически значимо ниже, чем в группе, иммунизированной композицией rPA83m с СЧ ВТМ. *P*-значения, полученные при сравнении выживаемости групп, иммунизированных неинкубированными препаратами rPA83m, и контрольных групп, приведены в таблице внизу **Рисунка 20А**. Таким образом, была показана протективность как свободного rPA83m, так и rPA83m в композиции с СЧ ВТМ. При этом продемонстрировано, что адсорбция на СЧ ВТМ не только не снижает иммуногенности антигена, но и не оказывает

негативного влияния на его протективные свойства. В совокупности с показанной ранее в настоящей работе способностью СЧ стабилизировать rPA83m, данная платформа представляется перспективной для применения в составе вакцины против сибирской язвы на основе модифицированного рекомбинантного протективного антигена *B. anthracis*. В то же время, гидроксид алюминия в очередной раз способствовал потере rPA83m его свойств, в данном случае уже не только иммуногенных, но и протективных.

Для изучения влияния “состаривания” белка при хранении на протективность препаратов rPA83m было проведено попарное сравнение выживаемости морских свинок в группах, иммунизированных неинкубированным и инкубированным препаратом свободного rPA83m, композиции rPA83m+СЧ ВТМ или комбинации rPA83m+Al(OH)₃. Ни в одном из трёх случаев статистически значимых различий в выживаемости обнаружено не было. То есть, инкубация в течение 27 дней при +37 °С не привела к падению протективных свойств ни одного препарата rPA83m. Это интересный результат, поскольку, как показано на **Рисунке 12**, за это время должно произойти практически десятикратное уменьшение количества полноразмерной формы антигена в растворе свободного rPA83m и всего лишь двукратное – в растворе композиции rPA83m+СЧ. Можно предположить, что отсутствие влияния “состаривания” вакцинных препаратов на их протективность связано с тем, что в эксперименте была использована избыточная доза антигена при иммунизации морских свинок. В таком случае, вероятно, аналогичный протективный эффект мог бы быть достигнут при иммунизации меньшей дозой rPA83m или даже при однократной иммунизации. Данный вопрос ещё предстоит детально изучить, поскольку снижение количества антигена и числа требуемых вакцинаций – важное потенциальное преимущество любого вакцинного кандидата.

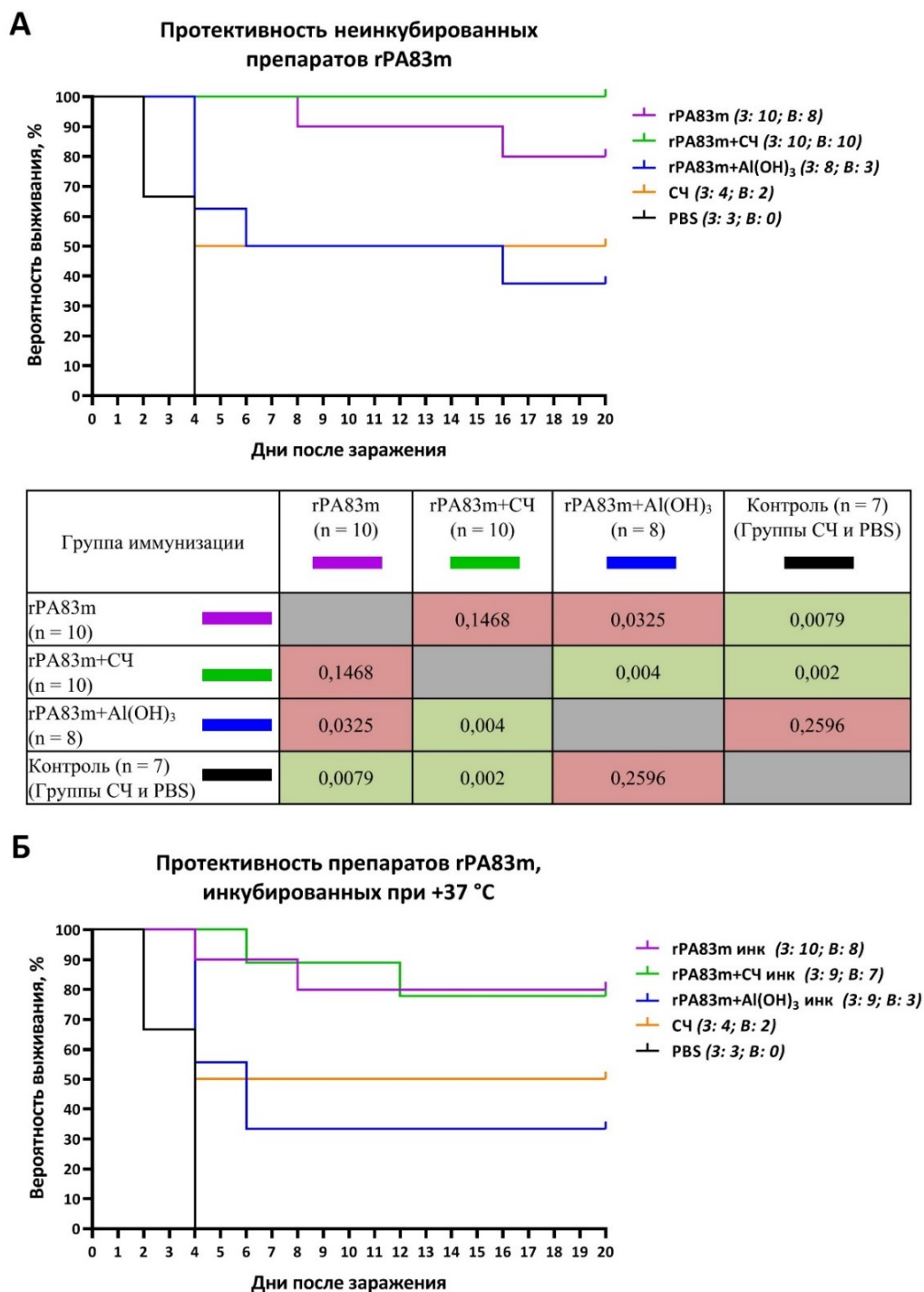


Рисунок 20. Протективность препаратов rPA83m при втором заражении морских свинок спорами *B. anthracis* штамма 81/1

На рисунке представлены кривые выживаемости морских свинок, иммунизированных неинкубированными (А) или инкубированными (Б) препаратами свободного rPA83m, rPA83m+CЧ ВТМ, rPA83m+Al(OH)₃, а также CЧ ВТМ или только PBS. В эксперименте участвовали морские свинки, выжившие в результате первого заражения. Для каждой группы справа от графика приведено количество морских свинок, подвергнутых заражению (З) и выживших спустя 21 день (В). В таблице представлены результаты сравнения выживаемости различных групп иммунизации неинкубированными препаратами rPA83m. Для сравнения показателей выживаемости использовался тест Гехана-Бреслоу-Уилкоксона, для корректировки *p*-значений при множественных сравнениях применялся метод Холма-Бонферрони.

Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

3.6. Создание и серологическая характеристика модифицированных рекомбинантных антигенов rPA(1+2)m и rPA(3+4)m

Композиция rPA83m – рекомбинантного РА с заменами в сайтах протеолиза и спонтанного дезаминирования – со сферическими частицами, полученными в результате термической перестройки ВТМ, продемонстрировала свою высокую стабильность, иммуногенность и стопроцентную протективность на морских свинках против полностью вирулентного (pXO1⁺, pXO2⁺) штамма *B. anthracis* 81/1. Для дальнейшего усовершенствования препарата мы решили исследовать возможность создания на основе СЧ ВТМ вакцины, содержащей два рекомбинантных антигена, первый из которых представляет собой домены I и II РА (rPA(1+2)m), а второй - домены III и IV РА (rPA(3+4)m). Как и в случае rPA83m, в антигене rPA(1+2)m фурин-чувствительный сайт РА ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ был заменён на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷, химотрипсин-чувствительный сайт ³¹³FF³¹⁴ делетирован, а остаток Asn¹⁶² был заменён на глутамин. В антигене rPA(3+4)m остатки Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ также были заменены на глутамин. Данный подход позволяет избежать экспрессии крупного (84,1 кДа) рекомбинантного белка за счёт перехода к использованию отдельно двух его частей. Это может упростить процесс получения вакцины, поскольку для накопления rPA83m с высокой долей полноразмерного белка при экспрессии в *E. coli* после добавления в культуру бактерий ИПТГ температуру в системе требовалось понизить до +20 °С. Из-за этого экспрессия rPA83m занимала больше времени. Экспрессия рекомбинантных белков меньшего размера в той же экспрессионной системе может оптимизировать процесс. Более того, меньшие по размеру антигены могут обладать большей стабильностью, при этом их комбинация обеспечивает присутствие полного набора нейтрализующих эпитопов РА в вакцинном препарате.

Схема строения антигенов rPA(1+2)m и rPA(3+4)m, а также их аминокислотные последовательности представлены на **Рисунке 21**.

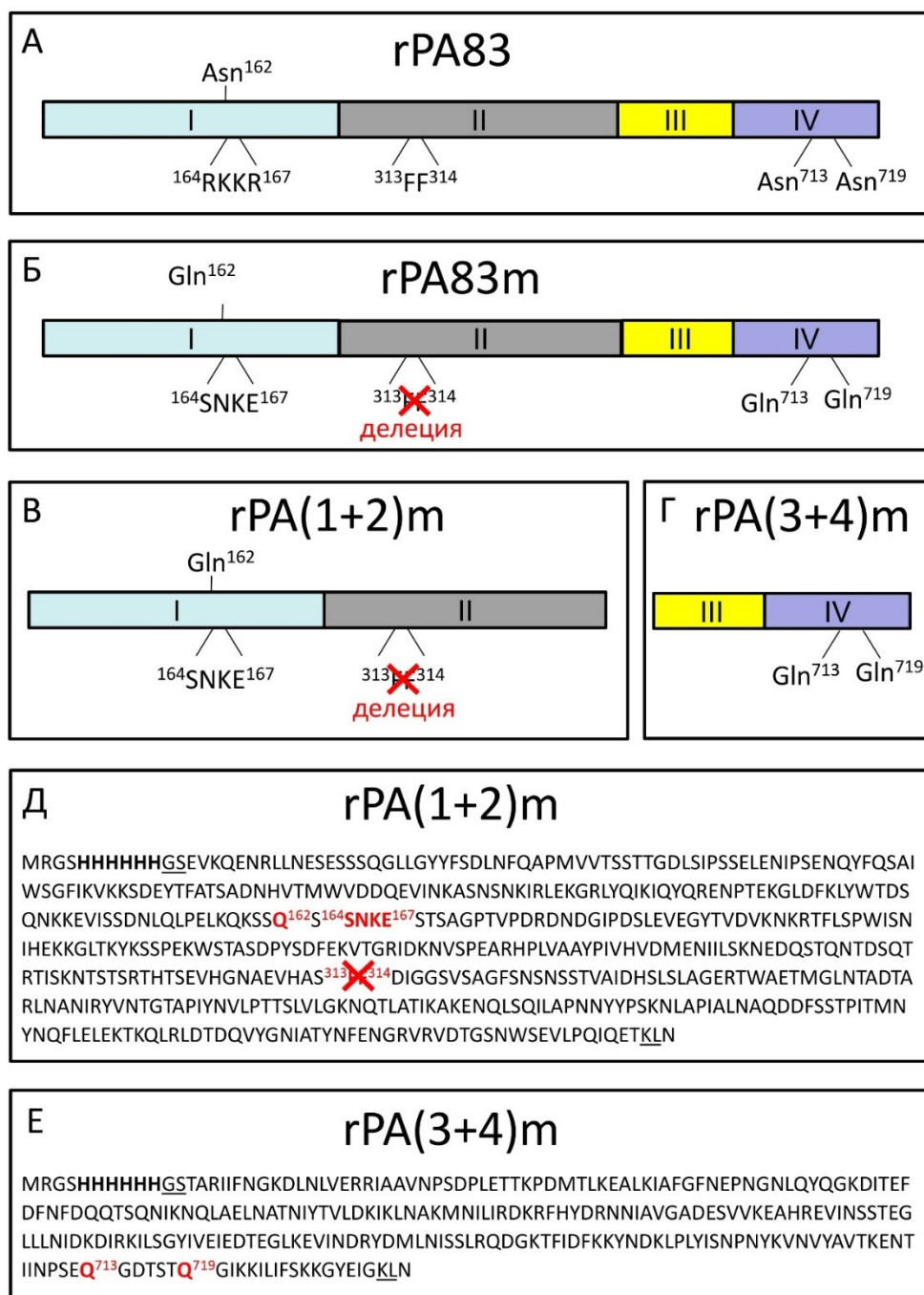


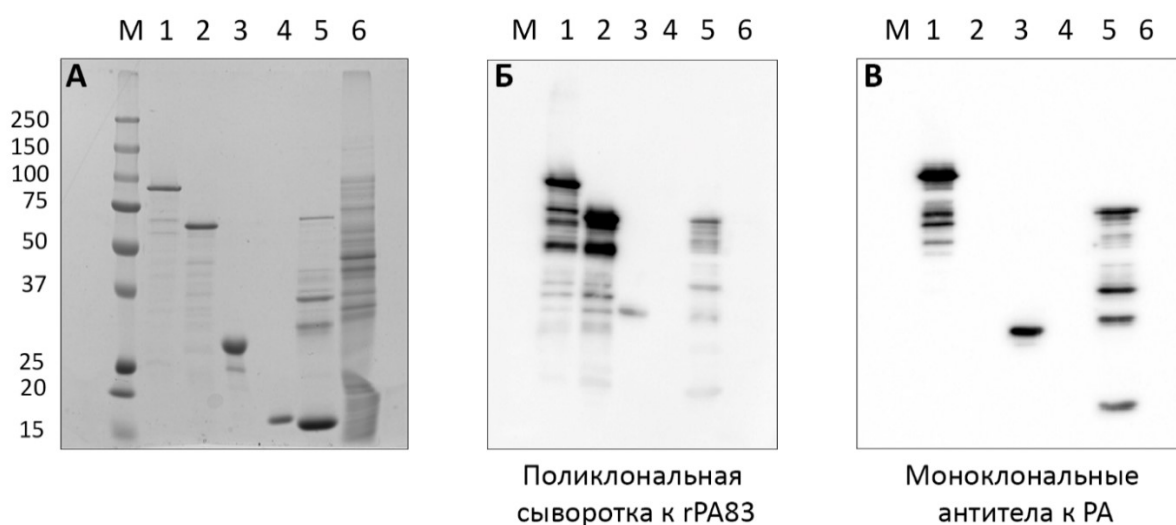
Рисунок 21. Сравнение доменной организации рекомбинантных антигенов rPA(1+2)m (**В**) и rPA(3+4)m (**Г**) с rPA83 (**А**) и rPA83m (**Б**)

rPA(1+2)m содержит I и II домены РА с заменами в фурин- и химотрипсин-чувствительных сайтах (в сайте расщепления фурином фрагмент ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ был заменён на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷, фрагмент ³¹³FF³¹⁴ в сайте расщепления химотрипсином был удалён), а также замену остатка Asn¹⁶² на Gln. rPA(3+4)m содержит III и IV домены РА с заменами остатков Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹ на Gln. rPA83m содержит все четыре домена РА со всеми заменами, произведёнными в последовательностях rPA(1+2)m и rPA(3+4)m.

