

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ВАКЦИН НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

С.И. Татьков¹, Е.В. Дейнеко¹, Д.П. Фурман^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия,
e-mail: tatkov@bionet.nsc.ru

В обзоре рассматриваются современные достижения в разработке новых вакцин против туберкулеза. Представлены данные по применению различных секретрируемых антигенов *M. tuberculosis* в качестве компонентов субъединичных вакцин. На конкретных примерах рассматривается положение о необходимости конструирования искусственных антигенов, объединяющих в своем составе по несколько антигенов (эпитопов) из *M. tuberculosis*. Обсуждается перспектива создания «съемной» вакцины против туберкулеза на основе трансгенных растений.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, антигены, субъединичная вакцина, трансгенные растения, эпитоп, съедобная вакцина.

Введение

В последние годы в России так же, как и во многих других странах мира, сложилась катастрофическая ситуация по туберкулезу, который в настоящее время является инфекционным заболеванием с наибольшим летальным эффектом. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), туберкулезом ежегодно заболевает около 8 млн человек и около 3 млн заболевших погибает. Наблюдаемый в мире с начала 1990-х годов неуклонный рост показателя смертности связан с распространением ВИЧ, поскольку туберкулез является основной причиной смерти больных с синдромом приобретенного иммунного дефицита: при сочетании этих патологий продолжительность выживания составляет в среднем два месяца (Ormerod *et al.*, 1994).

Серьезной проблемой в лечении туберкулеза стало возникновение лекарственно-резистентных штаммов микобактерий туберкулеза *M. tuberculosis*. Вызываемые ими лекарственно устойчивые формы туберкулеза получили значительное распространение во многих странах Азиатского и Африканского континентов.

По числу и спектру препаратов, к которым обнаруживается лекарственная устойчивость *M. tuberculosis*, различают варианты с множест-

венной лекарственной устойчивостью (МЛУ), широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) и тотальной лекарственной устойчивостью (ТЛУ). МЛУ-штаммы устойчивы как минимум к двум антибиотикам – рифампицину и изониазиду, наиболее эффективным противотуберкулезным препаратам первого ряда. ШЛУ-штаммы устойчивы, кроме того, к любому из фторхинолонов, а также к одному или большему числу инъекционных препаратов – капреомицину, канамицину, амикацину. ТЛУ-штаммы устойчивы к любым из известных в настоящее время противотуберкулезных препаратов.

Очевидно, что распространение лекарственно устойчивых штаммов требует как создания новых лекарственных препаратов, так и интенсификации усилий по созданию принципиально новых иммунопрофилактических средств. По инициативе ВОЗ с 2006 г. объявлена глобальная программа борьбы с туберкулезом «The Global Plan to Stop TB», в рамках которой одно из ведущих мест занимает программа разработки вакцин нового поколения.

Туберкулез: краткие сведения

Туберкулез – это заболевание человека и животных, вызываемое некоторыми видами

микобактерий. Микобактерии (*Micobacterium*) – родовое название аэробных, не образующих спор неподвижных бацилл с большим содержанием липидов в клеточной стенке, широко распространенных в окружающей среде. Известно более 40 видов микобактерий, но лишь немногие из них способны вызывать заболевание. Такие виды близкородственных медленно растущих микобактерий называют микобактериями туберкулезного комплекса (МТК). К нему относят *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. microti* и *M. avium*. В патогенезе туберкулеза у человека ведущая роль принадлежит открытому в 1882 г. Р. Кохом *M. tuberculosis*, однако в районах Африки, прилегающих к Сахаре, случаи заболевания туберкулезом обусловлены инфицированием населения *M. africanum* и *M. canetti*. *M. bovis* вызывает заболевание у широкого круга теплокровных, включая человека, *M. microti* – патогенен для мышей, *M. avium* – для птиц. В современной микробиологической классификации микобактерии вида *M. avium* относят к нетуберкулезным микобактериям комплекса avium-intracellular, которые вызывают менее распространенные болезни человека и животных – микобактериозы.

Генотипически микобактерии туберкулезного комплекса очень похожи. Уровень гомологии их ДНК – 99,9 %, однако ряд фенотипических различий и особенно круг хозяев позволили сохранить за ними видовые названия.

Основным резервуаром и источником аэрогенной туберкулезной инфекции является бациллярный больной, выделяющий большое количество микобактерий с мокротой или слюной. Кроме того, заражение может происходить алиментарным путем – через употребление молока и молочнокислых продуктов от коров, пораженных *M. bovis*, или яиц от кур, инфицированных *M. avium*. Возможна и контактная передача инфекции через поврежденные кожные покровы, например, при доении больных животных. В результате аэрогенного заражения туберкулезный процесс чаще возникает в органах дыхания, при алиментарном инфицировании могут поражаться почки, легкие, кости и суставы, периферические лимфоузлы, мочеполовые органы, глаза, центральная нервная система. В зависимости от основных клинических

проявлений различают легочную и нелегочные формы туберкулеза. Туберкулез легких остается наиболее распространенной и опасной формой заболевания. При этом инфицированным может оказаться любой орган, в том числе кожа. Из внелегочных форм наиболее часто встречаются туберкулез мочеполовой системы, костей и суставов, а также периферических лимфоузлов.

Однако заражение человека или животных микобактериями туберкулезного комплекса не является достаточным условием для развития заболевания, так как у 90 % инфицированных *M. tuberculosis* людей никогда не возникает активных форм туберкулеза (Nagelkerke, De Vlas *et al.*, 2006). Предполагается, что заболевание начинает прогрессировать в результате каких-то, зачастую временных или даже кратковременных, нарушений функционирования иммунной системы. В литературе обсуждается несколько возможных механизмов возникновения таких нарушений, в том числе и недавно сформулированное предположение о вовлечении в формирование дисфункций иммунитета вирусных сопутствующих инфекций, в первую очередь ВИЧ (Hussain *et al.*, 2007).

Совершенствование вакцины против туберкулеза

В настоящее время для предупреждения туберкулеза широко используется вакцинирование новорожденных детей живой вакциной БЦЖ. БЦЖ представляет собой живой аттенуированный штамм *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guerin, Бацилла Кальметта-Герена), сохранивший свои антигенные и иммуногенные свойства. Дешевизна производства этой вакцины и безопасность ее применения обеспечили широкое распространение вакцинирования как основного средства профилактики туберкулеза (Orme, 1999). С 1948 по 1986 гг. БЦЖ были вакцинированы около 2,5, а к 1995 г. – уже около 3 млрд человек (Jacobs *et al.*, 1987; Hanson *et al.*, 1995). Опыт применения вакцины БЦЖ показал ее высокую эффективность против развития туберкулеза у детей и слабую протективную активность или полное отсутствие защитного эффекта против легочных форм туберкулеза у взрослых (Jacobs *et al.*, 1987; Haile, Kallenius, 2005; Kallenius *et al.*, 2007). Вакцинация БЦЖ

в детском возрасте эффективно предохраняет от заболевания миллиарной формой туберкулеза легких и туберкулезным менингитом (Surekha Rani *et al.*, 2005). В последние годы, однако, усиливаются сомнения относительно ее универсальности и эффективности (Mustafa, 2002).

Отмечаемые вариации протективной активности БЦЖ могут быть следствием различий как в иммунологическом статусе вакцинированных людей, так и между вакцинными штаммами (Maes *et al.*, 1996; Collins, Kaufmann, 2001). Завершенное 60-летнее изучение результатов вакцинации американских индейцев показало, что долгосрочная эффективность БЦЖ-вакцинирования составила 52 % (Haile, Kallenius, 2005). Следует отметить, что БЦЖ, подобно другим живым вакцинам, способна вызывать отрицательные побочные эффекты (Klein, 2000). Осложнения при вакцинации БЦЖ наблюдаются, в частности, у детей, инфицированных ВИЧ еще до рождения (Hesseling *et al.*, 2004). Часто отмечается воспаление подмышечных лимфоузлов со стороны введения вакцины. При этом БЦЖ высевается как из материала пораженного лимфоузла, так и из желудочного сока, и высеваемые бактерии уже могут быть устойчивыми к некоторым из противотуберкулезных препаратов, например к изониазиду. В ходе лечения этих побочных проявлений вакцинирования БЦЖ может приобретать лекарственную устойчивость и к рифампицину, обусловленную, как показано, мутацией в гене *rpoB*. Таким образом, оказывается необходимым контролировать лекарственную устойчивость вакцины как до ее использования, так и в ходе лечения побочных эффектов вакцинации (Hesseling *et al.*, 2004).

