

## РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Солдатенкова А.В., Кудряшова А.М., Гаврилова Н.Ф.,  
Яковлева И.В., Борисова О.В., Свиридов В.В., Михайлова Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Резюме.** Гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI, содержащий в своем составе аминокислотные последовательности трех наиболее значимых антигенов *P. aeruginosa* (мембранных белков OprF, OprI и анатоксина aTox), был включен в состав вакцины против синегнойной инфекции. Контроль качества гибридного рекомбинантного белка и вакцины на его основе предполагает определение его подлинности и полноты сорбции препарата на гидроксиде алюминия.

Цель исследования – разработка иммуноферментного метода контроля качества вакцинного препарата на основе гибридного рекомбинантного белка *P. aeruginosa*.

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, специфичные к слитому рекомбинантному белку, были получены путем слияния злокачественной линии миеломы мыши и иммунных спленоцитов мышей, вакцинированных отдельными рекомбинантными белками синегнойной палочки. Для наработки антител в препаративных количествах гибридные клетки культивировали *in vivo* в мышцах линии BALB/c. Супернатанты клеточных культур и асцитные жидкости хроматографически очищали на иммунном сорбенте. Конъюгирование антител с пероксидазой хрена проводили согласно методу Nakane P.K. Гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI выявляли в твердофазном иммуноферментном анализе с использованием полученной панели моноклональных антител и конъюгатов моноклональных антител с пероксидазой корня хрена, специфичных к различным эпитопам белка. В качестве калибровочных стандартов для построения калибровочного графика использовали разведения, содержащие от 78 нг/мл до 5000 нг/мл рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI.

Для детекции OprF-aTox-OprI апробированы 55 вариантов пар моноклональных антител, в 11 случаях показана способность выявлять рекомбинантный белок. Критерием отбора наиболее чувствительных и специфичных вариантов ИФА служил предел количественного обнаружения. Для всех 11 вариантов теста посчитан предел количественного обнаружения. В результате проведенных исследований были выбраны два варианта иммуноферментного анализа для контроля качества гибридного рекомбинантного белка, обладающие наибольшей чувствительностью. Первый вариант включал в себя пару моноклональных антител, специфичных к эпитопам OprF и OprI, второй вариант – к эпитопам aTox и OprI. Пределы количественного обнаружения составили 2,9 и 13,6 нг/мл (0,0058 и 0,027% от предполагаемого содержания антигена в вакцине) для первого и второго вариантов ИФА.

Отработаны два варианта ИФА для выявления гибридного рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI. Первый вариант позволяет определить количество белка и оценить полноту его сорбции на геле гидроокиси алюминия. Для подтверждения подлинности белка целесообразно применять оба метода, поскольку они позволяют доказать наличие всех трех антигенов (OprF, aTox и OprI), присутствующих в слитом белке.

**Ключевые слова:** вакцина, *Pseudomonas aeruginosa*, гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI, иммуноферментный анализ

### Адрес для переписки:

Солдатенкова Алена Владимировна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин  
и сывороток имени И.И. Мечникова»  
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.  
Тел.: 8 (495) 916-25-87.  
E-mail: Sol.alena.v@yandex.ru

### Address for correspondence:

Soldatenkova Alena V.  
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera  
105064, Russian Federation, Moscow,  
Malyy Kazenny lane, 5a.  
Phone: 7 (495) 916-25-87.  
E-mail: Sol.alena.v@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.В. Солдатенкова, А.М. Кудряшова, Н.Ф. Гаврилова,  
И.В. Яковлева, О.В. Борисова, В.В. Свиридов,  
Н.А. Михайлова «Разработка иммуноферментного  
метода контроля качества вакцины на основе  
гибридного рекомбинантного белка *Pseudomonas  
aeruginosa*» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22,  
№ 4. С. 805-810. doi: 10.15789/1563-0625-DOE-1906  
© Солдатенкова А.В. и соавт., 2020