Д, Е – аминокислотная последовательность rPA(1+2)m (**Д**) и rPA(3+4)m (**Е**). Замены выделены красным. Гексакгистиридиновая метка выделена жирным шрифтом. Аминокислотные остатки, соответствующие сайтам рестрикции, использованным для клонирования в вектор pQE-30, подчёркнуты. Номера аминокислотных остатков указаны в координатах полноразмерного нативного РА.

Ожидаемая молекулярная масса, рассчитанная по аминокислотной последовательности с помощью сервиса ProtParam EXPaSy (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://expasy.org/>), составила 56,1 кДа для rPA(1+2)m и 30 кДа для rPA(3+4)m. Разработанные последовательности rPA(1+2)m и rPA(3+4)m предназначены для экспрессии в *E. coli* и содержат гексагистидиновую метку для очистки методом металл-хелатной хроматографии. На основании аминокислотных последовательностей были получены экспрессионные конструкции pQE-30-rPA(1+2)m и pQE-30-rPA(3+4)m.

Белки rPA(1+2)m и rPA(3+4)m были экспрессированы в *E. coli* штамма SG13009, выделены и переведены в водный раствор методом диализа. Для данных белков, в отличие от rPA83m, экспрессия при +37 °C после добавления ИПТГ оказалась оптимальной. Это позволило сократить время получения рекомбинантного белка. Антигены были получены с высоким содержанием полноразмерной формы (**Рисунок 8А, дорожки 2 и 3**).



Повтор рисунка 8 со страницы 93. Взаимодействие rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с антителами к РА

А. Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

Б. Вестерн-блот с поликлональной мышинной сывороткой к rPA83.

В. Вестерн-блот с химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА.

Для обоих вестерн-блотов использовались вторичные противовидовые антитела (**Б** – мышь, **В** – человек), конъюгированные с пероксидазой хрена.

1 – rPA83m; **2** – rPA(1+2)m; **3** – rPA(3+4)m; **4** – вирус табачной мозаики (отрицательный контроль); **5** – rPA83 (положительный контроль); **6** – лизат клеток *E. coli* (отрицательный контроль). **М** - маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены слева).

Продemonстрировано, что оба белка эффективно взаимодействуют с поликлональной мышинной сывороткой к rPA83 (**Рисунок 8Б, дорожки 2 и 3**). При этом антиген rPA(3+4)m также взаимодействовал с нейтрализующими МАТ к РА, узнающими эпитоп в составе домена IV РА (**Рисунок 8В, дорожка 3**). Следовательно, антигенная специфичность обоих полученных двухдоменных рекомбинантных антигенов соответствует антигенной специфичности протективного антигена сибирской язвы, а rPA(3+4) достоверно содержит как минимум один нейтрализующий эпитоп.

3.7. Получение композиций rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ

На следующем этапе работы была изучена возможность получения композиций rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ, то есть, возможность адсорбции этих белков на поверхности СЧ с сохранением антигенной специфичности. Исследование проводилось с помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии, результаты представлены на **Рисунке 22**. Композиции rPA(1+2)m+СЧ (**Рисунок 22А,Г**) или rPA(3+4)m+СЧ (**Рисунок 22Б,В,Д,Е**) были обработаны поликлональной мышинной сывороткой к соответствующим рекомбинантным антигенам (**Рисунок 22А,Б,Г,Д**) или нейтрализующими МАТ к РА, которые узнают эпитоп в составе домена IV белка (**Рисунок 22В,Е**), а затем – противовидовыми вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором. Наличие в каждом опытном образце флуоресцентного сигнала (**Рисунок 22А,Б,В**), локализация которого совпадала с контурами СЧ, наблюдаемыми в соответствующих образцах в режиме фазового контраста (**Рисунок 22Г,Д,Е**), указывает на то, что оба антигена могут адсорбироваться на поверхности СЧ ВТМ. При адсорбции оба антигена сохраняют способность взаимодействовать с поликлональной сывороткой к соответствующему белку, а rPA(3+4)m – также и с нейтрализующими МАТ к РА. В **Приложении 6** представлены изображения аналогичных образцов, обработанных только вторичными антителами в отсутствие первичных антител (контроль). Отсутствие флуоресцентного сигнала в изображениях, полученных в режиме

флуоресценции (**Приложение 6А,Б,В**) подтверждает специфичность взаимодействия антител к РА с исследуемыми антигенами в данном эксперименте. Таким образом, как rPA(1+2)m, так и rPA(3+4)m способны адсорбироваться на поверхности СЧ с сохранением антигенной специфичности.

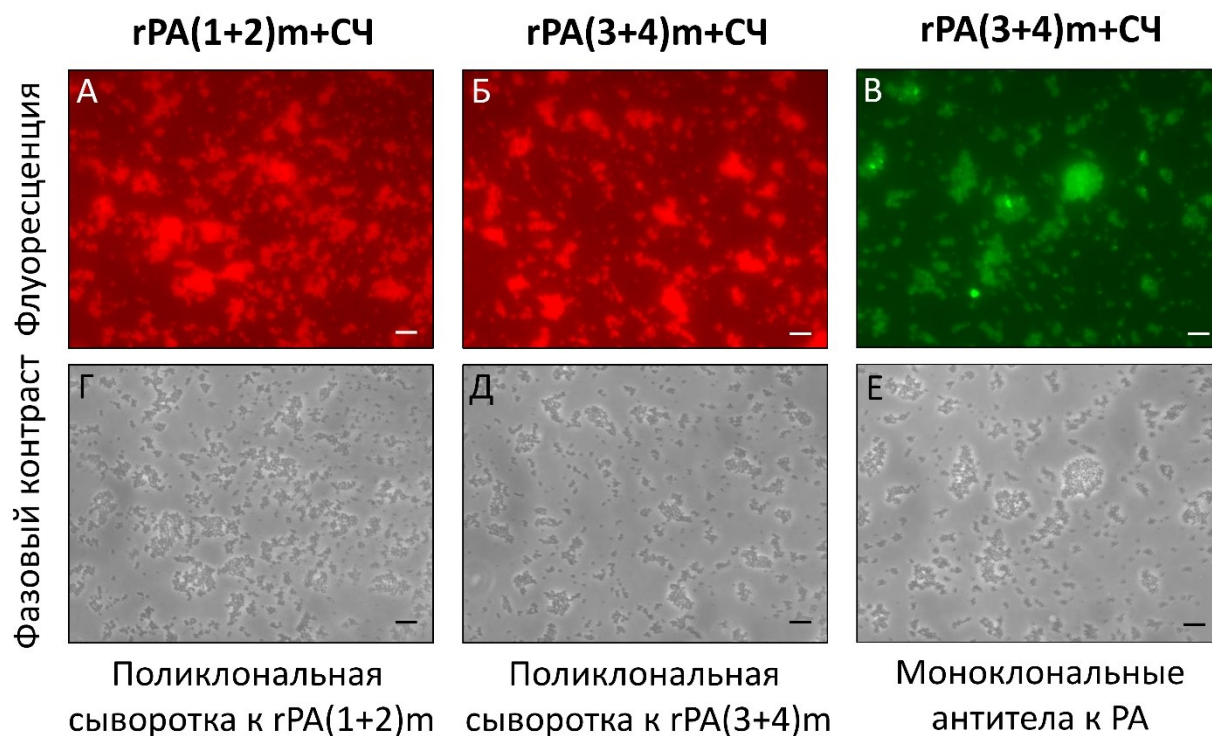


Рисунок 22. rPA(1+2)m+СЧ и rPA(3+4)m+СЧ адсорбируются на поверхности СЧ с сохранением антигенной специфичности

А, Б, Г, Д. Композиция rPA(1+2)m+СЧ (**А, Г**) или rPA(3+4)m+СЧ (**Б, Д**), обработанная поликлональной мышинной сывороткой к rPA(1+2)m+СЧ (**А, Г**) или rPA(3+4)m+СЧ (**Б, Д**) и вторичными противовидовыми антителами (мышь), конъюгированными с Alexa Fluor® 546. **В, Е.** Композиция rPA(3+4)m, обработанная химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА и вторичными противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с CF™ 488A.

(**А, Г**), (**Б, Д**), (**В, Е**) – изображения, попарно полученные в режиме флуоресценции и фазового контраста, соответственно. Изображения отрицательных контролей представлены в **Приложении 6**.

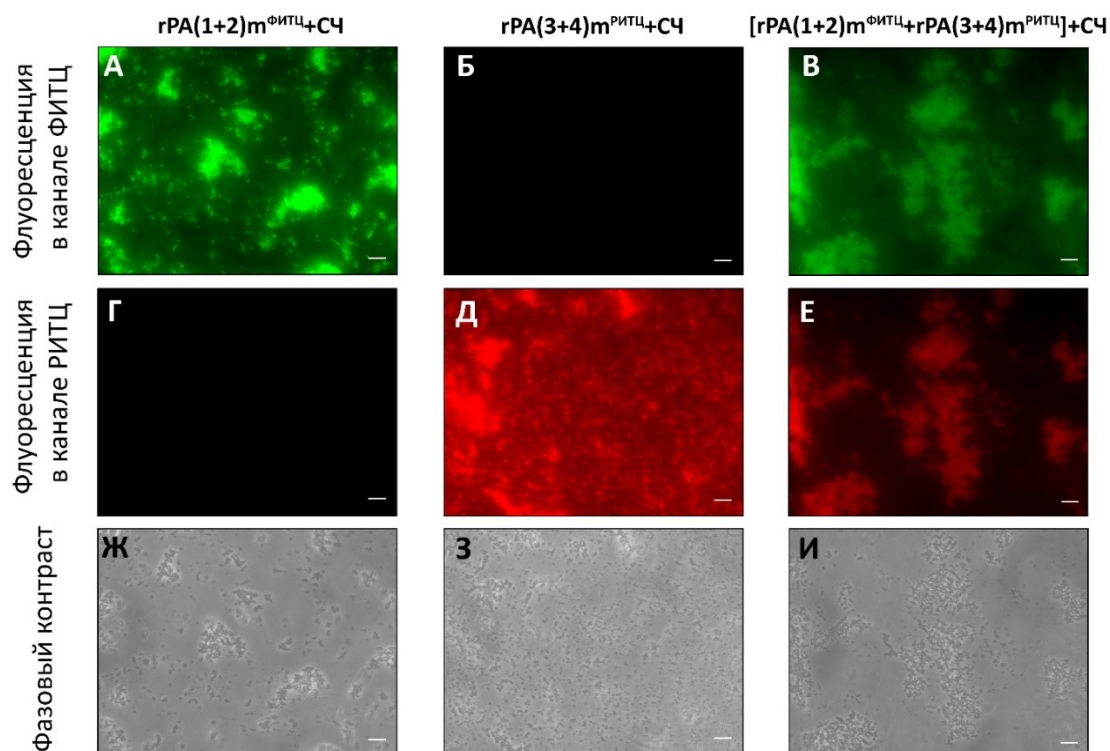
Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.

При разработке вакцинного препарата нам было важно продемонстрировать именно одновременную адсорбцию обоих полученных антигенов на поверхности СЧ ВТМ. Для подтверждения такой возможности rPA(1+2)m был конъюгирован с флуорофором ФИТЦ (флуоресцеин-5-

изотиоцианат), а белок rPA(3+4)m – с РИТЦ (родамин Б изотиоцианат). Использование двух разных флуорофоров позволяет детектировать одновременное присутствие в составе композиции обоих меченых антигенов. Корректность включения флуоресцентной метки в каждый антиген была подтверждена путём электрофоретического анализа в 8-20% ДСН ПААГ каждого из меченых антигенов (**Рисунок 23К,Л**). Красный флуоресцентный сигнал, характерный для РИТЦ, в **дорожке 1** ($\text{rPA}(3+4)\text{m}^{\text{РИТЦ}}$), на изображении неокрашенного геля, полученном под УФ излучением (**Рисунок 23К**), совпадает с полосой в **дорожке 1** на изображении того же геля, окрашенного Кумаси (**Рисунок 23Л**). Аналогичная картина наблюдается для зелёного флуоресцентного сигнала, характерного для ФИТЦ, в **дорожке 2** ($\text{rPA}(1+2)\text{m}^{\text{ФИТЦ}}$) (**Рисунок 23К,Л**).

Были получены композиции обоих меченых флуорофорами белков с СЧ ВТМ по отдельности (массовое соотношение антиген:СЧ = 1:10), а также композиция СЧ ВТМ одновременно с $\text{rPA}(1+2)\text{m}^{\text{ФИТЦ}}$ и $\text{rPA}(3+4)\text{m}^{\text{РИТЦ}}$. В данном случае для создания композиций с СЧ были использованы равные массы обоих антигенов, а суммарное массовое соотношение антиген:СЧ изменилось и составляло 1:5. Корректное формирование композиции обоих антигенов с СЧ также было подтверждено методом электрофоретического анализа (**Рисунок 23К,Л, дорожка 3**). Препараты всех трёх композиций СЧ с антигенами были исследованы методом флуоресцентной микроскопии. Результаты анализа представлены на **Рисунке 23А-И**. Однозначное соответствие зелёного сигнала во флуоресцентном канале ФИТЦ контурам частиц в препарате композиции СЧ ВТМ с меченым антигеном $\text{rPA}(1+2)\text{m}$ продемонстрировано на изображениях в левом столбце (**Рисунок 23А,Ж**). Аналогично, красный сигнал в канале РИТЦ однозначно соответствовал контурам частиц в препарате СЧ ВТМ с меченым антигеном $\text{rPA}(3+4)\text{m}$ (**Рисунок 23Д,З**). При этом наличие флуоресценции как в канале ФИТЦ, так и в канале РИТЦ, в случае композиций СЧ ВТМ с обоими мечеными антигенами

(Рисунок 23В,Е,И) достоверно указывает на факт одновременной адсорбции rPA(1+2)m и rPA(3+4)m на поверхности сферических частиц.



Контроль включения флуоресцентной метки в белки rPA(1+2)m и rPA(3+4)m

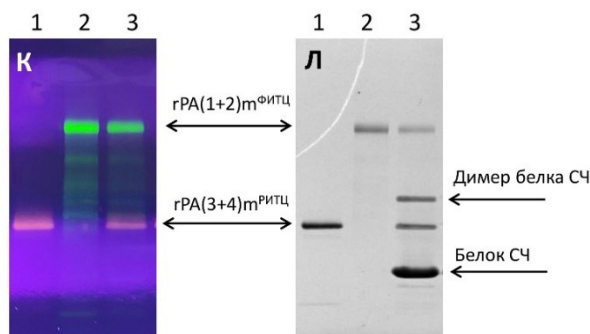


Рисунок 23. rPA(1+2)m и rPA(3+4)m могут быть одновременно адсорбированы на поверхности СЧ

А-И. Композиции СЧ с rPA(1+2)m, меченым ФИТЦ (rPA(1+2)m^{ФИТЦ}) (**А, Г, Ж**), с rPA(3+4)m, меченым РИТЦ (rPA(3+4)m^{РИТЦ}) (**Б, Д, З**), или с rPA(1+2)m^{ФИТЦ} и rPA(3+4)m^{РИТЦ} одновременно (**В, Е, И**). (**А, Б, В**), (**Г, Д, Е**), (**Ж, З, И**) – изображения, в группах по три полученные в режиме флуоресценции в канале ФИТЦ, флуоресценции в канале РИТЦ и фазового контраста, соответственно. Флуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.