К настоящему времени назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом, в первую очередь с его легочной формой (Sierra, 2006). Очевидно, что их получение требует более глубокого понимания ключевых событий, происходящих на клеточном и молекулярном уровнях и обеспечивающих формирование иммунитета (Xing, 2001). Кроме того, поскольку приблизительно 1/3 населения Земли уже инфицирована *M. tuberculosis*, речь должна идти о создании «постинфекционной» вакцины. Такая вакцина должна удовлетворять ряду требований: вызы-

вать стойкий специфический иммунитет; иметь минимум побочных эффектов и быть приемлемой по цене для повсеместного использования, что особенно важно для стран третьего мира. По-настоящему эффективная вакцина должна индуцировать более сильный иммунный ответ, чем тот, что формируется при естественном инфицировании *M. tuberculosis*. Кроме того, новая вакцина должна эффективно защищать группы населения как ранее вакцинированные БЦЖ, так и инфицированные *M. tuberculosis* и/или ВИЧ, и предупреждать возникновение легочных форм туберкулеза (Martin, 2005).

В ближайшее время, видимо, появится вакцина, способная усиливать протективный эффект вакцинирования БЦЖ при комбинированном воздействии. В более долгосрочной перспективе будет разработана вакцина, которая придет на смену БЦЖ. Скорее всего, одним из кандидатов может оказаться безопасная живая вакцина на основе новых штаммов *M. tuberculosis* (Martin, 2005).

К середине 1990-х гг. обозначилось три основных направления разработки противотуберкулезной вакцины: получение ауксотрофных мутантов *M. tuberculosis*, совершенствование БЦЖ путем создания ее рекомбинантных аналогов, секретирующих цитокины или содержащих гены вирулентного штамма *M. tuberculosis* (Nor, Musa, 2004); создание ДНК-вакцин (Mollenkopf *et al.*, 2001) или субъединичных вакцин с использованием основных белков *M. tuberculosis* (Orme, 1995, 1999; Smith, 2003), а также использование рекомбинантных штаммов БЦЖ в качестве средства доставки гетерологичных антигенов (Hanson *et al.*, 1995).

Исследования по этим же направлениям, но дополненные использованием микобактериальных липидов в качестве вакцины или адъювантов, продолжались и в 2000-е гг. (Agger, Andersen, 2002; Young, Stewart, 2002; Kumar *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2010a, b). Адъювантами называются вещества, усиливающие специфический иммунный ответ при вакцинировании. Механизмы действия адъювантов различны, поэтому их подбирают с учетом желаемого конкретного типа формируемого иммунного ответа (гуморальный, клеточный или мукозальный) и способа введения вакцины (Vogel, 2000). В качестве адъювантов могут быть исполь-

зованы и цитокины (Xing, 2001), в том числе γ -интерферон или его аналоги (Азаев и др., 2004, 2007).

Важным направлением повышения эффективности вакцины является оптимизация ее формы в целях преимущественной индукции иммунного ответа клеточного типа (Young, 2000). В качестве векторов доставки рассматривались внутриклеточные паразиты: *M. tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* (Mollenkopf *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009) и ряд вирусов (Xing, Lichty, 2006; Perera *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Определенные возможности просматриваются и в использовании различных нуклеопротеиновых комплексов (Азаев и др., 2007).

Совершенствование методов подбора адъювантов и систем доставки позволяет с оптимизмом оценивать перспективы создания субъединичных вакцин против туберкулеза, которые бы стимулировали Т-клеточный иммунный ответ (Reed *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2009; Kamath *et al.*, 2009; Henriksen-Lacey *et al.*, 2010, 2011).

К началу 2000 г. уже имелось несколько вакцин-кандидатов, для которых были получены положительные результаты в доклинических испытаниях на моделях мышей и морских свинок при аэрозольном введении (Orme *et al.*, 2001). Три из них с 2003 г. находятся на стадии клинических испытаний (Orme, 2001, 2005; Reed *et al.*, 2003). К 2005 г. различными группами исследователей было разработано более 200 новых кандидатных вакцин против туберкулеза (Haile, Kallenius, 2005) и для некоторых из них начаты клинические испытания. Наибольшие успехи достигнуты при использовании вакцин на основе рекомбинантных штаммов *M. bovis* БЦЖ, живых аттенуированных *M. tuberculosis*, ДНК-вакцин и субъединичных вакцин с добавкой новых адъювантов (Brennan *et al.*, 2004).

В 2005 г. была начата подготовка к клиническим испытаниям кандидатных вакцин в США (Rowland *et al.*, 2005), а в Европе был создан противотуберкулезный кластер (TB Vaccine Cluster), который финансировался 5-й рамочной программой Евросоюза. Участниками европейского кластера было разработано не менее 24 кандидатных вакцин, показавших свою эффективность на различных животных моделях (Williams *et al.*, 2005). Иммунологическая оценка

кандидатных вакцин осуществляется на основе рекомендаций ВОЗ (Hanekom *et al.*, 2008).

Антигены, перспективные для создания вакцин

К началу 2000 г. уже было получено несколько вариантов субъединичных вакцин, однако их протективный эффект при испытаниях оказался в ряде случаев непредсказуемым и сильно варьировал. Для преодоления этого недостатка предлагалось создавать и использовать конструкции, обеспечивающие коэкспрессию рекомбинантных антигенов с цитокинами, или использовать рецептуры, содержащие рекомбинантные антигены и цитокины (Sharma, Khuller, 2001; Xing, 2001).

Среди нескольких групп антигенов *M. tuberculosis* с протективной активностью центральное место занимают секретируемые белки (Mustafa *et al.*, 2002).

Секретируемые белки *M. tuberculosis*

Аннотирование генома *M. tuberculosis* штамма H37Rv показало, что он содержит 3995 открытых рамок трансляции (ОРТ), но лишь для 52 % из них удалось предсказать функциональную активность (Camus *et al.*, 2002). Все выявленные гены получили порядковые номера, следующие за аббревиатурой Rv.

Анализ протеома *M. tuberculosis* с применением методов двумерного электрофореза в сочетании с MALDI-MS фингерпринтингом (Jungblut *et al.*, 1999) позволил выявить не менее 1800 клеточных и 800 секретируемых белков.

По-видимому, именно среди секреторных белков в первую очередь следует искать антигены, перспективные для создания новых вакцин (Skjot *et al.*, 2000). Однако идентификация таких потенциальных антигенов представляет собой непростую задачу, поскольку, с одной стороны, все еще отсутствуют точные данные о полном спектре секретируемых белков, выделяемых *M. tuberculosis* в организме больного, а с другой стороны, известно, что их количественный и качественный составы могут существенно изменяться в зависимости от реакции организма при инфицировании и от течения заболевания (Laal, Skeiky, 2005).

Для идентификации генов, кодирующих белки, накапливающиеся в культуральной жидкости в ходе роста микобактерий туберкулеза, применяется иммунохимический скрининг геномных экспрессионных библиотек *M. tuberculosis* высокоцитотражными кроличьими антисыворотками, полученными в ответ на иммунизацию животных очищенными секретуемыми белками (CFPs). С этой же целью проводится инкубирование различных фракций секретуемых белков *M. tuberculosis* с мононуклеарными клетками крови доноров, вакцинированных БЦЖ, невакцинированных или больных туберкулезом (Surekha *et al.*, 2005).