### For citation:

A.V. Soldatenkova, A.M. Kudryashova, N.F. Gavrilova,  
I.V. Yakovleva, O.V. Borisova, V.V. Sviridov, N.A. Mikhailova  
“Development of ELISA test for the quality control of  
*Pseudomonas aeruginosa* recombinant vaccine based on  
the hybrid recombinant protein”, *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 4,  
pp. 805-810. doi: 10.15789/1563-0625-DOE-1906  
DOI: 10.15789/1563-0625-DOE-1906

## DEVELOPMENT OF ELISA TEST FOR THE QUALITY CONTROL OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RECOMBINANT VACCINE BASED ON THE HYBRID RECOMBINANT PROTEIN

Soldatenkova A.V., Kudryashova A.M., Gavrilova N.F., Yakovleva I.V., Borisova O.V., Sviridov V.V., Mikhailova N.A.

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** A hybrid recombinant protein containing the amino acid sequences of the three most significant *Pseudomonas aeruginosa* antigens (membrane proteins OprF, OprI and toxoid aTox) was incorporated into a vaccine against *Pseudomonas* infection. Quality control of a hybrid recombinant protein and appropriate vaccine includes determination of authenticity and completeness of adsorption upon aluminum hydroxide adjuvant. The aim of our study was to develop techniques of quality control for a vaccine based on the hybrid OprF-aTox-OprI recombinant protein specific to *P. aeruginosa*. Hybridomas secreting specific monoclonal antibodies for OprF-aTox-OprI were derived from the fusion of myeloma cells and murine spleen cells immunized with recombinant proteins *P. aeruginosa*. To produce sufficient quantities of antibodies, the hybrid cells were *in vivo* cultured in BALB/c mice. Supernates and ascite liquids were chromatographically purified with immune sorbent. Conjugation of antibodies with horseradish peroxidase was carried out according to P.K.Nakane. The hybrid OprF-aTox-OprI recombinant protein was detected by the solid-phase ELISA, using a panel of monoclonal antibodies and conjugates of monoclonal antibodies with horseradish peroxidase. Monoclonal antibodies were specific for different OprF-aTox-OprI epitopes. Titration assays containing OprF-aTox-OprI protein at 78 ng/ml to 5000 ng/ml were used as quantitative standards for calibration curves.

To identify the recombinant protein OprF-aTox-OprI, 55 variants of of MAb pairs were tested. Limits of quantitative detection served for selection of most sensitive and specific ELISA variants. The quantitative detection limit was calculated for all 11 ELISA variants. Two ELISA variants with the highest sensitivity were selected for quality control of the hybrid recombinant protein. The limits of quantitative detection were, respectively, 2.9 and 13.6 ng/ml (0.0058 and 0.027% of the estimated antigen content in the vaccine) for the first and second ELISA variants. The first variant included a pair of monoclonal antibodies specific for the OprF and OprI epitopes, the second variant represented aTox and OprI epitopes. Two variants of ELISA were developed to detect the hybrid recombinant OprF-aTox-OprI protein. The first variant allows to determine the protein amount and to evaluate completeness of its adsorption on aluminum hydroxide. To confirm authenticity of the protein, both methods must be used, since they can detect all three antigens (OprF, aTox and OprI) which are present in the fusion protein.

**Keywords:** vaccine, *P. aeruginosa*, hybrid recombinant protein, OprF-aTox-OprI, enzyme-linked immunoassay

### Введение

Устойчивость *P. aeruginosa* к лекарственным препаратам снижает эффективность профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, вызываемых синегнойной палочкой, а также приводит к увеличению их тяжести и длительности течения [3]. Поэтому по всему миру проводятся исследования по созданию вакцины на основе протективных антигенов *P. aeruginosa*, предназначенной для профилактики синегнойных инфекций [1, 7, 8, 9].

В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова в течение ряда лет проводились исследования по разработке вакцины на основе рекомбинантных белков синегнойной палочки, обладающих протективной активностью: мембранных белков OprF и OprI, анатоксина с делецией 106 аминокислотных остатков С-концевого участка [2] и слитого рекомбинантного варианта на основе аминокислотных последовательностей вышеуказанных белков.