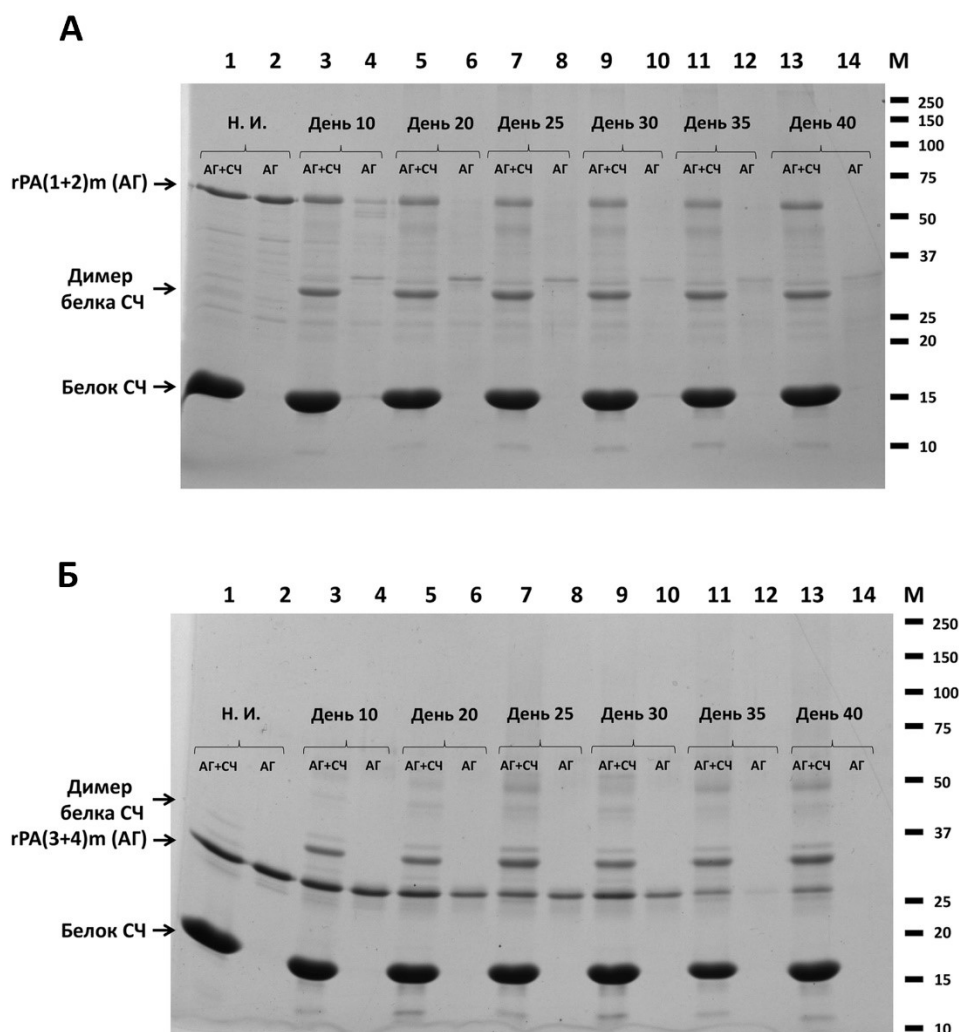
К, Л. Контрольный эксперимент, проверка включения флуоресцентной метки в белки rPA(1+2)m и rPA(3+4)m. **1** – rPA(3+4)m^{РИТЦ}; **2** – rPA(1+2)m^{ФИТЦ}; **3** – композиция rPA(3+4)m^{РИТЦ} и rPA(1+2)m^{ФИТЦ} с СЧ ВТМ. **К** - неокрашенный гель, изображение получено под УФ излучением. **Л** – гель, окрашенный Кумаси G-250.

Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ.

3.8. Стабильность rPA(1+2)m и rPA(3+4)m в композиции с СЧ ВТМ

Оценка стабильности rPA(1+2)m и rPA(3+4)m проводилась индивидуально для каждого из двух антигенов. rPA(1+2)m и rPA(3+4)m в свободной форме и в композиции с СЧ ВТМ были проинкубированы при +37 °С в течение 40 дней. Таким образом, “ускоренное состаривание” белка моделировалось аналогично тому, как ранее исследовалась стабильность rPA83m. Концентрация антигена составляла 0,1 мкг/мкл, концентрация СЧ ВТМ – 1 мкг/мкл. Каждые 5 дней производился отбор проб для анализа. Поскольку пробы анализировались одновременно на одном геле, после завершения инкубации все пробы хранились при -70 °С до момента анализа. Эксперимент был выполнен в двух повторностях (пробы, проанализированные на каждом геле, инкубировались независимо друг от друга), результаты электрофореза представлены на **Рисунке 24**, вторая повторность – в **Приложении 7**.

Видно, что полоса, соответствующая на геле полноразмерной форме rPA(1+2)m, в препарате свободного антигена практически не детектируется уже на 20 день эксперимента (**Рисунок 24А, дорожка 6**), при этом в препарате композиции rPA(1+2)m с СЧ она отчётливо видна даже спустя 40 дней инкубации (**Рисунок 24А, дорожка 13**). Таким образом, продемонстрировано явное увеличение стабильности rPA(1+2)m при комбинировании антигена с СЧ ВТМ. Стабилизирующая роль СЧ также была показана в случае композиции с rPA(3+4)m: в препарате свободного белка полоса, соответствующая его полноразмерной форме, практически не детектируется спустя 35 дней инкубации (**Рисунок 24Б, дорожка 12**), а в случае композиции антиген+СЧ она видна даже спустя 40 дней инкубации (**Рисунок 24Б, дорожка 13**). Данные наблюдения подтверждаются значениями коэффициента стабильности для каждого препарата обоих антигенов в каждой контрольной точке, приведёнными в таблице на **Рисунке 24**.



Белок	Состав образца	Показатель стабильности					
		День 10	День 20	День 25	День 30	День 35	День 40
rPA(1+2)m	rPA(1+2)m+C4	0,85	0,51	0,50	0,46	0,32	0,58
	rPA(1+2)m	0,23	0,08	0	0	0	0
rPA(3+4)m	rPA(3+4)m+C4	0,77	0,62	0,46	0,50	0,31	0,39
	rPA(3+4)m	0,645	0,29	0,39	0,19	0,06	0,05

Рисунок 24. СЧ стабилизируют rPA(1+2)m и rPA(3+4)m при +37 °С

А. rPA(1+2)m **Б.** rPA(3+4)m

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – композиция rPA(1+2)m или rPA(3+4)m с СЧ; **2, 4, 6, 8, 10, 12, 14** – свободный рекомбинантный антиген сибирской язвы. **1, 2** – неинкубированные образцы (Н.И.); **3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14** – образцы, инкубированные при +37 °С в течение 10, 20, 25, 30, 35 или 40 дней, соответственно. **М** – маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены справа). **АГ** – антиген – rPA(1+2)m (**А**) или rPA(3+4)m (**Б**)

Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

Показатели стабильности rPA(1+2)m и rPA(3+4)m свободного и в композиции с СЧ представлены в таблице внизу рисунка. Показатель стабильности для каждого дня рассчитан как среднее арифметическое из значений, полученных на основе результатов двух электрофоретических анализов (**Рисунок 24** и **Приложение 7**).

Из результатов, представленных на **Рисунке 24**, видно, что в свободной форме rPA(1+2)m менее стабилен, чем rPA(3+4)m. При этом стабилизирующий эффект СЧ ВТМ в случае rPA(1+2)m проявляется сильнее. Это может быть связано с большей молекулярной массой rPA(1+2)m (56,1 кДа по сравнению с 30 кДа для rPA(3+4)m). Данное наблюдение согласуется с предположением о том, что рекомбинантные белки с меньшей молекулярной массой, содержащие отдельные домены РА, могут обладать более высоким уровнем стабильности.

Стабилизирующие свойства СЧ ВТМ, показанные в этом эксперименте в отношении rPA(1+2)m и rPA(3+4)m, указывают на целесообразность использования данных частиц в вакцинном кандидате, содержащем оба двухдоменных рекомбинантных антигена. Для проверки сохранения рекомбинантными белками своих антигенных свойств композиции СЧ ВТМ с rPA(1+2)m и с rPA(3+4)m были исследованы методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии (**Рисунок 25, Приложение 8**). Дизайн опыта был полностью аналогичен эксперименту, результаты которого представлены на **Рисунке 22**, за исключением того, что в данном случае были использованы композиции антиген+СЧ, инкубированные при +37 °С в течение 40 дней. На изображениях, представленных на **Рисунке 25**, видно, что даже после “состаривания” в жёстких условиях rPA(1+2)m узнается поликлональной сывороткой к rPA(1+2)m (**Рисунок 25А,Г**), а rPA(3+4)m узнается как поликлональной сывороткой к rPA(3+4)m (**Рисунок 25Б,Д**), так и нейтрализующими МАТ к РА (**Рисунок 25В,Е**). Отсутствие флуоресцентного сигнала в образцах, обработанных только вторичными антителами в отсутствие первичных антител, подтверждает специфичность взаимодействия антигенов с антителами в данном эксперименте (**Приложение 8**). Следовательно, как и в случае с rPA83m, длительная инкубация при +37 °С не влияет на способность rPA(1+2)m и rPA(3+4)m адсорбироваться на поверхности СЧ ВТМ и не приводит к изменению антигенных свойств данных белков.

Инкубация при +37 °С

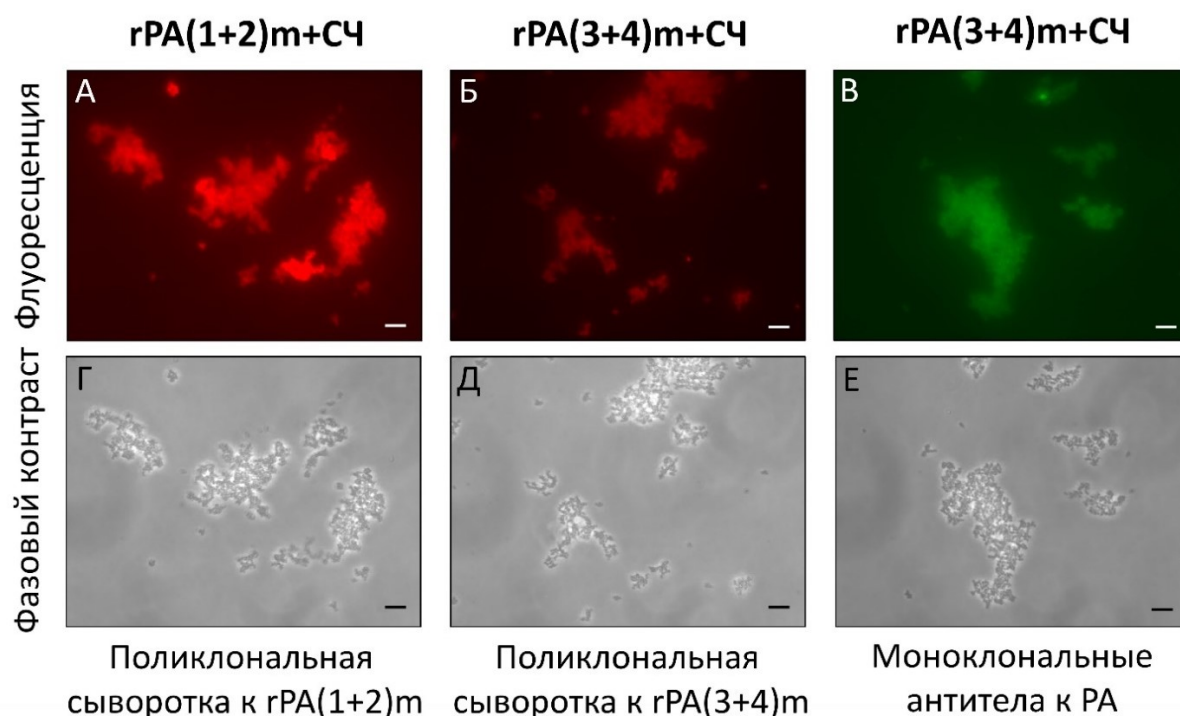


Рисунок 25. rPA(1+2)m и rPA(3+4)m сохраняют антигенную специфичность в составе композиций с СЧ, инкубированных при +37 °С в течение 40 дней

А, Б, Г, Д. Композиция rPA(1+2)m+CЧ (**А, Г**) или rPA(3+4)m+CЧ (**Б, Д**), обработанная поликлональной мышинной сывороткой к rPA(1+2)m+CЧ (**А, Г**) или rPA(3+4)m+CЧ (**Б, Д**) и вторичными противовидовыми антителами (мышь), конъюгированными с Alexa Fluor® 546.

В, Е. Композиция rPA(3+4)m, обработанная химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА и вторичными противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с CF™ 488A.

(А, Г), (Б, Д), (В, Е) – изображения, попарно полученные в режиме флуоресценции и фазового контраста, соответственно. Изображения отрицательных контролей представлены в **Приложении 8**.

Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.

Стабилизация rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с помощью СЧ ВТМ доказывает возможность использования данных частиц в вакцинном кандидате, содержащем оба рекомбинантных антигена, и еще раз подтверждает целесообразность применения СЧ ВТМ в качестве платформы-стабилизатора при разработке препаратов. В дальнейшем, безусловно, требуется дополнительное изучение иммуногенности и протективности данного варианта вакцинного кандидата на лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе создан и охарактеризован вакцинный кандидат против сибирской язвы на основе сферических частиц (СЧ), образованных в результате термической перестройки вируса табачной мозаики (ВТМ), и рекомбинантного модифицированного антигена сибирской язвы rPA83m.

Разработан и получен белок rPA83m – рекомбинантный полноразмерный протективный антиген (РА) *Bacillus anthracis*, в последовательность которого были внесены стабилизирующие замены. В сайте расщепления фурином фрагмент ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ был заменён на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷, в сайте расщепления химотрипсином была произведена делеция ³¹³FF³¹⁴. Аминокислотные остатки Asn¹⁶², Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹, подверженные спонтанному дезаминированию, были заменены на глутамин. Впервые одновременно внесены замены как в сайты протеолиза, так и в сайты спонтанного дезаминирования в протективном антигене сибирской язвы.

Показано, что rPA83m взаимодействует с поликлональной сывороткой и моноклональными нейтразующими антителами к РА, а также имеет более высокую стабильность, чем рекомбинантный РА (rРА).

В качестве второго подхода к стабилизации РА в настоящей работе впервые было предложено использование СЧ ВТМ как носителя для rPA83m. Продемонстрировано, что rPA83m способен адсорбироваться на поверхности СЧ ВТМ с сохранением антигенных свойств. При этом стабильность rPA83m в композиции с СЧ значительно увеличивалась по сравнению со свободным антигеном как при +25 °С, так и в условиях ускоренного “состаривания” белка при +37 °С. Впервые комбинация двух подходов: внесение замен в последовательность рекомбинантного РА и использование СЧ ВТМ в качестве платформы-носителя, – позволила добиться высокой стабильности полученного вакцинного кандидата.

Проведена иммунизация морских свинок свободным rPA83m, а также rPA83m в композиции с СЧ ВТМ или в комбинации с гидроксидом алюминия – стандартным адъювантом, применяемым в ряде лицензированных вакцин

против сибирской язвы. Для всех препаратов было изучено влияние инкубации +37 °С в течение 27 дней на их иммуногенность. Как свободный rPA83m, так и вакцинный кандидат rPA83m+СЧ ВТМ обеспечили выработку высокого титра антител к rPA83m при двукратной иммунизации. Важно отметить, что титр антител к СЧ как к платформе-носителю был примерно в сто раз меньше. “Состаривание” не повлияло на иммуногенность вакцинного препарата. При этом было показано, что инкубация в аналогичных условиях препарата, содержащего в качестве адъюванта для rPA83m гидроксид алюминия, приводит к более чем пятикратному снижению титра индуцируемых при иммунизации антител к rPA83m.