В эксперименте по исследованию влияния 10 фракций секретуемых белков *M. tuberculosis* (14–90 кДа) на лимфоцитарный пролиферативный индекс и синтез γ -интерферона и ИЛ-2 мононуклеарными клетками периферической крови детей-доноров из перечисленных групп было показано, что для создания вакцины наиболее перспективны секретуемые белки фракции 30–34 кДа вызывающие наиболее выраженный иммунный ответ (Surekha *et al.*, 2005).

Семейство ESAT-6

К семейству ESAT-6 относят низкомолекулярные ранние секретуемые белки, которые кодируются более чем 20 генами (Brosch *et al.*, 2007). К их числу относят не только собственно ESAT-6 (синонимы: *esxA*, *Rv3875*, *MT3989*, *MTV027.10*), но и белки, кодируемые рамками *Rv0287*, *Rv0288* (TB10.4), *Rv2346c*, *Rv2347c*, *Rv3619c*, *Rv3620c*, *Rv3890c* (*Mb3919c*), *Rv3905c* (*Mb3935c*) и *CFP-10* (*Rv3874*) (Smith, 2003; Brosch *et al.*, 2007), по нуклеотидным последовательностям которых между *M. bovis* и *M. tuberculosis* наблюдаются различия.

Белки семейства высокоиммуногенны и специфичны (Skjot *et al.*, 2000). По уровню синтеза γ -интерферона мононуклеарными клетками периферической крови доноров в ответ на их контакт с соответствующими антигенами наибольшую иммуногенность демонстрируют TB10.4 > CFP-10, \approx ESAT-6. Два из членов семейства – ESAT-6, CFP-10 – кодируются *esx-lhp*-опероном в RD1-области генома *M. tuberculosis* и являются иммунодоминантными

T-клеточными антигенами (Okkels *et al.*, 2003). TB10.4 – продукт гена *Rv0288* – был впервые выделен из низкомолекулярной фракции культурального фильтрата *M. tuberculosis* на ранней стадии культивирования (Skjot *et al.*, 2000).

Функция названных белков пока неизвестна, но они, как экспериментально доказано, опознаются Th1-клетками и могут быть использованы при создании субъединичной вакцины (Mustafa, Shaban, 2006). Для этой же цели, по видимому, может оказаться перспективным и способным к образованию комплекса с TB10.4 белок *Rv0287*.

Семейство сериновых протеаз

Среди секретуемых белков *M. tuberculosis* были обнаружены и идентифицированы два антигена МТВ32 (А и В) (Skeiky *et al.*, 1999), гомология которых составляет 66 %. Масса каждого из белков без сигнального пептида около 32 кДа. Оба относятся к семейству сериновых протеаз. Ген *mtb32a* представлен в геноме *M. tuberculosis* единственной копией. Соответствующий белок обнаруживается среди секретуемых белков как вирулентных (H37Rv, Erdman, клинический изолят CSU93), так и невирулентных (H37Ra) штаммов *M. tuberculosis*. Гомолог МТВ32 был обнаружен и у *M. bovis* БЦЖ. Однако в качестве кандидата для субъединичной вакцины рассматривается МТВ32А, а не МТВ32В, поскольку на него не реагируют мононуклеарные клетки из периферической крови инфицированных лиц. Он может быть также перспективен для создания диагностикумов туберкулеза.

Другие семейства

CFP32 (*Rv0577*) – секретуемый белок, предположительно глиоксилаза, с молекулярной массой 32 кДа, который присутствует только у микобактерий туберкулезного комплекса (МТК). Первичная структура CFP32 одинакова у всех представителей комплекса. При секвенировании ПЦР-фрагментов соответствующего гена какого-либо полиморфизма не обнаружено. При культивировании микобактерий белок детектируется иммуноблоттингом в культуральной жидкости и клеточных цитозольных компартаментах. По результатам иммуноферментного

анализа (ИФА) у 32 % больных легочной формой туберкулеза в сыворотке обнаруживаются антитела против CFP32, а сам белок выявляется в сыворотке 56 % больных. Уровень CFP32 в сыворотке коррелирует с концентрацией в ней интерлейкина-10 (иммуносупрессивного цитокина, предположительно играющего важную роль в прогрессировании заболевания) и не показывает корреляции с уровнем γ -интерферона, ключевого фактора при формировании протективного иммунитета (Huard *et al.*, 2003). Белок перспективен как для использования в качестве мишени противотуберкулезных лекарственных средств, так и для диагностики заболевания.

Антигенный комплекс 85

Среди белков, секретируемых *M. tuberculosis*, а также в клеточной оболочке бактерии были обнаружены белки трехкомпонентного антигенного комплекса Ag85 в составе Ag85A, Ag85B и Ag85C (Belisle *et al.*, 1997). Все они обладают мукозил-трансферазной активностью и катализируют биосинтез наиболее распространенных гликолипидов клеточной стенки (Dover *et al.*, 2007; Goude, Parish, 2008), в том числе и вирулентного корд-фактора (Elamin *et al.*, 2009). Белки Ag85 обладают близкой молекулярной массой, составляющей 30–32 кДа (Daniel, Janicki, 1978; Sada *et al.*, 1990; Laal, Skeiky, 2005). Установление рентгеноструктурным методом их пространственной структуры (Ronning *et al.*, 2000) открыло возможности для целенаправленного синтеза ингибиторов ферментной активности и создания новых противотуберкулезных препаратов. Концентрация белков комплекса среди других секретируемых белков в зависимости от условий культивирования варьирует от 14 до 60 % (Wiker, Harboe, 1992). Показано, что рекомбинантный антиген 85A обеспечивает протективный иммунитет, и некоторые из вариантов субъединичных вакцин на его основе уже находятся на стадии клинических испытаний в Африке (McShane *et al.*, 2005). Большой интерес вызывает и антиген 85B, который в сочетании с другими антигенами *M. tuberculosis*, в частности ESAT6, рассматривается в качестве серьезного кандидата для создания субъединичной вакцины (Olsen *et al.*, 2004; Langermans *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009,

2010; Christensen *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010; van Dissel *et al.*, 2010, 2011).

Мультиэпитопные белки

По-видимому, невозможно создать субъединичную вакцину против туберкулеза, основанную на одном каком-нибудь рекомбинантном антигене. Более перспективным является использование для этих целей гибридных белков, в составе которых объединяются несколько антигенов или несколько эпитопов из различных антигенов (Andersen, Doherty, 2005; Luo *et al.*, 2009; Davila *et al.*, 2010; Aagaard *et al.*, 2011). Рассмотрим некоторые примеры таких искусственных белков.

Гибридный белок ESAT-6-Ag85. Очень хорошую индукцию протективного иммунитета на модели туберкулеза у морских свинок показал белок, полученный слиянием эпитопов антигенов 85A и ESAT-6 (Olsen *et al.*, 2004). Слитный белок Ag85A-ESAT-6 проявил существенно более выраженное иммуногенное действие, чем его составляющие. При введении в адьюванте морским свинкам он защищал их от инфицирования *M. tuberculosis* в той же степени, что и БЦЖ. В результате иммунизации животных развитие заболевания после инфицирования *M. tuberculosis* существенно замедляется и увеличивается продолжительность жизни, однако проблема выбора наиболее эффективного средства доставки препарата сохраняется (Williams *et al.*, 2005).