Рекомбинантные белки *P. aeruginosa* вошли в состав вакцины в виде комплекса OprF и анатоксина [4], сорбированных на гидроокиси алюминия. Для оценки качества такого варианта препарата получена панель моноклональных антител, которые использованы для создания методов его контроля в ИФА [6].

Вторым направлением работы являлось создание вакцины на основе гибридного рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI, включающего аминокислотные последовательности анатоксина и двух мембранных белков (OprF и OprI) *P. aeruginosa* [5].

**Цель настоящего исследования** — разработка иммуноферментного метода контроля качества вакцинного препарата на основе слитого рекомбинантного белка.

### Материалы и методы

В работе использованы: рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI; МкАт, специфичные к отдельным рекомбинантным белкам: OprF (№ 1, 5,

6, 7, 8), анатоксину (№ 28) и OprI (№ 1, 2) в качестве иммобилизованных; конъюгаты МкАт с пероксидазой хрена, специфичные к OprF (КГ № 1, 5, 6, 7, 8), анатоксину (КГ № 21, 19), OprI (КГ № 1, 2) в качестве детектирующих антител.

Реактивы: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, компоненты буферных растворов (Sigma, Fluka, Helicon). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты (Corning, США, кат. № 2593).

Оборудование: планшетный спектрофотометр Bio-Rad Model 680 (Bio-Rad, Германия); термостатируемый шейкер-встряхиватель ELM1 SkyLine (ELMI, Латвия); вошер Bio-Rad PW 40 (Bio-Rad, Германия); весы OHAUS Discovery (OHAUS, США); pH-метр Mettler Toledo MP 220 (Sigma-Aldrich, США).

Для получения гибридом мышей линии BALB/c иммунизировали соответствующими рекомбинантными белками. Слияние иммунных спленоцитов и злокачественной линии миеломы мыши P3-X63-Ag8.653 проводили в соответствии с общепринятым протоколом при помощи ПЭГ 1450 (Sigma). Продуцирующие антитела гибридомы отбирали на основании результатов иммуноферментного анализа. Клонирование проводили методом предельных разведений в ранние сроки. Все гибридные культуры-продуценты антител криоконсервировали в жидком азоте.

Для наработки антител в препаративных количествах гибридные клетки культивировали *in vivo* в мышцах линии BALB/c. Предварительно, за 10-14 дней до прививки гибридом, животным внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл пристана (Sigma). Инокулировали клетки в дозе  $3-5 \times 10^6$  на животное.

Супернатанты клеточных культур и асцитные жидкости хроматографически очищали на иммунном сорбенте. Конъюгирование антител с пероксидазой хрена проводили согласно методу Nakane P.K.

Для приготовления иммуносорбента в 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл моноклональных антител к анатоксину, OprF или OprI в концентрации 10 мкг/мл в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2 и выдерживали в течение 19-22 ч при температуре  $5 \pm 3$  °С. После инкубации планшеты промывали один раз деионизированной водой, далее на 1 час при комнатной температуре вносили блокирующий раствор, представляющий собой 0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20. После удаления блокирующего раствора планшеты высушивали в ламинарном потоке в течение 2 часов, запаивали в полиэтиленовые пакеты и хранили при температуре  $5 \pm 3$  °С до использования.

Для проведения анализа в планшет с иммобилизованными моноклональными антителами вносили по 100 мкл калибраторов, содержащих рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI (5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78, 0 нг/мл) и выдерживали при температуре  $37 \pm 2$  °С и постоянном встряхивании со скоростью вращения 500 об/мин в течение  $45 \pm 2$  мин. Затем планшеты отмывали пятикратно и в лунки вносили по 100 мкл конъюгата МкАт с пероксидазой моноклональных антител к анатоксину, OprF или OprI и выдерживали  $30 \pm 2$  мин в тех же условиях и осуществляли промывку планшетов.