Иммунизация вакцинным кандидатом rPA83m+СЧ ВТМ обеспечила стопроцентную протективность на морских свинках при заражении полностью вирулентным штаммом *B. anthracis* 81/1. При этом в группе, иммунизированной rPA83m в комбинации с гидроксидом алюминия, в результате заражения остались в живых только 30% морских свинок. Искусственное “состаривание” препарата не оказало значимого негативного влияния на его протективные свойства. Полученные результаты позволяют предположить возможность сохранения протективного эффекта при иммунизации меньшей дозой вакцинного кандидата или даже при однократной иммунизации, что требует дальнейших исследований.

В качестве дополнительного варианта вакцинного кандидата против сибирской язвы была предложена композиция СЧ ВТМ одновременно с двумя двухдоменными антигенами: rPA(1+2)m (домены I и II PA) и rPA(3+4)m (домены III и IV PA), - в последовательности которых были внесены все аминокислотные замены, использованные при дизайне rPA83m. Продемонстрирована одновременная адсорбция обоих белков на поверхности СЧ ВТМ, а также стабилизация каждого антигена в присутствии СЧ.

Таким образом, в настоящей работе впервые был получен вакцинный кандидат против сибирской язвы с высоким уровнем стабильности, содержащий модифицированный полноразмерный рекомбинантный PA и

структурно модифицированные частицы вируса растений в качестве платформы-стабилизатора, который обеспечил формирование у морских свинок протективного иммунного ответа, достаточного для полной защиты от инфекции *B. anthracis*.

ВЫВОДЫ

1) Разработан и получен рекомбинантный антиген rPA83m – модифицированный протективный антиген *Bacillus anthracis* (PA) со стабилизирующими заменами в сайтах протеолиза и дезаминирования. Подтверждена его антигенная специфичность, а также показано, что rPA83m обладает большей стабильностью, чем немодифицированный рекомбинантный PA (rPA).

2) Сферические частицы (СЧ), образованные в результате термической перестройки вируса табачной мозаики (ВТМ), способны стабилизировать rPA и rPA83m, а также адсорбировать rPA83m, не изменяя его антигенную специфичность. Получен вакцинный кандидат – композиция rPA83m+СЧ ВТМ.

3) Свободный rPA83m и вакцинный кандидат rPA83m+СЧ иммуногенны, при этом иммуногенность обоих препаратов значимо не снижается в результате инкубации в течение 27 дней при +37 °С.

4) Вакцинный кандидат rPA83m+СЧ ВТМ обеспечивает протективность (100%) у морских свинок против полностью вирулентного штамма *B. anthracis*. Инкубация вакцинного кандидата в течение 27 дней при +37 °С не оказывает значимого влияния на его протективные свойства.

5) Разработаны и получены двухдоменные рекомбинантные антигены, представляющие собой модифицированные домены I и II PA – rPA(1+2)m – или домены III и IV PA – rPA(3+4)m – со стабилизирующими заменами в сайтах протеолиза и спонтанного дезаминирования, не изменяющими их антигенную специфичность.

6) СЧ ВТМ стабилизируют rPA(1+2)m и rPA(3+4)m, не изменяя их антигенные свойства. Показана возможность одновременной адсорбции rPA(1+2)m и rPA(3+4)m на поверхности СЧ ВТМ.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Лобзин Ю.В., Волжанин В.М., Захаренко С.М. Сибирская язва // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2002. Т. 4. № 2. С. 104-126.
2. Никитин Н. А., Трифонова Е.А., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Биобезопасность вирусов растений для человека и животных // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2016. №. 3.
3. Никитин Н.А., Малинин А.С., Рахнянская А.А., Трифонова Е.А., Карпова О.В., Ярославов А.А., Атабеков И.Г. Использование поликатионного спейсера для нековалентной иммобилизации альбумина на термически модифицированных вирусных частицах // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 2011. Т. 53. № 11. С. 1885-1891.
4. Никифоров В.В., Сорокина Н.А. Сибирская язва в Российской Федерации в 2023 году: два случая из практики // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2023. Т. 28. № 6. С. 387-400.
5. Панина А.А., Алиев Т.К., Топорова В.А., Свешников П.Г., Бикетов С.Ф., Долгих Д.А., Шемчукова О.Б. Нейтрализующие антитела против компонентов экзотоксина *Bacillus anthracis* // V Всероссийский симпозиум «Белки и пептиды». Доклад на конференции. 2011. Петрозаводск, Россия.
6. Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Малеев В.В., Плоскирева А.А., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году, эпидемиологические особенности // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016. № 4. С. 42-46.
7. Рязанова А.Г., Скударева О.Н., Герасименко Д.К., Головинская Т.М., Логвин Ф.В., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Еременко Е.И., Печковский Г.А., Олейникова К.А., Никитина А.В., Куличенко А.Н. Анализ эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по сибирской язве в 2023 г. в мире, прогноз на 2024 г. в Российской Федерации // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024. № 3. С. 35–41.
8. Рязанова А.Г., Скударева О.Н., Герасименко Д.К., Логвин Ф.В., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Еременко Е.И., Головинская Т.М., Печковский Г.А., Куличенко, А. Н. Анализ ситуации по сибирской язве в 2022 г. в мире, прогноз на 2023 г. в Российской Федерации // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023. № 2. 88-94.
9. Трифонова Е.А., Никитин Н.А., Архипенко М.В., Донченко Е.К., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Сравнительное изучение термической

перестройки вирусов с икосаэдрическим и спиральным типом симметрии // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2017. Т. 72. № 4. С. 209-214.

10. Трифонова Е.А., Никитин Н.А., Кирпичников М.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Способ получения и характеристика сферических частиц - новых биогенных платформ // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2015. № 4. С. 46-50.

11. Ясюкевич В.В., Ясюкевич Н.В. Сибирская язва // *Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем*. 2016. Т. 27. № 2. С. 87-101.

12. Abboud N., Casadevall A. Immunogenicity of Bacillus anthracis protective antigen domains and efficacy of elicited antibody responses depend on host genetic background // *Clinical and vaccine immunology*. 2008. P. 15. № 7. P. 1115-1123.

13. Abrami L., Lindsay M., Parton R.G., Leppla S.H., van der Goot, F. G. Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway // *The Journal of cell biology*. 2004. V. 166. № 5. P. 645-651

14. Abrami L., Liu S., Cosson P., Leppla S. H., van der Goot, F. G. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process // *The Journal of cell biology*. 2003. V. 160. № 3. P. 321-328.

15. Abrami L., Reig N., van der Goot F.G. Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill // *Trends in microbiology*. 2005. V. 13. № 2. P. 72-78.

16. Akintunde G., Drohic B., Bedell L., Gan L., Kim J., Beah M., Ghinai I., Collado S.B. 368. A Phase 3, Randomized, Double-blind, Parallel-group Trial to Evaluate the Immunogenicity and Safety of AV7909 for Post-exposure Prophylaxis of Anthrax in Healthy Adults // *Open Forum Infectious Diseases*. 2023. V.10. P. ofad500.438.

17. Aloni-Grinstein, R., Gat, O., Altboum, Z., Velan, B., Cohen, S., Shafferman, A. Oral spore vaccine based on live attenuated nontoxinogenic Bacillus anthracis expressing recombinant mutant protective antigen // *Infection and immunity*. 2005. V. 73. № 7. P. 4043-4053.

18. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // *Journal of General Virology*. 2011. V. 92. № 2. P. 453-456.

19. Aziz M. A., Sikriwal D., Singh S., Jarugula S., Anand Kumar P., Bhatnagar R. Transformation of an edible crop with the pagA gene of Bacillus anthracis // *The FASEB journal*. 2005. V. 19. № 11. P. 1501-1503.

20. Aziz M.A., Singh S., Kumar P.A., Bhatnagar R. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax //

Biochemical and biophysical research communications. 2002. V. 299. № 3. P. 345-351.

21. Baillie L., Read T. D. *Bacillus anthracis*, a bug with attitude! // *Current opinion in microbiology*. 2001. V. 4. № 1. P. 78-81.

22. Baillie L.W., Huwar T.B., Moore S., Mellado-Sanchez G., Rodriguez L., Neeson B.N., Flick-Smith H.C., Jenner D.C., Atkins H.S., Ingram R.J., Altmann D.M., Nataro J.P., Pasetti M.F. An anthrax subunit vaccine candidate based on protective regions of *Bacillus anthracis* protective antigen and lethal factor // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 41. P. 6740-6748.

23. Bellanti J.A., Lin F.Y., Chu C., Shiloach J., Leppla S.H., Benavides G.A., Karpas A., Moayeri M., Guo C., Robbins J.B., Schneerson R. Phase 1 study of a recombinant mutant protective antigen of *Bacillus anthracis* // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. V. 9. № 2. 140-145.

24. Bento D., Staats H.F., Borges O. Effect of particulate adjuvant on the anthrax protective antigen dose required for effective nasal vaccination // *Vaccine*. V. 33. № 31. P. 3609-3613.

25. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Research*. 2000. V. 28. № 1. P. 235-242.

26. Bielinska A.U., Janczak K.W., Landers J.J., Makidon P., Sower L.E., Peterson J.W., Baker Jr J.R. Mucosal immunization with a novel nanoemulsion-based recombinant anthrax protective antigen vaccine protects against *Bacillus anthracis* spore challenge // *Infection and immunity*. 2007. V. 75. № 8. P. 4020-4029.

27. Blaustein R.O., Koehler T.M., Collier R.J., Finkelstein, A. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989. V. 86. № 7. P. 2209-2213.

28. Brachman P.S. Bioterrorism: an update with a focus on anthrax // *American journal of epidemiology*. 2002. V. 155. № 11. P. 981-987.

29. Brachman P.S. Inhalation anthrax // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1980. V. 353. № 1. P. 83-93.

30. Bradley K. A., Mogridge J., Mourez M., Collier R. J., Young J. A. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin // *Nature*. 2001. V. 414. № 6860. P. 225.

31. Bromberg-White J., Lee C.S., Duesbery N. Consequences and utility of the zinc-dependent metalloprotease activity of anthrax lethal toxin // *Toxins*. 2010. V. 2. № 5. P. 1038-1053.

32. Brossier F., Lévy M., Landier A., Lafaye P., Mock M. Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies // *Infection and immunity*. 2004. V. 72. № 11. P. 6313-6317.
33. Brown B.K., Cox J., Gillis A., VanCott T.C., Marovich M., Milazzo M., Antonille T.S., Wiczorek L., McKee K.T. Jr, Metcalfe K., Mallory R.M., Birx D., Polonis V.R., Robb M.L. Phase I study of safety and immunogenicity of an *Escherichia coli*-derived recombinant protective antigen (rPA) vaccine to prevent anthrax in adults // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 11. P. e13849.
34. Bruckman M., Randolph L., VanMeter A., Hern S., Shoffstall A., Taurog R., Steinmetz N.F. Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and-spheres in mice // *Virology*. 2014a. V. 449. P. 163-173.
35. Bruckman M.A., VanMeter A., Steinmetz N.F. Nanomanufacturing of tobacco mosaic virus-based spherical biomaterials using a continuous flow method // *ACS biomaterials science & engineering*. 2014b. V. 1. № 1. P. 13-18.
36. Campbell J. D., Clement K.H., Wasserman S.A., Donegan S., Chrisley L., Kotloff, K. L. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a recombinant protective antigen anthrax vaccine given to healthy adults // *Human vaccines*. 2007. V. 3. № 5. P. 205-211.
37. Chabot D.J., Joyce J., Caulfield M., Cook J., Hepler R., Wang S., Vietri N.J., Ruthel G., Shoop W., Pitt L., Leffel E., Ribot W., Friedlander A.M. Efficacy of a capsule conjugate vaccine against inhalational anthrax in rabbits and monkeys // *Vaccine*. 2012. V. 30. № 5. P. 846-852.
38. Chen L., Schiffer J.M., Dalton S., Sabourin C.L., Niemuth N.A., Plikaytis B.D., Quinn C.P. Comprehensive analysis and selection of anthrax vaccine adsorbed immune correlates of protection in rhesus macaques // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2014. V. 21. № 11. P. 1512-1520.
39. Chen Z., Moayeri M., Zhao H., Crown D., Leppla S.H., Purcell R.H. Potent neutralization of anthrax edema toxin by a humanized monoclonal antibody that competes with calmodulin for edema factor binding // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. V. 106. № 32. P. 13487-13492.
40. Chen Z., Schneerson R., Lovchik J.A., Dai Z., Kubler-Kielb J., Agulto L., Leppla S.H., Purcell R.H. *Bacillus anthracis* Capsular Conjugates Elicit Chimpanzee Polyclonal Antibodies That Protect Mice from Pulmonary Anthrax. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2015. V. 22. № 8. P. 902-908.
41. Chichester J.A., Manceva S.D., Rhee A., Coffin M.V., Musiyshuk K., Mett V., Shamloul M., Norikane J., Streatfield S.J., Yusibov V. A plant-produced protective antigen vaccine confers protection in rabbits against a lethal aerosolized

challenge with *Bacillus anthracis* Ames spores // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2013. V. 9. № 3. P. 544-552.

42. Cleland J.L., Powell M.F., Shire S.J. The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation // *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1993. V. 10. № 4. 307-377.

43. Collier R.J. Membrane translocation by anthrax toxin // *Molecular Aspects of Medicine*. 2009. V. 30. № 6. P. 413-422.

44. Collier R.J., Young J. A.T. Anthrax toxin // *Annual review of cell and developmental biology*. 2003. V. 19. № 1. P. 45-70.

45. Crowe S.R., Ash L.L., Engler R.J.M., Ballard J.D., Harley J.B., Farris A.D., James J.A. Select human anthrax protective antigen epitope-specific antibodies provide protection from lethal toxin challenge // *The Journal of infectious diseases*. 2010. V. 202. № 2. P. 251-260.

46. Cunningham K., Lacy D.B., Mogridge J., Collier R.J. Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. V. 99. № 10. P. 7049-53.

47. D'Souza A.J.M, Mar K.D., Huang J., Majumdar S., Ford B.M., Dyas B., Ulrich R.G., Sullivan V.J. Rapid deamidation of recombinant protective antigen when adsorbed on aluminum hydroxide gel correlates with reduced potency of vaccine // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2013. V. 102. № 2. P. 454-461.

48. Davod J., Fatemeh D.N., Honari H., Hosseini R. Constructing and transient expression of a gene cassette containing edible vaccine elements and shigellosis, anthrax and cholera recombinant antigens in tomato // *Molecular biology reports*. 2018. V. 45 № 6. P. 2237-2246.

49. Dirckx J.H. Virgil on anthrax // *The American Journal of Dermatopathology*. 1981. V. 3. №. 2. P. 191-196.

50. Laforce F.M. Woolsorters' disease in England // *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1978. V. 54. №. 10. P. 956.

51. Drew D.R., Lightowlers M., Strugnell R.A. Humoral Immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the *Taenia ovis* 45W antigen // *Vaccine*. 2000. V.18. №23. P. 2522-2532.

52. Duc L.H., Hong H.A., Atkins H.S., Flick-Smith H.S., Durrami Z., Pijkema S., Titball R.W., Cutting S.M. Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen // *Vaccine*. 2007. P. 25. № 2. P. 346-355.