Mtb72f – антиген, по-видимому, один из самых перспективных для создания субъединичной вакцины (Mitsuyama *et al.*, 2003). Он был получен тандемным объединением трех эпитопов Mtb32C-Mtb39-Mtb32N (Skeiky *et al.*, 2004). Соответствующий объединенный ген кодирует полипептид массой 72 кДа. При иммунизации мышей C57BL/6 «голой» ДНК с этим геном возникает сильный γ -интерфероновый ответ на инкубацию моноцитов с первыми двумя компонентами полипептида (Mtb32C, Mtb39) и сильный ответ CD8 Т-клеток, направленный исключительно против Mtb32C. Если же вводить мышам полипептид Mtb72f, то сила и направленность иммунного ответа формируются в зависимости от используемого адьюванта. При введении в адьюванте AS02A

индуцируется умеренный γ -интерфероновый и слабый CD8-Т-клеточный ответ. При введении в адьюванте AS01B – мощный иммунный γ -интерфероновый и гуморальный ответ против всех трех компонент полипептида, в дополнение к которому наблюдается такой же по силе, как и при введении ДНК Mtb72f, CD8-Т-клеточный ответ, направленный исключительно против Mtb32C-эпитопа. Все три способа иммунизации (ДНК-, в адьювантах AS01 и AS02) привели к формированию протективного иммунитета у мышей C57BL/6 против аэрозольного заражения вирулентными штаммами *M. tuberculosis*. Также, что особенно важно, был сформирован протективный иммунитет у морских свинок (выживаемость более 1 года после аэрозольной инфекции), сравнимый по параметрам с вакцинированием БЦЖ. В 2004 г. субъединичная вакцина Mtb72f в AS02 была одной из первых кандидатных вакцин выведена на 1-ю фазу клинических испытаний на добровольцах. Была также получена рекомбинантная БЦЖ (72f BCG), экспрессирующая данный антиген (Okada, Shirakawa, 2005).

Среди секретируемых белков *M. tuberculosis* наиболее интересны для создания вакцины те, которые способны вызывать сильный Т-клеточный ответ и секрецию γ -интерферона, интегральных компонентов защиты против туберкулеза (Ben Amor *et al.*, 2005; McMurry *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2009). Очевидно, что такие белки должны содержать Т-клеточные эпитопы или мотивы связывания с белками МНС II (белками класса II главного комплекса гистосовместимости).

Дополнительные возможности поиска кандидатных вариантов для создания мультиэпитопных вакцин открывает внедрение компьютерных методов анализа нуклеотидных и белковых последовательностей.

С помощью интернет-доступных программ SignalP и Prosite в полногеномных последовательностях штаммов H37Rv и CDC 1551 *M. tuberculosis* были определены рамки считывания предполагаемых секретируемых белков (McMurry *et al.*, 2005). Далее с использованием собственной запатентованной программы эти авторы проанализировали соответствующие белки на наличие мотивов связывания с МНС II и обнаружили 65 тыс. таких последо-

вательностей или 5 % от проскринированных 1,3 млн первичных структур. Было синтезировано 17 полипептидных последовательностей с наибольшим рангом и изучена их возможность стимулировать синтез γ -интерферона и пролиферацию Т-лимфоцитов *in vitro*. Для этих целей отбирали периферическую кровь у здоровых доноров, у которых, однако, результаты кожной пробы с туберкулином были положительными. В экспериментах *in vitro* 8 полипептидов стимулировали пролиферацию лимфоцитов, 15 – синтез γ -интерферона (IFN- γ ELISpot), причем один из них, MT2281-26-J (WRRRPLSSALLS-FGLLLGGLPL), индуцировал синтез γ -интерферона в пробах от 11 из 25 доноров (44 %). В целом выявленные 15 эпитопов, и в особенности MT2281-26-J, представляются хорошими кандидатами для включения в мультиэпитопную противотуберкулезную вакцину (McMurry *et al.*, 2005).

Поиск Т-эпитопов возможен и с помощью другой программы, доступной через Интернет, – ProPred (Mustafa, Shaban, 2006). С ее помощью были отысканы мотивы в ESAT-6, CFP10, MPT70, связывающие более 50 % из панели белков главного комплекса гистосовместимости HLA-DR, насчитывающей 51 полипептид. К таким мотивам относится район 69–77 а.о. в ESAT-6, две области в CFP10 (55–66 и 76–84 а.о.) и четыре – в MPT70 (1–11, 81–95, 124–140 и 192–191 а.о.). Для проверки антигенности этих участков были синтезированы перекрывающиеся пептиды и изучена их презентация Т-клеткам, в результате которой подтвердилось, что мотивы 69–77 а.о. (ESAT-6), 76–84 (CFP10), 182–191 (MPT70) узнаются Th1-клетками и могут быть отнесены к Т-эпитопам.

Дополнительный источник перспективных антигенов появился после сравнительного анализа геномов *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. bovis* БЦЖ, в результате которого были выявлены области, присутствующие только у *M. tuberculosis* и содержащие открытые рамки считывания (Mustafa *et al.*, 2002). Эти области получили название районов различий – RD (region of difference). Среди белков, кодируемых RD, наряду с уже идентифицированными ESAT-6 и CFP-10 могут оказаться и новые белки с высокой иммунологической реактивностью, перспективные в качестве компонентов субъ-

единичных вакцин или реагентов для диагностики туберкулеза. Суммарно во всех RD закодировано до 100 белков (Mustafa, 2005). Наиболее иммунологически реактивные из них могли бы быть хорошими кандидатами как для создания вакцин, так и для разработки специфических тест-систем для выявления туберкулеза.

Одними из направлений изучения белков в этом аспекте являются получение их рекомбинантных аналогов или перекрывающихся синтетических пептидов и изучение их серологической и Th1-клеточной реактивности. Таким образом был выявлен ряд антигенов, кодируемых в RD1-области, перспективных для создания специфических диагностикумов в низкокэндемичных районах и кандидатных вакцин (Mustafa, 2005). К их числу относятся ORF14, ESAT6, присутствующие во всех вирулентных штаммах *M. tuberculosis* и определяющие степень вирулентности (Okkels *et al.*, 2003), а также CFP10, PE, PPE.

Для разработки вакцин широко используются специальные компьютерные программы, ориентированные на выявление в структуре антигенов мотивов, способных к связыванию с несколькими HLA-белками. Такие мотивы и содержащие их антигены, опознаваемые Т-клетками, могут иметь перспективы для создания субъединичных вакцин для профилактики туберкулеза и диагностических тест-систем для его выявления (Mustafa, 2005).

Способы введения противотуберкулезных вакцин

Существует два основных способа введения живой вакцины БЦЖ: пероральный и парентеральный (внутрикожный, подкожный). Первоначально БЦЖ предназначалась исключительно для перорального введения. В Бразилии до сих пор коммерчески доступен штамм *M. bovis* БЦЖ Mogueau Rio de Janeiro, пригодный для пероральной вакцинации детей и взрослых (Badell *et al.*, 2009).

От способа вакцинации БЦЖ зависит структура поствакцинальных осложнений. При пероральном введении встречаются шейные лимфадениты, грануляционные отиты. Причиной осложнений у прививаемых младенцев является проникновение жидкой вакцины из носовой

части глотки через слуховую трубу в среднее ухо, особенно при срыгивании. При переходе на внутрикожный метод стали регистрироваться осложнения в виде локальных воспалительных реакций на коже в месте введения вакцины или в региональных лимфатических узлах.

От практики перорального введения вакцины БЦЖ отказались по двум причинам: во-первых, из-за резкого (в 10–100 раз) снижения жизнеспособности БЦЖ под действием низкого рН желудочного сока и действия пищеварительных ферментов, что приводило к необходимости назначения повышенных доз вакцины, и, во-вторых, из-за частого развития шейных лимфаденопатий (Блум, Файн, 2002).

В настоящее время широко применяется подкожное введение БЦЖ (Badell *et al.*, 2009). Новые кандидатные вакцины против туберкулеза также в основном вводятся парентеральным способом, т. е. минуя пищеварительный тракт.

Однако *M. tuberculosis* попадает в организм человека преимущественно аэрогенным путем через слизистую или мукозальную оболочку легких. Вакцины, ориентированные на формирование иммунного ответа на уровне слизистых и предназначенные для введения через дыхательные пути, бесспорно, перспективны для вакцинирования против туберкулеза, поскольку они стимулируют иммунную реакцию уже в месте внедрения активного начала (Hall *et al.*, 2010).

Так, было доказано, что всего 10 бактерий БЦЖ, введенных в виде аэрозоля морским свинкам, обеспечивают такой же или даже более высокий уровень иммунитета, чем гораздо большие дозы вакцины, введенные внутрикожно или подкожно. В эксперименте на макаках резус аэрозольное введение БЦЖ или материала ее клеточных стенок обеспечивало достаточный уровень протекции и не сопровождалось выражением туберкулиновых проб, т. е. не наблюдалось перехода ранее отрицательной туберкулиновой пробы в положительную, что свидетельствовало о сохранении статуса иммунизации. Кроме того, было установлено, что аэрозольное введение здоровым добровольцам вакцины БЦЖ не сопровождалось какими-либо побочными реакциями (Блум, Файн, 2002).

Важным аргументом в пользу применения мукозальных вакцин является и отсутствие

травматизации пациента, неизбежной при инъекционном способе введения.

Учитывая, что местный и системный иммунные ответы тесно связаны, а вакцинирование через слизистые оболочки минимизирует риски, обусловленные повреждением кожных покровов при вакцинации, следует, видимо, ожидать постепенного перехода от инъекционных к мукозальным вакцинам (Reljic *et al.*, 2006; Xing, Lichty, 2006).

Новые возможности для введения субъединичных вакцин против туберкулеза открылись с развитием биотехнологических методов, давших, в частности, возможность получения трансгенных растений и их использования как средства доставки вакцин в организм (Salyaev *et al.*, 2010).

Трансгенные растения – продуценты «съедобных» вакцин

При разработке вакцин нового поколения, основанных на получении рекомбинантных антигенов, актуальным остается вопрос о поиске высокоэффективных и экономически выгодных систем экспрессии для наработки соответствующих белков-антигенов. В настоящее время для этих целей используются *E. coli*, *S. cerevisiae*, культуры клеток человека и насекомых (Sourrouille *et al.*, 2009). Однако эти системы не лишены недостатков, связанных с посттрансляционными модификациями рекомбинантных белков, продолжительностью наработки продукта, ограниченным пролиферативным потенциалом, высокой стоимостью компонентов культуральных сред и т. д.

Новые перспективы получения рекомбинантных фармацевтических белков открываются с использованием генетически модифицированных растений (Ma *et al.*, 2005; Hefferon, 2010). Генетически модифицированные растения могут служить более дешевым и безопасным источником рекомбинантных белков по сравнению с традиционными системами экспрессии на основе бактерий, дрожжей, культур клеток насекомых и млекопитающих (Menkhaus *et al.*, 2004; Boehm, 2007; Frutos *et al.*, 2008; Sourrouille *et al.*, 2009).

Привлекательность растений в качестве систем экспрессии для накопления рекомбинантных

фармацевтически ценных белков обеспечивается многими обстоятельствами. Прежде всего, в растительных тканях нет риска загрязнения агентами, патогенными для млекопитающих – вирусами и прионами. Растительные клетки обеспечивают правильную посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка, характерную для эукариотических клеток, а также его сборку и фолдинг (Ma *et al.*, 2005).

Экспрессированные в растительных клетках рекомбинантные белки могут быть направлены в различные компартменты растительной клетки (вакуоли или люмены эндоплазматического ретикулума), а также в апопласт и различные органы растения (семена, клубни, плоды и т. д.). Благодаря этому рекомбинантные белки в растительных тканях могут сохраняться длительное время (месяцы и годы) без каких-либо изменений и снижения биологической активности (Sourrouille *et al.*, 2009).

Немаловажным является и тот факт, что разработанные к настоящему времени методы агробиологического возделывания хозяйственно важных видов растений, а также системы семеноводства для той или иной культуры делают растения привлекательными для их использования в качестве биофабрик белков медицинского назначения.

Важно отметить, что растения, не подвергаемые термообработке, могут использоваться в качестве готового продукта для профилактики и лечения заболеваний. Такие растения, в тканях которых синтезируются и накапливаются рекомбинантные бактериальные антигены, привлекательны для использования в качестве вакцин и получили специальное название – «съедобные» вакцины (Mason *et al.*, 2002; Rybiski, 2008; Tecson *et al.*, 2008; Yusibov, Rabindran, 2008). Более того, трансгенные растения представляют собой удобные модели для разработки новых альтернативных способов доставки (перорально и интраназально) рекомбинантных белков в организмы теплокровных.

Формирование иммунного ответа при использовании «съедобных» вакцин

Механизм иммунизации съедобными вакцинами основан на антиген-представляющей способности перитонеальных макрофагов тон-

кого кишечника млекопитающих. В кишечнике чужеродный белок, обладающий антигенными свойствами, распознается специальными М-клетками, которые широко представлены в толще слизистого эпителия. М-клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам и В-лимфоцитам, находящимся в лимфоидных образованиях тонкого кишечника (пейеровых бляшках). В результате презентации антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хэлперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты. Дифференцированные В-клетки выходят из лимфоидных фолликулов слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию в мезентеральные лимфатические узлы, где происходят их созревание и превращение в плазматические клетки, синтезирующие основной иммуноглобулин секрета слизистых – иммуноглобулин А (sIgA) – так называемый маркер «местного иммунитета».

Плазматические клетки способны снова мигрировать к слизистым оболочкам дыхательных путей, желудочно-кишечного и мочеполового трактов. Секреторный иммуноглобулин блокирует адгезию патогенов к поверхностям слизистых оболочек, предотвращая их проникновение в подлежащие ткани и обеспечивая тем самым барьерную функцию слизистых как первой линии иммунологической защиты на пути патогенных агентов. Микробные антигены являются одним из активных стимулов для синтеза sIgA в кишечнике.

Учитывая, что мукозная вакцинация стимулирует как местный иммунный ответ на уровне слизистых оболочек, так и общий иммунный ответ организма, получение «съедобных» вакцин стало одним из перспективных направлений создания экономически эффективных вакцин (Щелкунова, Щелкунов, 2008). К настоящему времени созданы трансгенные растения табака, томата, салата-латука, масляной репы, арабидопсиса и турнепса, в которые перенесены гены, контролирующие синтез различных антигенов и антител.

Необходимо отметить, что для наработки рекомбинантных белков и создания «съедобных» вакцин в основном используются генетически модифицированные растения с ядерной трансформацией, т. е. со встройкой чужеродного гена

в ядерный геном растения. Кроме этого, используются транспластомные растения с доставкой чужеродного гена в хлоропластный геном, а также метод агроинфильтрации, основанный на транзиентной (временной) экспрессии чужеродных генов в растительных клетках. Более подробную информацию о состоянии исследований по созданию «съедобных» вакцин на основе генетически модифицированных растений можно найти в обзорных статьях специального выпуска Т. 9, № 8 журнала «Expert Review of Vaccines» за 2010 г. и в цитируемых работах (Рукавцова и др., 2006; Sourrouille *et al.*, 2009; Hefferon, 2010).

Разработка «съедобных» вакцин против туберкулеза

Как было установлено, доставка антигенов *M. tuberculosis* через слизистые оболочки (перорально или интраназально) может приводить к формированию протективного иммунного ответа. Этот факт открыл новые перспективы для возрождения перорального способа иммунизации против туберкулеза путем использования трансгенных растений. Накопление антигенов в тканях растений, непосредственно употребляемых в пищу без предварительной кулинарной обработки, вызывает большой интерес для разработки вакцин нового поколения, поскольку целлюлозная оболочка растительной клетки может выступать в качестве микрокапсулы и защищать ее содержимое от повреждающего действия рН среды и ферментов желудочно-кишечного тракта. Более того, для предотвращения иммунологической толерантности в слизистых оболочках кишечника можно создавать такие трансгенные растения, которые бы включали не только гены белков оболочек того или иного возбудителя, но и гены белков, служащих адьювантами. Так, например, в растения арабидопсиса были перенесены в слитой форме ген *esat6 M. tuberculosis* и ген субъединицы В термолабильного токсина (LTВ) энтеротоксигенного штамма *E. coli* (Rigano *et al.*, 2004).