53. Duesbery N.S., Webb C.P., Leppla S.H., Gordon V.M., Klimpel K.R., Copeland T.D., Ahn N.G., Oskarsson M.K., Fukasawa K., Paull K.D., Vande Woude

G.F. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor // *Science*. 1998. V. 280. № 5364. P. 734-737.

54. Dumas E.K., Garman L., Cuthberston H., Charlton S., Hallis B., Engler R.J.M., Choudhari S., Picking W.D., James J.A., Farris A.D. Lethal factor antibodies contribute to lethal toxin neutralization in recipients of anthrax vaccine precipitated // *Vaccine*. 2017a. V. 35. № 26. P. 3416-3422.

55. Dumas E.K., Gross T., Larabee J., Pate L., Cuthberston H., Charlton S., Hallis B., Engler R.J.M., Collins L.C. Jr., Spooner C.E., Chen H., Ballard J., James J.A., Farris A.D. Anthrax vaccine precipitated induces edema toxin-neutralizing, edema factor-specific antibodies in human recipients // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2017b. V. 24. № 11.

56. Duverger A., Carré J.M., Jee J., Leppla S.H., Cormet-Boyaka E., Tang W.J., Tomé D., Boyaka P.N. Contributions of edema factor and protective antigen to the induction of protective immunity by *Bacillus anthracis* edema toxin as an intranasal adjuvant // *The Journal of Immunology*. 2010. V. 185. № 10. 5943-5952.

57. Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Nikitin N.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Plant virus particles with various shapes as potential adjuvants // *Scientific Reports*. 2020. V. 10. № 1. P. 10365.

58. Fasanella A., Losito S., Trotta T., Adone R., Massa S., Ciuchini F., Chiocco D. Detection of anthrax vaccine virulence factors by polymerase chain reaction // *Vaccine*. 2001. V. 19. № 30. P. 4214-4218.

59. Fausther-Bovendo H., Kobinger G.P. Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important? // *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014. V. 10. № 10. P. 2875-2884.

60. Feinen B., Petrovsky N., Verma A., Merkel T.J.. Advax-adjuvanted recombinant protective antigen provides protection against inhalational anthrax that is further enhanced by addition of murabutide adjuvant // *Clinical and Vaccine Immunology*. V. 21. № 4. P. 580-586.

61. Fellows P.F., Linscott M.K., Ivins B.E., Pitt M.L.M., Rossi C.A., Gibbs P.H., Friedlander A.M. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin // *Vaccine*. 2001. V. 19. № 23-24. P. 3241-3247.

62. Flick-Smith H.C., Walker N.J., Gibson P., Bullifent H., Hayward S., Miller J., Titball R.W., Williamson E.D. A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection // *Infection and immunity*. 2002. V. 70. № 3. P. 1653-1656.

63. Friedlander A.M., Little S.F. Advances in the development of next-generation anthrax vaccines // *Vaccine*. 2009. V. 27. P. D28-D32.

64. Galen J.E., Chinchilla M., Pasetti M.F., Wang J.Y., Zhao L., Arciniega-Martinez I., Silverman D.J., Levine M.M. Mucosal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing protective antigen of anthrax toxin (PA83) primes monkeys for accelerated serum antibody responses to parenteral PA83 vaccine // *The Journal of Infectious Diseases*. 2009. V. 199. P. 326-335.
65. Gao-Sheridan S., Zhang S., Collier R.J. Exchange characteristics of calcium ions bound to anthrax protective antigen // *Biochemical and biophysical research communications*. 2003. V. 300. № 1. P. 61-64.
66. Garufi G., Wang Y.T., Oh S.Y., Maier H., Missiakas D.M., Schneewind O. Sortase-conjugation generates a capsule vaccine that protects guinea pigs against *Bacillus anthracis* // *Vaccine*. 2012. V. 30. № 23. P. 3435-3444.
67. Gleiser C.A., Berdjis C.C., Hartman H.A., Gochenour W.S. Pathology of experimental respiratory anthrax in *Macaca mulatta* // *British journal of experimental pathology*. 1963. V. 44. № 4. P. 416.
68. GMA News Online. DOH: Anthrax cases in Cagayan 'controlled'. [Электронный ресурс] URL: <https://www.gmanetwork.com/news/topstories/regions/856201/doh-anthrax-cases-in-cagayan-controlled/story> (дата обращения 10.03.2025)
69. Goossens P.L. Animal models of human anthrax: the Quest for the Holy Grail // *Molecular aspects of medicine*. 2009. V. 30. № 6. P. 467-480.
70. Gorantala J., Grover S., Rahi A., Chaudhary P., Rajwanshi R., Sarin N.B., Bhatnagar R. Generation of protective immune response against anthrax by oral immunization with protective antigen plant-based vaccine // *Journal of biotechnology*. 2014. V. 176. P. 1-10.
71. Gorse G.J., Keitel W., Keyserling H., Taylor D.N., Lock M., Alves K., Kenner J., Deans L., Gurwith M. Immunogenicity and tolerance of ascending doses of a recombinant protective antigen (rPA102) anthrax vaccine: a randomized, double-blinded, controlled, multicenter trial // *Vaccine*. 2006. V. 24. №. 33-34. P. 5950-5959.
72. Goudarzi S. What Lies Beneath // *Scientific American*. 2016. V. 315. № 5. P. 11-12.
73. Gupta P.K., Moayeri M., Crown D., Fattah R.J., Leppla, S.H. Role of N-terminal amino acids in the potency of anthrax lethal factor // *PloS one*. 2008. V. 3. № 9. P. e3130.
74. Hambleton P., Carman J.A., Melling J. Anthrax: the disease in relation to vaccines // *Vaccine*. 1984. V. 2. № 2. P. 125-132.
75. Heine H.S., Basset J., Miller L., Hartings J.M., Ivins B.E., Pitt M.L., Fritz D., Norris S.L., Byrne W.R. Determination of antibiotic efficacy against *Bacillus*

anthracis in a mouse aerosol challenge model // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007. V. 51. № 4. P. 1373-1379.

76. Heninger S., Drysdale M., Lovchik J., Hutt J., Lipscomb M.F., Koehler T.M., Lyons R. Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax // *Infection and immunity*. 2006. V. 74. № 11. P. 6067-6074.

77. Henning L., Anderson M., Triplett C., Smith T., Boyce K., Hendey L., Ridenour A., Eng J., Schaeufele D., Wilson E., Sabourin C. L., Adams L.E, Babas T., Parish L., Wolfe D. Efficacy of different AV7909 dose regimens in a nonclinical model of pulmonary anthrax // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2023. V. 19. № 3. P. 2290345.

78. Hermanson G., Whitlow V., Parker S., Tonsky K., Rusalov D., Ferrari M., Lalor P., Komai M., Mere R., Bell M., Brenneman K., Mateczun A., Evans T., Kasslow D., Galloway D., Hobart P. A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. V. 101. № 37. P. 13601-13606.

79. Iacono-Connors L.C., Welkos S.L., Ivins B.E., Dalrymple, J. M. Protection against anthrax with recombinant virus-expressed protective antigen in experimental animals // *Infection and immunity*. 1991. V. 59. № 6. P. 1961-1965.

80. Jeon J.H., Kim Y.H., Kim K.A., Kim Y.R., Woo S.J., Choi Y.J., Rhie G.E. A putative exosporium lipoprotein GBAA0190 of *Bacillus anthracis* as a potential anthrax vaccine candidate // *BMC Immunology*. 2021. V. 22. № 1. P. 20.

81. Jernigan J.A., Stephens D.S., Ashford D.A., Omenaca C., Topiel M.S., Galbraith M., Tapper M., Fisk T. L., Zaki S., Popovic T., Meyer R.F., Quinn C. P., Harper S.A., Fridkin S.K., Sejvar J.J., Shepard C.W., McConnell M., Guarner J., Shien W.-J., Malecki J.M., Gerberding J.L., Hughes J.M., Perkins B.A. Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States // *Emerging infectious diseases*. 2001. V. 7. № 6. P. 933.

82. Jiang G., Joshi S.B., Peek L.J., Brandau D.T., Huang J., Ferriter M.S., Woodley W.D., Ford B.M., Mar K.D., Mikszta J.A., Hwang C.R., Ulrich R., Harvey N.G., Middaugh C.R., Sullivan V.J. Anthrax vaccine powder formulations for nasal mucosal delivery // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006. V. 95. № 1. P. 80-96.

83. Johnson G.L., Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases // *Science*. 2002. V. 298. № 5600. P. 1911-1912.

84. Karpova O.V., Nikitin N.A., Chirkov S.N., Trifonova E.A., Sheveleva A.A., Lazareva E.A., Atabekov J.G. Immunogenic compositions assembled from tobacco

mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // *Journal of General Virology*. 2012. V. 93. № 2. P. 400-407.

85. Kaur M., Singh S., Bhatnagar R. Anthrax vaccines: present status and future prospects // *Expert review of vaccines*. 2013. V. 12. № 8. P. 955-970.

86. Keitel W.A., Treanor J.J., El Sahly H.M., Evans T.G., Kopper S., Whitlow V., Selinsky C., Kaslow D.C., Rolland A., Smith L.R., Lalor P.A. Evaluation of a plasmid DNA-based anthrax vaccine in rabbits, nonhuman primates and healthy adults // *Human vaccines*. 2009. V. 5. № 8. P. 536-544.

87. Kelly-Cirino C.D., Mantis N.J. Neutralizing monoclonal antibodies directed against defined linear epitopes on domain 4 of anthrax protective antigen // *Infection and immunity*. 2009. V. 77. № 11. P. 4859-4867.

88. Kim G.L., Pyo S.W., Yi H., Kim S.H., Shin H., Yu M.A., Hwang Y.R., Choi S.Y., Jeon J.H., Jo S.K., Rhie G.E. Immunogenicity and Protective Efficacy of Recombinant Protective Antigen Anthrax Vaccine (GC1109) in A/J Mice Model // *Vaccine*. 2023. V. 41. № 19. P. 3106-3110.

89. Kofta W., Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages // *Veterinary parasitology*. 2001. V. 100. №1. P. 3-12.

90. Kondakova O.A., Nikitin N.A., Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Atabekov J.G., Karpova O.V. Vaccines against anthrax based on recombinant protective antigen: problems and solutions // *Expert Review of Vaccines*. 2019. V. 18. № 8. P. 813-828.

91. Kovalenko A.O., Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Manukhova T.I., Kondakova O.A., Ivanov P.A., Arkhipenko M.V., Gushchin V.A., Nikitin N.A., Karpova O.V. Vaccine Candidate Against COVID-19 Based on Structurally Modified Plant Virus as an Adjuvant // *Frontiers in Microbiology*. V. 13. P. 845316.

92. Koya V., Moayeri M., Leppla S.H., Daniell H. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge // *Infection and Immunity*. 2005. V. 73. № 12. P. 8266-8274.

93. Krishnan V., Andersen B.H., Shoemaker C., Sivko G.S., Tordoff K.P., Stark G.V., Zhang J., Feng T., Duchars M., Roberts M.S. Efficacy and immunogenicity of single-dose AdVAV intranasal anthrax vaccine compared to anthrax vaccine absorbed in an aerosolized spore rabbit challenge model // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2015. V. 22. № 4. P. 430-439.

94. Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Egorova M.S., Balovneva M.V., Nikitin N.A., Evtushenko E.A., Karpova O.V., Markina A.A., Aparin P.G., Tkachenko P.E., L. Vov V.L., Tkachenko E.A. Various Adjuvants Effect on Immunogenicity of Puumala Virus Vaccine // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020. V. 10. P. 545371.

95. Lacy D.B., Mourez M., Fouassier A., Collier R.J. Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors // *Journal of biological chemistry*. 2002. V. 277. № 4. P. 3006-3010.
96. Lacy D.B., Wigelsworth D.J., Melnyk R. A., Harrison S.C., Collier R.J. Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. V. 101. № 36. P. 13147-13151.
97. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680-685.
98. Lee D.Y., Chun J.H., Ha H.J., Park J., Kim B.S., Oh H.B., Rhie G.E. Poly- γ -D-glutamic acid and protective antigen conjugate vaccines induce functional antibodies against the protective antigen and capsule of *Bacillus anthracis* in guinea-pigs and rabbits // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009. V. № 57. 2. P. 165-172.
99. Lee J.S., Hadjipanayis A.G., Welkos S.L. Venezuelan equine encephalitis virus-vectored vaccines protect mice against anthrax spore challenge // *Infection and immunity*. 2003. V. 71. № 3. P. 1491-1496.
100. Leppla S.H. Anthrax toxin // *Bacterial protein toxins*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. P. 445-472.
101. Li X., Aldayel A.M., Cui Z. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles // *Journal of controlled release*. 2014. V. 173. P. 148-157.
102. Liang X., Zhang H., Zhang E., Wei J., Li W., Wang B., Dong S., Zhu J. Identification of the pXO1 plasmid in attenuated *Bacillus anthracis* vaccine strains // *Virulence*. 2016. V. 7. № 5. P. 578-586.
103. Little S.F., Ivins B.E., Webster W.M., Fellows P.F., Pitt M.L.M., Norris S.L.W., Andrews G.P. Duration of protection of rabbits after vaccination with *Bacillus anthracis* recombinant protective antigen vaccine // *Vaccine*. 2006. V. 24. № 14. P. 2530-2536.
104. Little S.F., Leppla S.H., Cora E. Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of *Bacillus anthracis* toxin // *Infection and Immunity*. 1988. V. 56. № 7. P. 1807-1813.
105. Livingston B.D., Little S.F., Luxembourg A., Ellefsen B., Hannaman D. Comparative performance of a licensed anthrax vaccine versus electroporation based delivery of a PA encoding DNA vaccine in rhesus macaque // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 4. P. 1056-61.
106. Majumder S., Das S., Somani V., Makam S.S., Joseph K.J., Bhatnagar R. A bivalent protein r-PB, comprising PA and BclA immunodominant regions for

comprehensive protection against *Bacillus anthracis* // *Scientific Reports*. 2018. V. 8. № 1. P. 7242.

107. Malik A., Gupta M., Mani R., Gogoi H., Bhatnagar R. Trimethyl Chitosan Nanoparticles Encapsulated Protective Antigen Protects the Mice Against Anthrax // *Frontiers in Immunology*. 2018. V. 9. P. 562.

108. Mamedov T., Chichester J.A., Jones R.M., Ghosh A., Coffin M.V., Herschbach K., Prokhnevsky A.I., Streatfield S.J., Yusibov V. Production of Functionally Active and Immunogenic Non-Glycosylated Protective Antigen from *Bacillus anthracis* in *Nicotiana benthamiana* by Co-Expression with Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) of *Flavobacterium meningosepticum* // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 4. P. e0153956.

109. Mamedov T., Cicek K., Gulec B., Ungor R., Hasanova G. In vivo production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus* // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 8. P. e0183589.

110. Manayani D.J., Thomas D., Dryden K.A., Reddy V., Siladi M.E., Marlett J.M., Rainey G.J., Pique M.E., Scobie H.M., Yeager M., Young J.A., Manchester M., Schneemann A. A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine // *PLOS Pathogens*. 2007. V. 3. № 10. P. 1422-1431.

111. Manish M., Rahi A., Kaur M., Bhatnagar R., Singh S. A single-dose PLGA encapsulated protective antigen domain 4 nanoformulation protects mice against *Bacillus anthracis* spore challenge // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. P. e61885.

112. Manning M.C., Patel K., Borchardt R.T. Stability of protein pharmaceuticals // *Pharmaceutical Research*. 1989. V. 6. № 11. P. 903-918.

113. Mayer T.A., Bersoff-Matcha S., Murphy S., Earls J., Harper S., Pauze D., Nguyen M., Rosenthal J., Cevra Jr D., Druckenbrod G., Hanfling D., Fattah N., Napoli A., Nayyar A., Berman E.L. Clinical presentation of inhalational anthrax following bioterrorism exposure: report of 2 surviving patients // *Jama*. 2001. V. 286. № 20. P. 2549-2553.

114. McComb R.C., Martchenko M. Neutralizing antibody and functional mapping of *Bacillus anthracis* protective antigen—the first step toward a rationally designed anthrax vaccine // *Vaccine*. 2016. V. 34. № 1. P. 13-19.

115. Meselson M., Guillemin J., Hugh-Jones M., Langmuir A., Popova I., Shelokov A., Yampolskaya O. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979 // *Science*. 1994. V. 266. № 5188. P. 1202-1208.

116. Milne J.C., Collier R.J. pH-dependent permeabilization of the plasma membrane of mammalian cells by anthrax protective antigen // *Molecular microbiology*. 1993. V. 10. № 3. P. 647-653.

- 117.** Milne J.C., Furlong D., Hanna P.C., Wall J.S., Collier, R.J. Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. V. 269. № 32. P. 20607-20612.
- 118.** Moayeri M., Leppla S.H. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin // *Molecular aspects of medicine*. 2009. V. 30. № 6. P. 439-455.
- 119.** Modi T., Gervais D., Smith S., Miller J., Subramaniam S., Thalassinou K., Shepherd A. Characterization of the UK anthrax vaccine and human immunogenicity // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2021. V. 17. № 3. P. 747-758.
- 120.** Mogridge J., Cunningham K., Collier R.J. Stoichiometry of anthrax toxin complexes // *Biochemistry*. 2002. V. 41. № 3. P. 1079-1082.
- 121.** Mogridge J., Mourez M., Collier R.J. Involvement of domain 3 in oligomerization by the protective antigen moiety of anthrax toxin // *Journal of bacteriology*. 2001. V. 183. № 6. P. 2111-2116.
- 122.** Mohamadzadeh M., Duong T., Sandwick S. J., Hoover, T., Klaenhammer T.R. Dendritic cell targeting of Bacillus anthracis protective antigen expressed by Lactobacillus acidophilus protects mice from lethal challenge // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. V. 106. № 11. P. 4331-4336.
- 123.** Molloy S.S., Bresnahan P.A., Leppla S.H., Klimpel K.R., Thomas G. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-XX-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen // *Journal of Biological Chemistry*. 1992. V. 267. № 23. P. 16396-16402.
- 124.** Mylchreest E., Smiley M.A., Ballin J.D., Blauth B., Shearer J., Reece J., Lonin B., Savransky V. Developmental and reproductive safety evaluation of AV7909 anthrax vaccine candidate in rats // *Birth Defects Research*. 2021. V. 113. № 1. P. 32-42.
- 125.** Nikitin N., Ksenofontov A., Trifonova E., Arkhipenko M., Petrova E., Kondakova O., Kirpichnikov M., Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions // *FEBS Letters*. 2016. V. 590. № 10. P. 1543-1551.
- 126.** Nikitin N.A., Malinin A.S., Trifonova E.A., Rakhnyanskaya A.A., Yaroslavov A.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Proteins immobilization on the surface of modified plantviral particles coated with hydrophobic polycations // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2014. V. 25. № 16. P. 1743-1754.
- 127.** Nikitin N.A., Matveeva I.N., Trifonova E.A., Puhova N.M., Samuylenko A.Y., Gryn S.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine // *Data in Brief*. 2018a. V. 21. P. 742-745.

128. Nikitin N.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Examination of biologically active nanocomplexes by Nanoparticle Tracking Analysis // *Microscopy and Microanalysis*. 2013. V. 19. № 4. P. 808-813.

129. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018b. V. 97. P. 127-133.

130. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Yurkova M.S., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment // *Data in Brief*. 2018c. V. 21. P. 1504-1507.

131. O'Brien J., Frieland A., Dreier T., Ezzell J., Leppla S.H. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils // *Infection and Immunity*. 1985. V. 47. № 1. P. 306-310.

132. Okinaka R.T., Cloud K., Hampton O., Hoffmaster A.R., Hill K.K., Keim P., Koehler T.M., Lamke G., Kumano S., Mahillon J., Manter D., Martinez Y., Ricke D., Svensson R., Jackson P.J. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes // *Journal of bacteriology*. 1999. V. 181. №. 20. P. 6509-6515.

133. Panda A.K., Bisht S.S., DeMondal S., Senthil Kumar N., Gurusubramanian G., Panigrahi A.K. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014. V. 105. № 4. P. 623-639.

134. Paolino K.M., Regules J.A., Moon J.E., Ruck R.C., Bennett J.W., Remich S.A., Mills K.T., Lin L., Washington C.N., Fornillos G.A., Lindsey C.Y., O'Brien K.A., Shi M., Mark Jones R., Green B.J., Tottey S., Chichester J.A., Streatfield S.J., Yusibov V. Safety and immunogenicity of a plant-derived recombinant protective antigen (rPA)-based vaccine against *Bacillus anthracis*: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults // *Vaccine*. 2022. V. 40. № 12. P. 1864-1871.

135. Peachman K.K., Li Q., Matyas G.R., Shivachandra S.B., Lovchik J., Lyons R.C., Alving C.R., Rao V.B., Rao M. Anthrax vaccine antigen-adjuvant formulations completely protect New Zealand white rabbits against challenge with *Bacillus anthracis* Ames strain spores // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. V. 19. № 1. P. 11-16.

136. Perry M.R., Ionin B., Barnewall R.E., Vassar M.L., Reece J.J., Park S., Lemiale L., Skiadopoulos M.H., Shearer J.D., Savransky V. Development of a guinea pig inhalational anthrax model for evaluation of post-exposure prophylaxis efficacy of anthrax vaccines // *Vaccine*. 2020. V. 38. № 10. P. 2307-2314.

- 137.** Petersen L.K., Phanse Y., Ramer-Tait A.E., Wannemuehler M.J., Narasimhan B. Amphiphilic polyanhydride nanoparticles stabilize Bacillus anthracis protective antigen // *Molecular Pharmaceutics*. 2012. V. 9. № 4. 874-882.
- 138.** Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen // *Nature*. 1997. V. 385. № 6619. P. 833.
- 139.** Petrovsky N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs // *Drug Safety*. 2015. V. 38. № 11. P. 1059-1074.
- 140.** Pomerantsev A.P., Pomerantseva O.M., Moayeri M., Fattah R., Tallant C., Leppla S.H. A Bacillus anthracis strain deleted for six proteases serves as an effective host for production of recombinant proteins // *Protein Expression and Purification*. 2011. V. 80. № 1. P. 80-90.
- 141.** Powell B.S., Enama J.T., Ribot W.J., Webster W., Little S., Hoover T., Adamovicz J.J., Andrews G.P. Multiple asparagine deamidation of Bacillus anthracis protective antigen causes charge isoforms whose complexity correlates with reduced biological activity // *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007. V. 68. № 2. P. 458-479.
- 142.** 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 // *Infection and Immunity*. 2001. V. 69. P. 4509-4515.
- 143.** Ramirez D.M., Leppla S.H., Schneerson R., Shiloach J. Production, recovery and immunogenicity of the protective antigen from a recombinant strain of Bacillus anthracis // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002. V. 28. № 4. P. 232-238.
- 144.** Rao M., Peachman K.K., Li Q., Matyas G.R., Shivachandra S.B., Borschel R., Morthole V.I., Fernandez-Prada C., Alving C.R., Rao V.B. Highly effective generic adjuvant systems for orphan or poverty-related vaccines // *Vaccine*. 2011. V. 29. № 5. P. 873-877.
- 145.** Rao V.V., Godin C.S., Lacy M.J., Inglefield J.R., Park S., Blauth B., Reece J.J., Lonin B., Savransky V. Evaluation of the AV7909 anthrax vaccine toxicity in Sprague Dawley rats following three intramuscular administrations // *International journal of toxicology*. 2021. V. 40. № 5. P. 442-452.
- 146.** Read T.D., Peterson S.N., Tourasse N., Baillie L.W., Paulsen I.T., Nelson K.E., Tettelin H., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill S.R., Holtzapple E.K., Okstad O.A., Helgason E., Rilstone J., Wu M., Kolonay J.F., Beanan M.J., Dodson R.J., Brinkac L.M., Gwinn M., DeBoy R.T., Madpu R., Daugherty S.C., Durkin A.S., Haft D.H., Nelson W.C., Peterson J.D., Pop M., Khouri H.M., Radune D., Benton J.L.,

Mahamoud Y., Jiang L., Hance I.R., Weidman J.F., Berry K.J., Plaut R.D., Wolf A.M., Watkins K.L., Nierman W.C., Hazen A., Cline R., Redmond C., Thwaite J.E., White O., Salzberg S.L., Thomason B., Frieland A.M., Koehler T.M., Hanna P.C., Kolsto A.-B., Fraser C.M. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria // *Nature*. 2003. V. 423. № 6935. P. 81-86.

147. Reason D., Liberato J., Sun J., Camacho J., Zhou J. Mechanism of lethal toxin neutralization by a human monoclonal antibody specific for the PA(20) region of *Bacillus anthracis* protective antigen // *Toxins*. 2011. V. 3. № 8. P. 979-990.

148. Reed M.D., Wilder J.A., Mega W.M., Hutt J.A., Kuehl P.J., Valderas M.W., Chew L.L., Liang B.C., Squires C.H. Immunization with a recombinant, *Pseudomonas fluorescens*-expressed, mutant form of *Bacillus anthracis*-derived protective antigen protects rabbits from anthrax infection // *Plos one*. 2015. V. 10. № 7. P. e0130952.

149. Rhie G.E., Park Y.M., Chun J.H., Yoo C.K., Seong W.K., Oh H.B. Expression and secretion of the protective antigen of *Bacillus anthracis* in *Bacillus brevis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2005a. V. 45. № 2. P. 331-339.

150. Rhie G.E., Park Y.M., Han J.S., Yu J.Y., Seong W.K., Oh H.B. Efficacy of non-toxic deletion mutants of protective antigen from *Bacillus anthracis* // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2005b. V. 45. № 2. P. 341-347.

151. Rotz L.D., Khan A.S., Lillibridge S.R., Ostroff S.M., Hughes J.M. Public health assessment of potential biological terrorism agents // *Emerging infectious diseases*. 2002. V. 8 № 2. P. 225.

152. Santelli E., Bankston L.A., Leppla S.H., Liddington R.C. Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor // *Nature*. 2004. V. 430. № 7002. P. 905.

153. Schneider J.C., Chen H.C., Bautista E., Retallack D. Safety and immunogenicity of Px563L, a recombinant anthrax vaccine candidate, in a two-dose regimen for post-exposure prophylaxis in healthy adults // *Vaccine*. 2021. V. 39. № 42. P. 6333-6339.

154. Scorpio A., Blank T.E., Day W.A., Chabot D.J. Anthrax vaccines: Pasteur to the present // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006. V. 63. P. 2237-2248.

155. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals // *Journal of applied microbiology*. 2006. V. 101. № 3. P. 514-525.

156. Shafazand S., Doyle R., Ruoss S., Weinacker A., Raffin T.A. Inhalational anthrax: epidemiology, diagnosis, and management // *Chest*. 1999. V. 116. № 5. P. 1369-1376.

- 157.** Shivachandra S.B., Rao M., Laszlo Janosi., Sathaliyawala T., Matyas G.R., Alving C.R., Leppla S.H., Rao V.B. In vitro binding of anthrax protective antigen on bacteriophage T4 capsid surface through Hoc–capsid interactions: a strategy for efficient display of large full-length proteins // *Virology*. 2006. V. 345. № 1. P. 190-198.
- 158.** Shlyakhov E.N., Rubinstein E. Human live anthrax vaccine in the former USSR // *Vaccine*. 1994. V. 12. № 8. P. 727-730.
- 159.** Sim B.K.L., Li M., Ososrio M., Wu Y., Wai T.T., Peterson J.W., James E.R., Chakravarty S., Gao L., Xu R., KC N., Stafford E., Lawrence W.S., Yeager L.A., Peel J.E., Sivasubramani S.K., Chopra A.K., Filipova S., Hoffman S.L. Protection against inhalation anthrax by immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a stably producing protective antigen of *Bacillus anthracis* // *NPJ vaccines*. 2017. V. 2. № 1. P. 1-7.
- 160.** Singh Y., Klimpel K.R., Arora N., Sharma M., Leppla S.H. The chymotrypsin-sensitive site, FFD315, in anthrax toxin protective antigen is required for translocation of lethal factor // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. V. 269. № 46. P. 29039-29046
- 161.** Singh Y., Klimpel K.R., Quinn C.P., Chaudhary, V.K., Leppla, S.H. The carboxyl-terminal end of protective antigen is required for receptor binding and anthrax toxin activity // *Journal of Biological Chemistry*. 1991. V. 266. № 23. P. 15493-15497.
- 162.** Sivasubramanian A., Maynard J.A., Gray J.J. Modeling the structure of mAb 14B7 bound to the anthrax protective antigen // *Proteins*. 2008. V. 70. № 1. P. 218-30.
- 163.** Sternbach G. The history of anthrax // *The Journal of emergency medicine*. 2003. V. 24. № 4. P. 463-467.
- 164.** Sumithra T.G., Chaturvedi V.K., Gupta P.K., Bincy J., Siju S.J., Sunita S.C., Reshma K.J., Patel C.L., Rai A.K. A novel bicistronic DNA vaccine with enhanced protective immune response against *Bacillus anthracis* through DNA prime-protein boost vaccination approach // *Microbial Pathogenesis*. 2021. V. 158. P. 105104.
- 165.** Taft S.C., Weiss A.A. Neutralizing activity of vaccine-induced antibodies to two *Bacillus anthracis* toxin components, lethal factor and edema factor // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008. V. 15. № 1. P. 71-75.
- 166.** Tang W.J., Guo Q. The adenylyl cyclase activity of anthrax edema factor // *Molecular aspects of medicine*. 2009. P. 30. № 6. P. 423-430.
- 167.** Thorkildson P., Kinney H.L., AuCoin D.P. Pasteur revisited: an unexpected finding in *Bacillus anthracis* vaccine strains// *Virulence*. 2016. V. 7. № 5. P. 506-507.