В настоящее время в различных лабораториях мира создается широкий набор антигенов, которые выступают мишенями иммунных ответов на *M. tuberculosis*. Среди таких белков следует назвать семейство секретируемых белков

M. tuberculosis Ag85, члены которого, Ag85A и Ag85B, могут быть использованы при создании вакцин нового поколения. Другой многообещающей мишенью является белок ESAT6. Внимание исследователей привлекает и возможность создания «съедобной» вакцины, содержащей одновременно два антигена, например, ESAT6 и Ag85B, накапливаемых в трансгенных растениях салата (Матвеева и др., 2009; Floss *et al.*, 2010). Растения могут быть эффективно использованы для биосинтеза антигенов *M. tuberculosis* на основе транзientной (временной) продукции целевых белков с использованием растительных вирусов в качестве векторов (Zelada *et al.*, 2006; Dorokhov *et al.*, 2007). Разрабатывается технология создания трансгенных растений – продуцентов антигенов ESAT6 и CFP10 *M. tuberculosis*, а также дельтаферона человека в качестве иммуномодулирующего медиатора, гены которых слиты в одной рамке считывания и методом агробактериальной трансформации перенесены в геном растений моркови (Татьков, Дейнеко и др. Неопубл. данные).

Успешность использования для вакцинирования трансгенных растений, в тканях которых накапливаются антигены *M. tuberculosis*, продемонстрирована в работе Rigano и коллег (Rigano *et al.*, 2006). Авторами установлена стимуляция биосинтеза γ -интерферона клетками CD4+ у мышей, что свидетельствовало о формировании иммунного ответа Th1-типа при поедании трансгенных растений.

Заключение

Распространение штаммов *M. tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью делает задачу совершенствования вакцины против туберкулеза еще более важной. Одним из перспективных направлений, как свидетельствуют литературные данные, являются создание искусственных мультиэпитопных антигенов и подбор оптимального способа доставки их в организм человека. Очень хорошие перспективы для возрождения перорального способа вакцинирования против туберкулеза открывают трансгенные растения, в которых происходит биосинтез соответствующих антигенов. Такие растения не только дают возможность с наименьшими

затратами получать необходимые антигены, но и позволяют оптимальным образом решить задачу их доставки к местам формирования иммунного ответа, поскольку их клетки могут выполнять функцию природного «наноконтейнера», обеспечивающего прохождение антигена через желудочно-кишечный тракт и индукцию протективного иммунного ответа.

Литература

- Азаев М.Ш., Лебедев Л.Р., Кузьмичева Г.А. и др. Исследование роли искусственных микобактериальных частиц в реализации иммунологических процессов при экспериментальном туберкулезе животных // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2007. Вып. 2. С. 38–42.
- Азаев М.Ш., Лебедев Л.Р., Туманов Ю.В. и др. Получение искусственных микобактериальных частиц и исследование их иммуногенных свойств // Биотехнология. 2004. Вып. 4. С. 34–40.
- Блум Б.Р., Файн П.Е.М. Опыт вакцинации БЦЖ: будущие вакцины против туберкулеза // Туберкулез. Патогенез, защита, контроль. Пер. с англ. / Под ред. Б.Р. Блума. М.: Медицина, 2002. 696 с.
- Матвеева Н.А., Василенко М.Ю., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Агробактериальная трансформация салата (*Lactuca sativa* L.) конструкциями, несущими гены антибактериальных антигенов *Mycobacterium tuberculosis* // Цитология и генетика. 2009. Вып. 2. С. 27–32.
- Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И., Шульга Н.Я., Быков В.А. Трансгенные растения для фармакологии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2006. Вып. 2. С. 3–12.
- Щелкунова Г.А., Щелкунов С.Н. Съедобные вакцины на основе трансгенных растений // Молекуляр. медицина. 2008. Вып. 1. С. 3–12.
- Aagaard C., Hoang T., Dietrich J. *et al.* A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure // Nat. Med. 2011. V. 17. № 2. P. 189–194.
- Agger E., Andersen P. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure // Vaccine. 2002. V. 21. № 1/2. P. 7–14.
- Andersen P., Doherty T.M. TB subunit vaccines-putting the pieces together // Microbes. Infect. 2005. V. 7. P. 911–921.
- Badell E., Nicolle F., Clark S. *et al.* Protection against tuberculosis induced by oral prime with *Mycobacterium bovis* BCG and intranasal subunit boost based on the vaccine candidate Ag85B-ESAT-6 does not correlate with circulating IFN-gamma producing T-cells // Vaccine. 2009. V. 27. № 1. P. 28–37.

- Belisle J.T., Vissa V.D., Sievert T. *et al.* Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis // *Science*. 1997. V. 276. № 5317. P. 1420–1422.
- Ben Amor Y., Shashkina E., Johnson S. *et al.* Immunological characterization of novel secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // *Scand. J. Immunol.* 2005. V. 61. № 2. P. 139–146.
- Boehm R. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007. № 1102. P. 121–134.
- Brennan M.J., Morris S.L., Sizemore C.F. Tuberculosis vaccine development: research, regulatory and clinical strategies // *Expert. Opin. Biol. Technol.* 2004. V. 4. № 9. P. 1493–1504.
- Brosch R., Gordon S.V., Garnier T. *et al.* Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 13. P. 5596–5601.
- Camus J.C., Pryor M., Medigue J.C., Cole S.T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv // *Microbiology*. 2002. V. 148. P. 2967–2973.
- Christensen D., Agger E.M., Andreassen L.V. *et al.* Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): past, present, and future // *J. Liposome Res.* 2009. V. 19. № 1. P. 2–11.
- Christensen D., Lindenstrom T., van de Wijdeven G. *et al.* Syringe free vaccination with CAF01 adjuvanted Ag85B-ESAT-6 in bioneedles provides strong and prolonged protection against tuberculosis // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 11. e15043.
- Clark S.O., Kelly D.L., Badell E. *et al.* Oral delivery of BCG Moreu Rio de Janeiro gives equivalent protection against tuberculosis but with reduced pathology compared to parenteral BCG Danish vaccination // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 43. P. 7109–7116.
- Collins H.L., Kaufmann S.H. Prospects for better tuberculosis vaccines // *Lancet Infect. Dis.* 2001. V. 1. P. 21–28.
- Daniel T.M., Janicki B.W. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry and immunological properties // *Microbiol. Rev.* 1978. V. 42. P. 84–113.
- Davila J., Zhang L., Marrs C.F. *et al.* Assessment of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* *esxA*, *esxH*, and *fbpB* genes among clinical isolates and its implication for the future immunization by new tuberculosis subunit vaccines Ag85B-ESAT-6 and Ag85B-TB10.4 // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. V. 2010. P. 208–371.
- Dorokhov Y.L., Sheveleva A.A., Frolova O.Y. *et al.* Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves // *Tuberculosis*. 2007. V. 87. № 3. P. 218–224.
- Dover L.G., Alderwick L.J., Brown A.K. *et al.* Regulation of cell wall synthesis and growth // *Curr. Mol. Med.* 2007. V. 7. № 3. P. 247–276.
- Elamin A.A., Stehr M., Oehlmann W., Singh M. The mycolyltransferase 85A, a putative drug target of *Mycobacterium tuberculosis*: development of a novel assay and quantification of glycolipid-status of the mycobacterial cell wall // *J. Microbiol. Methods*. 2009. V. 79. № 3. P. 358–363.
- Floss D.M., Mockey M., Zanello G. *et al.* Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. V. 2010. P. 274–346.
- Frutos R., Denise H., Vivares C. *et al.* Pharmaceutical proteins in plants. A strategic genetic engineering approach for the production of tuberculosis antigens // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1149. P. 275–280.
- Gao H., Li K., Yu S., Xiong S. A novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes cast in a natural structure elicits enhanced Th1 immunity compared with BCG // *Microbiol. Immunol.* 2009. V. 53. № 10. P. 541–549.
- Goode R., Parish T. The genetics of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* // *Future Microbiol.* 2008. V. 3. № 3. P. 299–313.
- Haile M., Kallenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2005. V. 18. № 3. P. 211–215.
- Hall L.J., Clare S., Dougan G. Probing local innate immune responses after mucosal immunization // *J. Immune Based. Ther. Vaccines*. 2010. V. 8. P. 5.
- Hall L.J., Clare S., Pickard D. *et al.* Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-ESAT6 fusion protein // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 49. P. 6894–6904.
- Hanekom W.A., Dockrell H.M., Ottenhoff T.H. *et al.* Immunological outcomes of new tuberculosis vaccine trials: WHO panel recommendations // *PLoS Med.* 2008. V. 5. № 7. e145. doi:10.1371/journal.pmed.0050145.
- Hanson M.S., Lapcevich C.V., Haun S.L. Progress on development of the live BCG recombinant vaccine vehicle for combined vaccine delivery // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1995. V. 754. P. 214–221.
- Hefferon K. Biopharmaceuticals in plants: toward the next century of medicine // *CRC Press Taylor and Francis Group 6000 Broken Sound Parkway: N.W.* 2010. 197 p.
- He X.Y., Li J., Hao J. *et al.* Assessment of five antigens from *Mycobacterium tuberculosis* for serodiagnosis of tuberculosis // *Clin. Vaccine Immunol.* 2011.
- Henriksen-Lacey M., Bramwell V.W., Christensen D. *et al.* Liposomes based on dimethyldioctadecylammonium promote a depot effect and enhance immunogenic-