- 168.** Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2014. V. 32. № 8. P. 1193-1201.
- 169.** Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antiviral Research*. 2017. V. 144. № C. P. 27-33.
- 170.** Turnbull P.C.B. Introduction: anthrax history, disease and ecology // *Anthrax*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2002. P. 1-19.
- 171.** Verma A., Burns D.L. Improving the stability of recombinant anthrax protective antigen vaccine // *Vaccine*. 2018. V. 36. № 43. P. 6379-6382.
- 172.** Verma A., Ngundi M.M., Burns D.L. Mechanistic analysis of the effect of deamidation on the immunogenicity of anthrax protective antigen // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2016. V. 23. № 5. P. 396-402.
- 173.** Wagner L., Verma A., Meade B.D., Reiter K., Narum D.L., Braffy R.A., Little S.F., Burns D.L. Structural and immunological analysis of anthrax recombinant protective antigen adsorbed to aluminum hydroxide adjuvant // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. V. 19. № 9. P. 1465-1473.
- 174.** Wang S.H., Kirwan S.M., Abraham S.N., Staats H.F., Hickey A.J. Stable dry powder formulation for nasal delivery of anthrax vaccine // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012. V. 101. № 1. P. 31-47.
- 175.** Wang W.-C., Sayedahmed E.E., Mittal S.K. Significance of Preexisting Vector Immunity and Activation of Innate Responses for Adenoviral Vector-Based Therapy // *Viruses*. 2022. V. 14. P. 2727.
- 176.** Wei W., Lu Q., Chaudry G. J., Leppla S. H., Cohen S. N. The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin // *Cell*. 2006. V. 124. № 6. P. 1141-1154.
- 177.** Welkos S., Bozue J., Twenhafel N., Cote C. Animal models for the pathogenesis, treatment, and prevention of infection by *Bacillus anthracis* // *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*. 2016. P. 269-311.
- 178.** Welkos S.L. Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (pX01⁻) *Bacillus anthracis* // *Microbial pathogenesis*. 1991. V. 10. № 3. P. 183-198.
- 179.** Welkos S.L., Friedlander A.M. Comparative safety and efficacy against *Bacillus anthracis* of protective antigen and live vaccines in mice // *Microbial pathogenesis*. 1988. V. 5. № 2. P. 127-139.
- 180.** Welkos S.L., Keener T.J., Gibbs P.H. Differences in susceptibility of inbred mice to *Bacillus anthracis* // *Infection and immunity*. 1986. V. 51. № 3. P. 795-800.

181. WHO (World Health Organization) Information sheet observed rate of vaccine reactions anthrax vaccines to humans. 2012. [Электронный ресурс] URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/pvg/global-vaccine-safety/anthrax-vaccine-rates-information-sheet.pdf?sfvrsn=984c7d5_4&download=true (дата обращения 10.03.2025).

182. Woo S.J., Kang S.S., Park S.M., Yang J.S., Song M.K., Yun C.H., Han S.H. Intranasal immunization with protective antigen of *Bacillus anthracis* induces a long-term immunological memory response // *Molecular Immunology*. 2015. V. 67. № 2. P. 492-500.

183. Wright J.G., Quinn C.P., Shadomy S., Messonnier N., Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of anthrax vaccine in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009 // *MMWR Recommendations and Reports*. 2010. V. 59. № RR-6. P. 1-30.

184. Wu G., Hong Y., Guo A., Feng C., Cao S., Zhang C.C., Shi R., Tan Y., Liu Z. A chimeric protein that functions as both an anthrax dual-target antitoxin and a trivalent vaccine // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010. V. 54. № 11. P. 4750-4757.

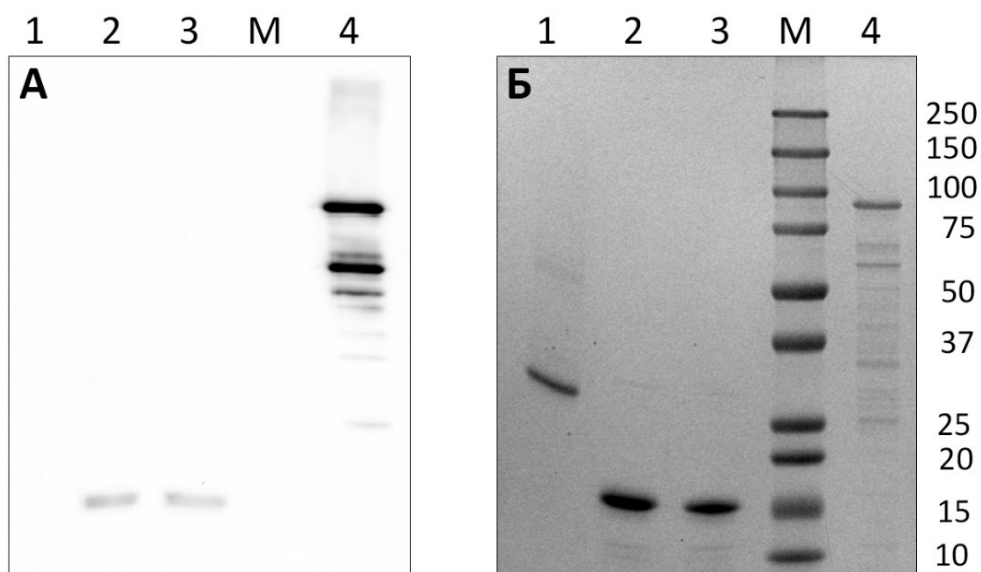
185. Yin Y., Zhang J., Dong D., Liu S., Guo Q., Song X., Li G., Xu J., Chen W. Chimeric hepatitis B virus core particles carrying an epitope of anthrax protective antigen induce protective immunity against *Bacillus anthracis* // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 46. P. 5814-5821.

186. Zeng M., Xu Q., Hessek E.D., Pichichero M.E. N-fragment of edema factor as a candidate antigen for immunization against anthrax // *Vaccine*. 2006. V. 24. № 5. P. 662-670.

187. Zhai L.-N., Zhao Y., Song X.-L., Qin T.-T., Zhang Z.-J., Wang J.-Z., Sui C.-Y., Zhang L.-L., Lv M., Hu L.-F., Zhou D.-S., Fang T.-Y., Yang W.-H., Wang Y.-C. Inhalable vaccine of bacterial culture supernatant extract mediates protection against fatal pulmonary anthrax // *Emerging Microbes & Infections*. 2023. V. 12. № 1. P. 2191741.

188. Zomber G., Reuveny S., Garti N., Shafferman A., Elhanany E. Effects of spontaneous deamidation on the cytotoxic activity of the *Bacillus anthracis* protective antigen // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. V. 280. № 48. P. 39897-39906.

ПРИЛОЖЕНИЯ

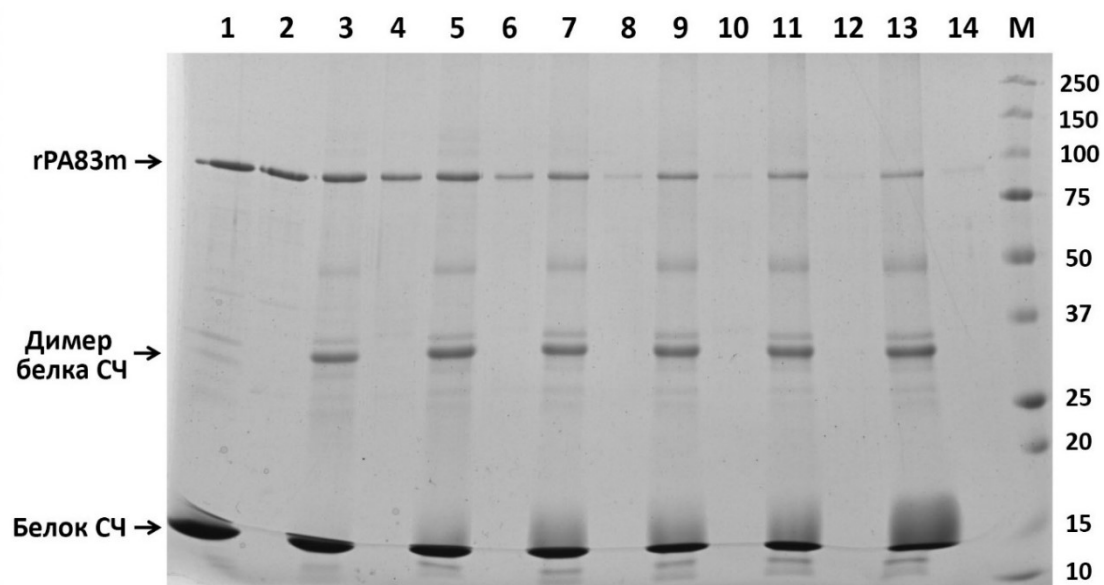


Приложение 1. Химерные моноклональные нейтрализующие антитела к РА узнают эпитоп в составе четвёртого домена РА

А. Вестен-блот с химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА и вторичными противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с пероксидазой хрена.

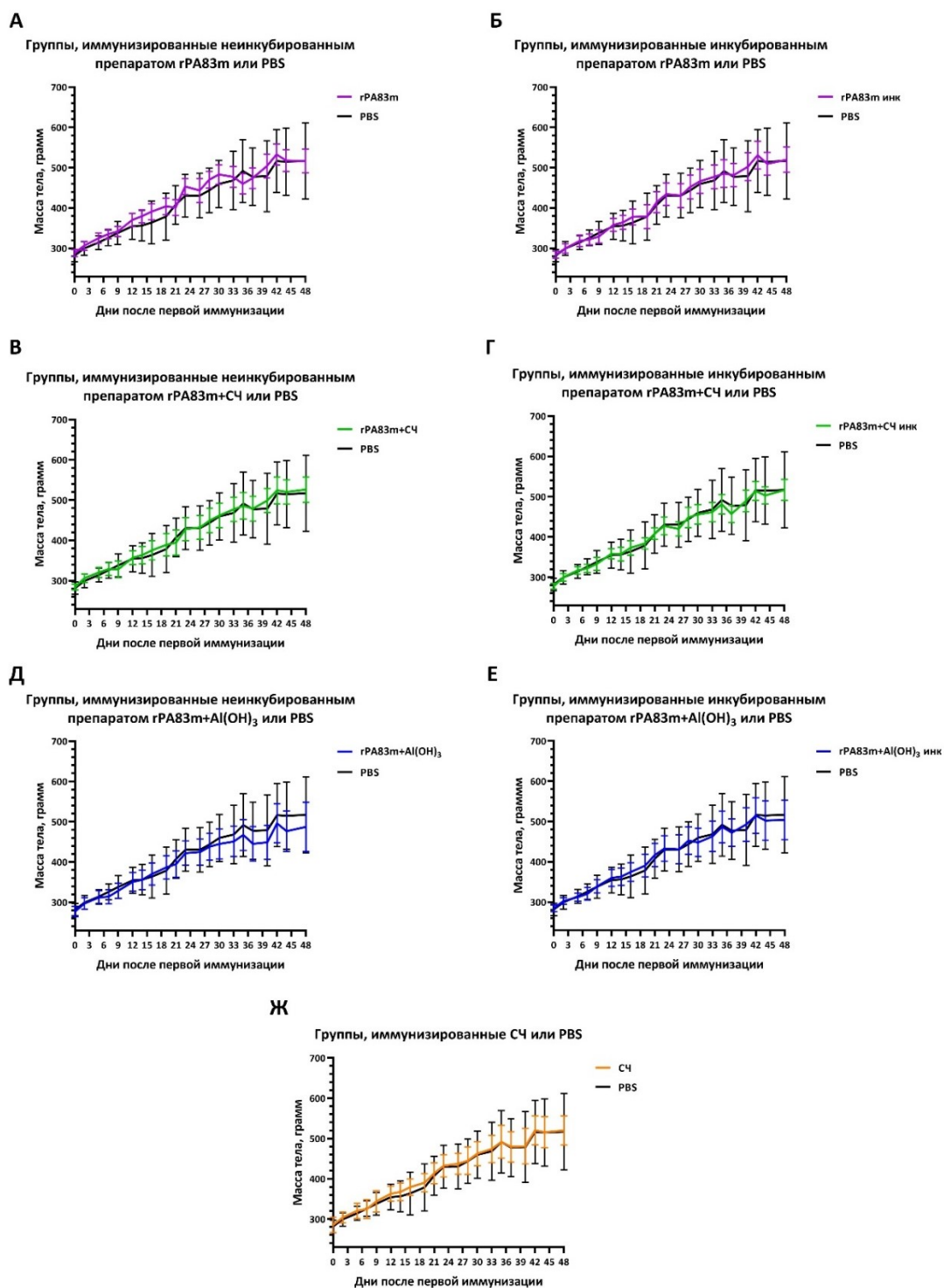
Б. Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

1 – гетерологичный рекомбинантный белок, содержащий гексагистициновую метку (отрицательный контроль); **2** – гРА4 (рекомбинантный домен IV РА); **3** – гРА4m (модифицированный гРА4); **4** – гРА83m (положительный контроль), **М** - маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены справа).



Приложение 2 к результатам, представленным на Рисунке 12Б. Повторный анализ стабилизирующего действия СЧ на rPA83m при +37 °C

А. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – композиции rPA83m+СЧ; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 – свободный rPA83m. 1, 2 – неинкубированные образцы; 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14 – образцы, инкубированные при +37 °C в течение 9, 15, 21, 27, 33 или 40 дней, соответственно. М – маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены справа). Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.



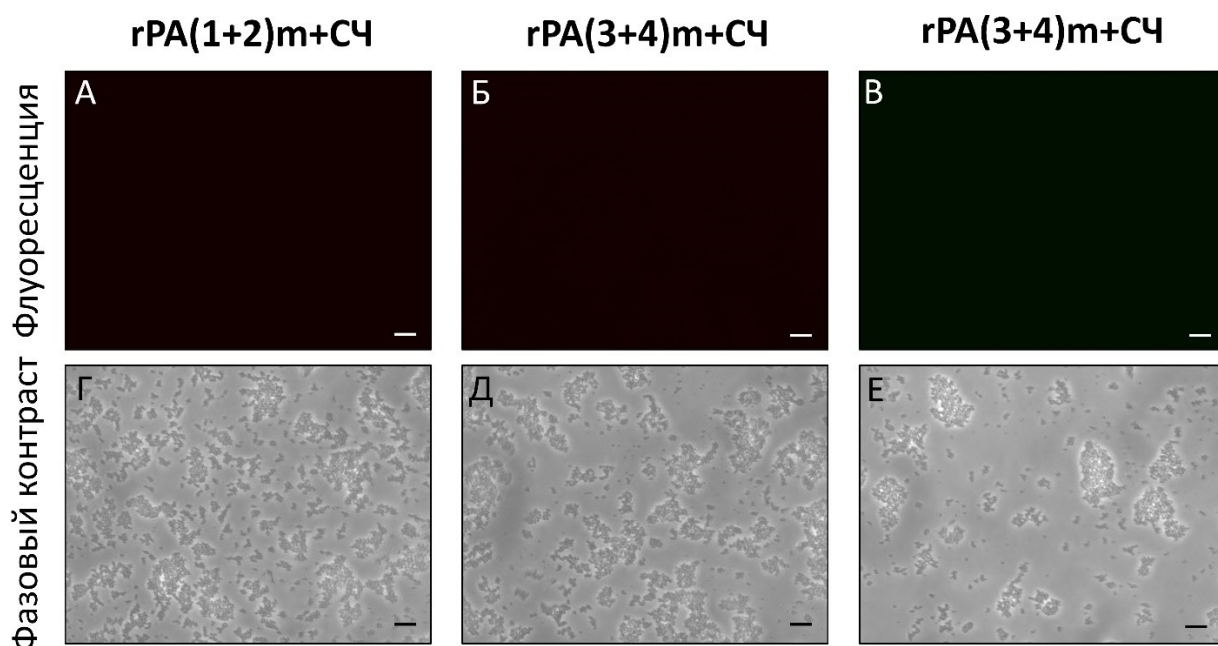
Приложение 3. Динамика веса морских свинок в группах, иммунизированных неинкубированными препаратами rPA83m (**А**), rPA83m+CЧ (**В**) или rPA83m+Al(OH)₃ (**Д**); препаратами rPA83m (**Б**), rPA83m+CЧ (**Г**) или rPA83m+Al(OH)₃ (**Е**), инкубированными в течение 27 дней при +37 °С (инк); или СЧ (**Ж**) в сравнении с группой, иммунизированной только PBS. Вес морских свинок определялся с интервалом в 3 дня. Для построения графиков были использованы средние арифметические значения веса морских свинок для каждой группы в каждый указанный день эксперимента. Планки погрешностей соответствуют 95% доверительным интервалам.