- ity of soluble antigen // *J. Control. Release*. 2010. V. 142. № 2. P. 180–186.
- Henriksen-Lacey M., Christensen D., Bramwell V.W. *et al.* Comparison of the depot effect and immunogenicity of liposomes based on dimethyldioctadecylammonium (DDA), 3beta-[N-(N',N'-Dimethylaminoethane) carbonyl] cholesterol (DC-Chol), and 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP): prolonged liposome retention mediates stronger Th1 responses // *Mol. Pharm.* 2011. V. 8. № 1. P. 153–161.
- Hesseling A.C., Schaaf H.S., Victor T. *et al.* Resistant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin disease: implications for management of Bacillus Calmette-Guerin Disease in human immunodeficiency virus-infected children // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004. V. 23. № 5. P. 476–479.
- Huard R.C., Chitale S., Leung M. *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene *cfp32* encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10 // *Infect. Immun.* 2003. V. 71. № 12. P. 6871–6883.
- Hussain T., Sinha S., Talan S. *et al.* Seroprevalence of HIV infection among paediatric tuberculosis patients in Agra, India: A hospital- based study // *Tuberculosis*. 2007. V. 87. № 1. P. 7–11.
- Jacobs W.R., Jr., Tuckman M., Bloom B.R. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle plasmid // *Nature*. 1987. V. 327. P. 532–535.
- Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H. *et al.* Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 33. P. 1103–1117.
- Kallenius G., Pawlowski A., Brandtzaeg P., Svenson S. Should a new tuberculosis vaccine be administered intranasally? // *Tuberculosis*. 2007. V. 87. № 4. P. 257–266.
- Kamath A.T., Rochat A.F., Christensen D. *et al.* A liposome-based mycobacterial vaccine induces potent adult and neonatal multifunctional T cells through the exquisite targeting of dendritic cells // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 6. e5771.
- Klein D.L. From pertussis to tuberculosis: what can be learned? // *Clin. Infect. Dis.* 2000. Suppl. 3: S302–S308.
- Kumar H., Malhotra D., Goswami S., Bamezai R.N. How far have we reached in tuberculosis vaccine development? // *Crit. Rev. Microbiol.* 2003. V. 29. № 4. P. 297–312.
- Laal S.Y., Skeiky A.W. Immune-based methods // *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus* / Eds S.T. Cole *et al.* 2005. P. 71–83.
- Langermans J.A., Doherty T.M., Vervenne R.A. *et al.* Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6 // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 21. P. 2740–2750.
- Luo Y., Wang B., Hu L. *et al.* Fusion protein Ag85B-MPT64(190-198)-Mtb8.4 has higher immunogenicity than Ag85B with capacity to boost BCG-primed immunity against *Mycobacterium tuberculosis* in mice // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 44. P. 6179–6185.
- Ma J.K.-C., Barros E., Bock, R. *et al.* Molecular farming for new drugs and vaccines // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. № 7. P. 593–599.
- Maes H.H., Causse J.E., Maes R.F. Mycobacterial infections: are the observed enigmas and paradoxes explained by immunosuppression and immunodeficiency? // *Med. Hypotheses*. 1996. V. 46. P. 163–171.
- Martin C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? // *Eur. Respir. J.* 2005. V. 26. № 1. P. 162–167.
- Mason H.S., Warzecha H., Arntzen C.J. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine // *Trends Mol. Med.* 2002. V. 8. № 7. P. 324–329.
- McMurry J., Sbai H., Gennaro M.L. *et al.* Analyzing *Mycobacterium tuberculosis* proteomes for candidate vaccine epitopes // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1/2. P. 95–105.
- McShane H., Pathan A.A., Sander C.R. *et al.* Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1-2. P. 47–52.
- Menkhaus T.J., Bai Y., Zhang C. *et al.* Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants // *Biotechnol. Prog.* 2004. V. 20. № 4. P. 1001–1014.
- Mitsuyama M., Akagawa K., Kobayashi K. *et al.* Up-to-date understanding of tuberculosis immunity // *Kekkaku*. 2003. V. 78. № 1. P. 51–55.
- Mollenkopf H., Dietrich G., Kaufmann S.H. Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination // *Biol. Chem.* 2001. V. 382. № 4. P. 521–532.
- Mustafa A.S. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis // *Mol. Immunol.* 2002. V. 39. № 1/2. P. 113–119.
- Mustafa A.S. Recombinant and synthetic peptides to identify *Mycobacterium tuberculosis* antigens and epitopes of diagnostic and vaccine relevance // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 5/6. P. 367–376.
- Mustafa A.S., Cockle P.J., Shaban F. *et al.* Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle // *Clin. Experim. Immunol.* 2002. V. 130. № 1. P. 37–42.
- Mustafa A.S., Shaban F.A. ProPred analysis and experimental evaluation of promiscuous T-cell epitopes of three major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 2. P. 115–124.