IgG к rPA83m							
Группа иммунизации	Номер морской свинки	Титр	log10(титр)	Группа иммунизации	Номер морской свинки	Титр	log10(титр)
1 (rPA83m)	1.1	4,11x10 ⁶	6,61	4 (rPA83m инкубированный)	4.1	2,13x10 ⁶	6,33
	1.2	4,23x10 ⁶	6,63		4.2	1,83x10 ⁶	6,26
	1.3	5,23x10 ⁶	6,72		4.3	2,76x10 ⁶	6,44
	1.4	1,42x10 ⁷	7,15		4.4	4,70x10 ⁵	5,67
	1.5	6,15x10 ⁶	6,79		4.5	1,23x10 ⁷	7,09
	1.6	8,09x10 ⁶	6,91		4.6	8,96x10 ⁶	6,95
	1.7	2,95x10 ⁶	6,47		4.7	2,34x10 ⁶	6,37
	1.8	1,11x10 ⁷	7,04		4.8	3,52x10 ⁵	5,55
	1.9	1,68x10 ⁶	6,22		4.9	3,67x10 ⁶	6,56
	1.10	3,38x10 ⁶	6,53		4.10	6,04x10 ⁵	5,78
	Медиана	4,73x10 ⁶	6,67		Медиана	2,23x10 ⁶	6,35
2 (rPA83m+СЧ)	2.1	1,15x10 ⁷	7,06	5 (rPA83m+СЧ инкубированный)	5.1	1,65x10 ⁶	6,22
	2.2	8,23x10 ⁶	6,92		5.2	6,29x10 ⁶	6,80
	2.3	1,79x10 ⁶	6,25		5.3	1,06x10 ⁶	6,03
	2.4	1,01x10 ⁷	7,01		5.4	2,48x10 ⁶	6,39
	2.5	1,40x10 ⁷	7,15		5.5	4,67x10 ⁶	6,67
	2.6	9,66x10 ⁶	6,98		5.6	1,95x10 ⁶	6,29
	2.7	1,71x10 ⁶	6,23		5.7	1,78x10 ⁶	6,25
	2.8	4,51x10 ⁶	6,65		5.8	5,38x10 ⁶	6,73
	2.9	5,66x10 ⁶	6,75		5.9	6,05x10 ⁶	6,78
	2.10	3,73x10 ⁶	6,57		5.10	1,11x10 ⁶	6,05
	Медиана	6,94x10 ⁶	6,84		Медиана	2,21x10 ⁶	6,35
3 (rPA83m+Al(OH) ₃)	3.1	1,05x10 ⁶	6,02	6 (rPA83m+Al(OH) ₃ инкубированный)	6.1	4,14x10 ³	3,62
	3.2	1,48x10 ⁶	6,17		6.2	2,09x10 ⁵	5,32
	3.3	2,60x10 ⁵	5,42		6.3	2,46x10 ⁵	5,39
	3.4	1,40x10 ⁶	6,15		6.4	3,70x10 ³	3,57
	3.5	4,38x10 ⁶	6,64		6.5	2,52x10 ⁵	5,40
	3.6	8,69x10 ⁵	5,94		6.6	2,23x10 ⁵	5,35
	3.7	3,09x10 ⁵	5,49		6.7	8,27x10 ⁴	4,92
	3.8	1,57x10 ⁶	6,20		6.8	1,73x10 ⁶	6,24
	3.9	1,84x10 ⁶	6,27		6.9	5,88x10 ⁵	5,77
	3.10	4,58x10 ⁵	5,66		6.10	1,49x10 ⁴	4,17
	Медиана	1,22x10 ⁶	6,09		Медиана	2,16x10 ⁵	5,33
7 (СЧ)	7.1	9,40x10 ²	2,97	8 (PBS)	8.1	2,78x10 ³	3,44
	7.2	2,32x10 ³	3,37		8.2	5,38x10 ³	3,73
	7.3	3,15x10 ³	3,50		8.3	4,22x10 ³	3,63
	7.4	1,22x10 ³	3,09		8.4	1,33x10 ³	3,12
	7.5	1,17x10 ⁴	4,07		8.5	8,75x10 ²	2,94
	Медиана	1,80x10 ³	3,26		Медиана	1,77x10 ³	3,25

Приложение 4 к результатам, представленным на Рисунке 17. Титры IgG к rPA83m в сыворотках крови морских свинок из групп, иммунизированных препаратами rPA83m, и из контрольных групп, иммунизированных СЧ или PBS. Титры сывороток были определены методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.

IgG к СЧ							
Группа иммунизации	Номер морской свинки	Титр	log10(титр)	Группа иммунизации	Номер морской свинки	Титр	log10(титр)
2 (rPA83m+СЧ)	2.1	7,28x10 ³	3,86	5 (rPA83m+СЧ инкубированный)	5.1	6,90x10 ³	3,84
	2.2	5,15x10 ⁴	4,71		5.2	1,36x10 ⁴	4,13
	2.3	5,74x10 ³	3,76		5.3	2,02x10 ⁴	4,31
	2.4	4,40x10 ⁴	4,64		5.4	3,64x10 ⁴	4,56
	2.5	4,92x10 ⁴	4,69		5.5	1,52x10 ⁴	4,18
	2.6	5,03x10 ⁴	4,70		5.6	1,01x10 ⁵	5,00
	2.7	4,85x10 ⁴	4,69		5.7	4,86x10 ⁴	4,69
	2.8	1,17x10 ⁴	4,07		5.8	2,73x10 ⁴	4,44
	2.9	5,75x10 ³	3,76		5.9	6,93x10 ³	3,84
	2.10	8,37x10 ⁴	4,92		5.10	2,69x10 ⁴	4,43
	Медиана	4,63x10 ⁴	4,67		Медиана	2,35x10 ⁴	4,37
7 (СЧ)	7.1	5,10x10 ⁴	4,71	8 (PBS)	8.1	6,41x10 ³	3,81
	7.2	6,20x10 ⁴	4,79		8.2	5,52x10 ³	3,74
	7.3	2,06x10 ⁴	4,31		8.3	5,41x10 ³	3,73
	7.4	3,19x10 ⁴	4,50		8.4	6,82x10 ³	3,83
	7.5	1,24x10 ⁴	4,09		8.5	4,44x10 ³	3,65
	Медиана	3,19x10 ⁴	4,50		Медиана	5,52x10 ³	3,74

Приложение 5 к результатам, представленным на Рисунке 18. Титры IgG к СЧ в сыворотках крови морских свинок из групп, иммунизированных препаратами rPA83m+СЧ, и из контрольных групп, иммунизированных СЧ или PBS. Титры сывороток были определены методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.



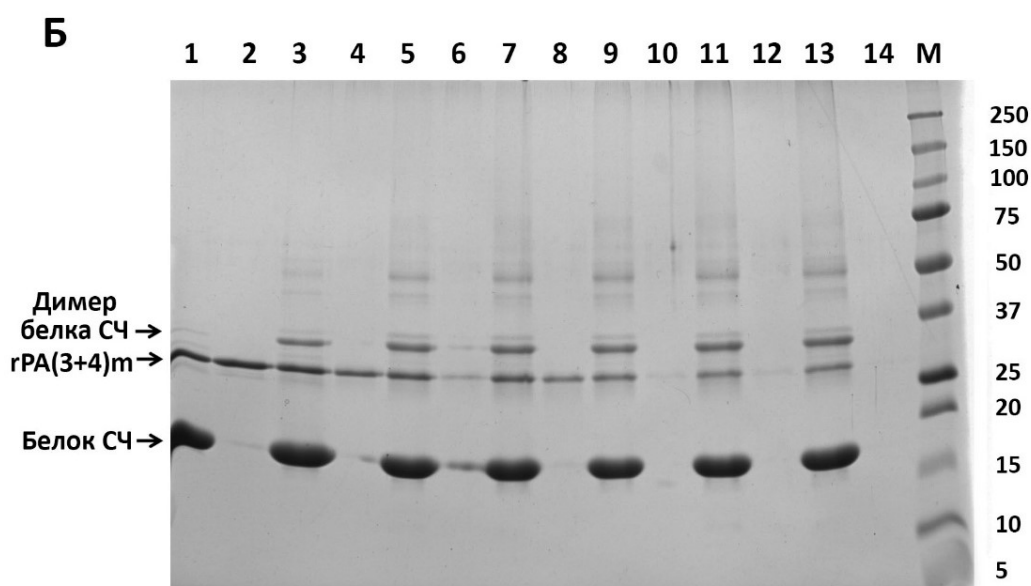
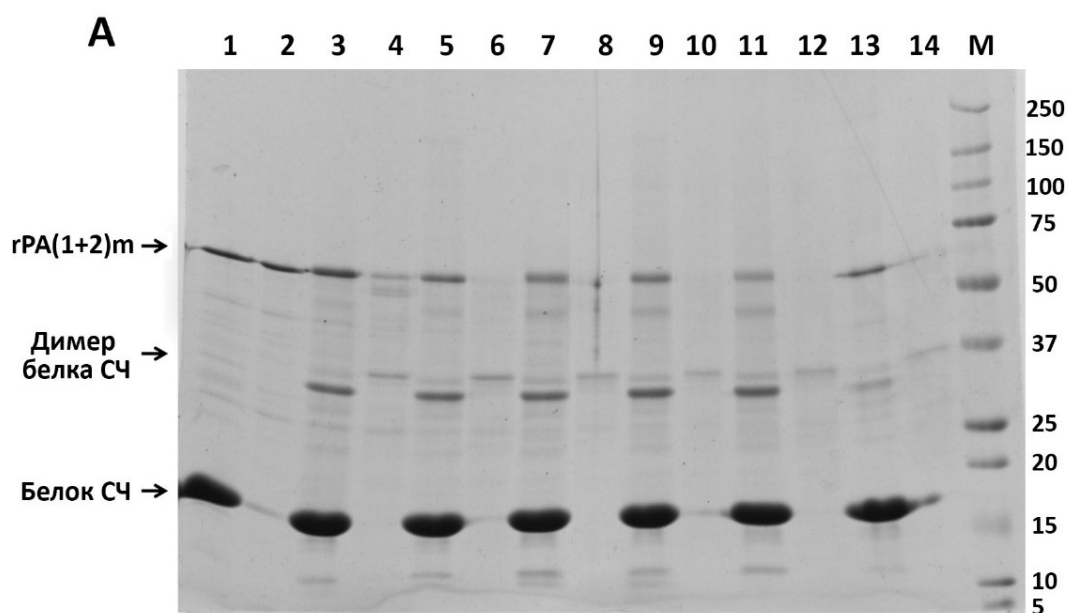
Приложение 6 к результатам, представленным на Рисунке 22. Отрицательные контроли для иммунофлуоресцентной микроскопии композиций rPA(1+2)m+CЧ ВТМ и rPA(3+4)m+CЧ ВТМ

А, Б, Г, Д. Композиция rPA(1+2)m+CЧ ВТМ (**А, Г**) или rPA(3+4)m+CЧ ВТМ (**Б, Д**), обработанная противовидовыми антителами (мышь), конъюгированными с Alexa Fluor® 546, в отсутствие первичных антител.

В, Е. Композиция rPA(3+4)m+CЧ ВТМ, обработанная противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с CF™ 488А, в отсутствие первичных антител.

(**А, Г**), (**Б, Д**), (**В, Е**) – изображения, попарно полученные в режиме флуоресценции и фазового контраста, соответственно.

Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.



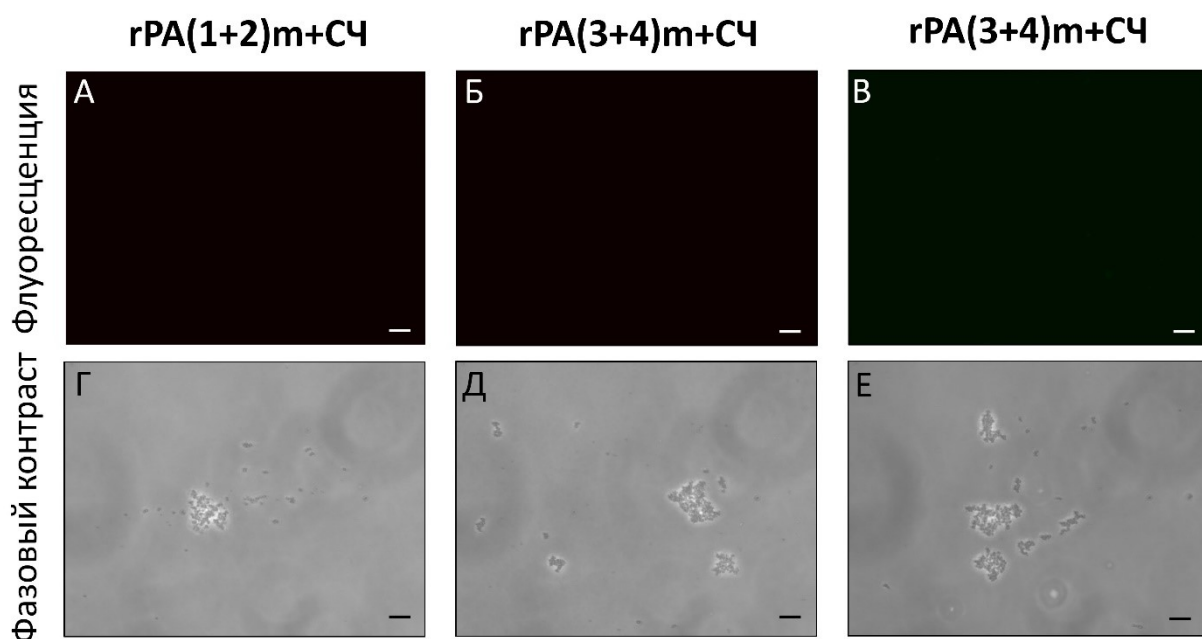
Приложение 7 к результатам, представленным на Рисунке 24. Повторный анализ стабилизирующего действия СЧ ВТМ на rPA(1+2)m и rPA(3+4)m при +37 °С

А. rPA(1+2)m Б. rPA(3+4)m

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – композиция rPA(1+2)m или rPA(3+4)m с СЧ; **2, 4, 6, 8, 10, 12, 14** – свободный рекомбинантный антиген сибирской язвы. **1, 2** – неинкубированные образцы; **3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14** – образцы, инкубированные при +37 °С в течение 10, 20, 25, 30, 35 или 40 дней, соответственно. **М** – маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены справа).

Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

Инкубация при +37 °C



Приложение 8 к результатам, представленным на Рисунке 25. Отрицательные контроли для иммунофлуоресцентной микроскопии композиций rPA(1+2)m+CЧ ВТМ и rPA(3+4)m+CЧ ВТМ, инкубированных 40 дней при +37 °C

А, Б, Г, Д. Композиция rPA(1+2)m+CЧ ВТМ (**А, Г**) или rPA(3+4)m+CЧ ВТМ (**Б, Д**), обработанная вторичными противовидовыми антителами (мышь), конъюгированными с Alexa Fluor® 546, в отсутствие первичных антител.

В, Е. Композиция rPA(3+4)m, обработанная вторичными противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с или с CF™ 488A, в отсутствие первичных антител.

(А, Г), (Б, Д), (В, Е) – изображения, попарно полученные в режиме флуоресценции и фазового контраста, соответственно.

Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.