- Nagelkerke N.J.D., De Vlas S.J., Mahendradhata Y. *et al.* The search for a tuberculosis vaccine: An elusive quest? // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 1. P. 41–46.
- Nor N.M., Musa M. Approaches towards the development of a vaccine against tuberculosis: recombinant BCG and DNA vaccine // *Tuberculosis*. 2004. V. 84. № 1/2. P. 102–109.
- Okada M., Shirakawa T. Frontier of mycobacterium research—host vs. mycobacterium // *Kekkaku*. 2005. V. 80. № 9. P. 613–629.
- Okkels L.M., Brock I., Follmann F. *et al.* PPE protein (Rv3873) from DNA segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*: strong recognition of both specific T-Cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family // *Infection and Immunity*. 2003. V. 71. № 11. P. 6116–6123.
- Olsen A.W., Williams A., Okkels L.M. *et al.* Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model // *Infection and Immunity*. 2004. V. 72. № 10. P. 6148–6150.
- Orme I.M. Prospects for new vaccines against tuberculosis // *Trends Microbiol.* 1995. V. 3. P. 401–404.
- Orme I.M. Beyond BCG: the potential for a more effective TB vaccine // *Mol. Med. Today*. 1999. V. 5. P. 487–492.
- Orme I.M. The search for new vaccines against tuberculosis // *J. Leukoc. Biol.* 2001. V. 70. № 1. P. 1–10.
- Orme I.M. Current progress in tuberculosis vaccine development // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 17/18. P. 2105–2108.
- Orme I.M., McMurray D.N., Belisle J.T. Tuberculosis vaccine development: recent progress // *Trends Microbiol.* 2001. V. 9. № 3. P. 115–118.
- Ormerod L.P., Shaw R.J., Mitchell D.M. Tuberculosis in the UK, 1994: current issues and future trends // *Thorax*. 1994. V. 49. № 1. P. 1085–1089.
- Perera P.Y., Derrick S.C., Kolibab K. *et al.* A multivalent vaccinia virus-based tuberculosis vaccine molecularly adjuvanted with interleukin-15 induces robust immune responses in mice // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 15. P. 2121–2127.
- Reed S.G., Alderson M.R., Dalemans W. *et al.* Prospects for a better vaccine against tuberculosis // *Tuberculosis*. 2003. V. 83. № 1/3. P. 213–219.
- Reljic R., Williams A., Ivanyi J. Mucosal immunotherapy of tuberculosis: Is there a value in passive IgA? // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 3/4. P. 179–190.
- Rigano M.M., Alvarez M.L., Pinkhasov J. *et al.* Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Rep.* 2004. V. 22. P. 502–508.
- Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.P. *et al.* Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // *Vaccine*. 2006. V. 24. № 5. P. 691–695.
- Ronning D.R., Klabunde T., Besra G.S. *et al.* Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines // *Nat. Struct. Biol.* 2000. V. 7. № 2. P. 141–146.
- Rowland S.S., Mayner R.L., Barker L. Advancing TB vaccines to Phase I clinical trials in the US: Regulatory/manufacturing/licensing issues // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1/2. P. 39–46.
- Rybicki E.P. Plant-produced vaccines: promise and reality // *Drug. Discovery Today*. 2008. V. 13. P. 894–901.
- Sada E., Ferguson L.E., Daniel T.M. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Dis.* 1990. V. 162. P. 928–931.
- Salyaev R.K., Rigano M.M., Rekoslavskaya N.I. Development of plant-based mucosal vaccines against widespread infectious diseases // *Expert. Rev. Vaccines*. 2010. V. 9. № 8. P. 937–946.
- Schelkunov S.N., Salyaev R.K., Pozdnyakov S.G. *et al.* Immunogenicity of a novel, bivalent, plantbased oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses // *Biotechnol. Lett.* 2006. V. 28. № 13. P. 959–967.
- Sharma A.K., Khuller G.K. Recombinant mycobacterial proteins future directions to improve protective efficacy // *Indian. J. Exp. Biol.* 2001. V. 39. № 12. P. 1214–1219.
- Shen H., Wang C., Yang E. *et al.* Novel recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and mouse TNF-alpha induces significantly enhanced cellular immune and antibody responses in C57BL/6 mice // *Microbiol. Immunol.* 2010. V. 54. № 8. P. 435–441.
- Shi C., Chen L., Chen Z. *et al.* Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant BCG over-expressing HspX protein // *Vaccine*. 2010a. V. 28. № 32. P. 5237–5244.
- Shi S., Yu L., Sun D. *et al.* Rational design of multiple TB antigens TB10.4 and TB10.4-Ag85B as subunit vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis* // *Pharm. Res.* 2010b. V. 27. № 2. P. 224–234.
- Sierra V.G. Is a new tuberculosis vaccine necessary and feasible? A Cuban opinion // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 3/4. P. 169–178.
- Skeiky Y.A., Lodes M.J., Guderian J.A. *et al.* Cloning, expression, and immunological evaluation of two putative secreted serine protease antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 8. P. 3998–4007.
- Skeiky Y.A.W., Alderson M.R., Mark R. *et al.* Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein // *J. Immunol.* 2004. V. 172. P. 7618–7628.

- Skjot R.L.V., Oettinger T., Rosenkrands I. *et al.* Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-Cell antigens // *Infection and Immunity*. 2000. V. 68. № 1. P. 214–220.
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence // *Clin. Microbiol. Rev.* 2003. V. 16. № 3. P. 463–496.
- Sourrouille C., Marshall B., Lienard D., Faye L. From neanderthal to nanobiotech: from plant potions to pharming with plant factories // *Methods in Molecular Biology: Recombinant Proteins From Plants* / Ed. Faye L. Gomord V. Humana Press (a part of Springer Science+Business Media). 2009. P. 1–23.
- Surekha R.H., Vijaya Lakshmi V., Sumanlatha G., Murthy K.J.R. Cell-mediated immune responses in children towards secreted proteins of *Mycobacterium bovis* BCG // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1/2. P. 89–93.
- Tecson Mendoza E.M., Laurena A.C., Botella J.R. Recent advances in the development of transgenic papaya technology // *Biotechnol. Annu. Rev.* 2008. V. 14. P. 423–462.
- van Dissel J.T., Arend S.M., Prins C. *et al.* Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naive human volunteers // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 20. P. 3571–3581.
- van Dissel J.T., Soonowala D., Joosten S.A. *et al.* Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31((R)) promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection // *Vaccine*. 2011.
- Vogel F.R. Improving vaccine performance with adjuvants // *Clin. Infect Dis.* 2000. V. 30. Suppl. 3. P. S266–S270.
- Wang Q.L., Pan Q., Ma Y. *et al.* An attenuated Salmonella-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 48. P. 6712–6722.
- Wiker H.G., Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. № 4. P. 648–661.
- Williams A., Hatch G.J., Clark S.O. *et al.* Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1/2. P. 29–38.
- Xing Z. The hunt for new tuberculosis vaccines: anti-TB immunity and rational design of vaccines // *Curr. Pharm. Des.* 2001. V. 7. № 11. P. 1015–1037.
- Xing Z., Lichty B.D. Use of recombinant virus-vectored tuberculosis vaccines for respiratory mucosal immunization // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 3/4. P. 211–217.
- Xu Y., Liu W., Shen H. *et al.* Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the chimeric protein of antigen 85B and ESAT-6 enhances the Th1 cell-mediated response // *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. V. 16. № 8. P. 1121–1126.
- Xu Y., Liu W., Shen H. *et al.* Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing chimaeric protein of Ag85B and ESAT-6 enhances immunostimulatory activity of human macrophages // *Microbes Infect.* 2010. V. 12. № 8/9. P. 683–689.
- Young D.B. Current tuberculosis vaccine development // *Clin. Infect. Dis.* 2000. V. 30. Suppl. 3. S254–S256.
- Young D.B., Stewart G.R. Tuberculosis vaccines // *Br. Med. Bull.* 2002. V. 62. P. 73–86.
- Yusibov V., Rabindran S. Recent progress in the development of plant-derived vaccines // *Expert Rev. Vaccines*. 2008. V. 7. P. 1173–1183.
- Zelada A.M., Calamante G., de la Paz Santangelo M. *et al.* Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 3/4. P. 263–267.
- Zhou H., Chen X., Ji Y. *et al.* Construction of recombinant adenovirus expressing Ag85B of *Mycobacterium bovis* and its cellular immunoproperties in mice // *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2010. V. 50. № 6. P. 811–816.

PROSPECTS FOR DESIGNING A NEW GENERATION OF ANTI-TUBERCULOSIS VACCINES

S.I. Tat'kov¹, E.V. Deineko¹, D.P. Furman^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: tatkov@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Recent progress in designing new vaccines against tuberculosis is concisely reviewed. Data on administration of various secreted *M. tuberculosis* antigens as components of subunit vaccines are considered. The need in constructing artificial antigens comprising several *M. tuberculosis* antigens (epitopes) is illustrated by particular examples. The prospect of developing an «edible» vaccine against tuberculosis involving transgenic plants is discussed.

Key words: tuberculosis, vaccine, antigen, subunit vaccine, transgenic plant, epitope, edible vaccine.