Затем в лунки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01 % перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Строили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI.

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности. Чувствительность оценивали путем определения предела обнаружения (ПО) и предела количественного обнаружения (ПКО).

#### Статистическая обработка результатов

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2013.

## Результаты и обсуждение

Для количественного определения рекомбинантного слитого белка OprF-aTox-OprI исследовано 55 комбинаций антител для захвата и детекции, специфичных к эпитопам, находящимся на разных участках слитого белка.

Критерием отбора наиболее чувствительных и специфичных вариантов служил предел количественного обнаружения (ПКО), который определяли по калибровочному графику зависимости оптической плотности от концентрации рекомбинантного слитого белка OprF-aTox-OprI. ПКО представлял собой концентрацию препарата, соответствующую пороговому значению оптической плотности, определяемому по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{порог}} = \text{ОП}_{\text{ср.К}} + 10\sigma,$$
где  $\text{ОП}_{\text{ср.К}}$  – среднее арифметическое значение ОП нулевой пробы,  $\sigma$  – среднее квадратическое отклонение ОП нулевой пробы (8 повторов).

Рабочие разведения концентраций антител для иммобилизации в лунках планшета и конъюгатов антител с пероксидазой устанавливали в предварительных экспериментах. Результаты определения ПКО для вариантов сэндвич-ме-

тогда со значениями ПКО, не превышающими 100 нг/мл, представлены в таблице 1.

Для дальнейшей работы были выбраны два варианта ИФА, обладающие достаточной чувствительностью и включающие антитела, специфичные ко всем трем участкам слитого белка:

МкАт № 5 к OprF – МкАт № 2 к OprI, конъюгированные с пероксидазой;

МкАт № 28 к анатоксину – МкАт № 2 к OprI, конъюгированные с пероксидазой.

На рисунках 1 и 2 представлены калибровочные графики зависимости оптической плотности от концентрации белка OprF-aTox-OprI при использовании вышеперечисленных пар МкАт. Для обоих вариантов установлены диапазоны концентраций калибровочных образцов, проведена оценка приемлемости аппроксимации и воспроизводимости.

Построенные графики определяют диапазон концентраций калибровочных образцов, которые могут использоваться для количественного определения рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI. Минимальный калибратор должен содержать искомым белок в концентрации не ниже предела количественного обнаружения (ПКО). Концентрация максимального калибратора определяется техническими характеристиками прибора; обычно оптическая плотность, регистрируемая для максимального калибратора, не должна превышать 2,0 о.е. Этим условиям соответствовали диапазоны концентраций 2,9-2500 нг/мл и 13,6-5000 нг/мл для 1-го и 2-го варианта соответственно.

Приемлемость аппроксимации проверяли обратным пересчетом концентраций калибровочных образцов с применением выбранной функции, с учетом требований, что не менее 75% рассчитанных значений концентраций калибровочных образцов может отклоняться от номинальных значений не более чем на 20%, а концентрация калибратора, соответствующего пределу количественного обнаружения, – не более чем на 25%. Полиномиальная аппроксимация удовлетворяла перечисленным условиям, и результаты ОП в выбранном диапазоне концентраций анти-

гена подлежали количественной интерпретации. Коэффициент вариации, рассчитанный по ОП в четырех повторах для каждой концентрации антигена, не превышал 8%.

Контроль качества гибридного рекомбинантного белка и вакцины на его основе предполагает определение подлинности и полноты сорбции препарата.

Разрабатываемый метод количественного определения рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI базируется на методе твердофазного ИФА в сэндвич-варианте, при котором на внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы моноклональные антитела к анатоксину, OprF или OprI. На первой стадии анализа в лунках с иммуносорбентом происходит образование иммунных комплексов «антитело/антиген». На второй стадии анализа, после отмывки, образовавшиеся иммунные комплексы взаимодействуют с моноклональными антителами мыши к анатоксину, OprF или OprI, конъюгированными с пероксидазой хрена.

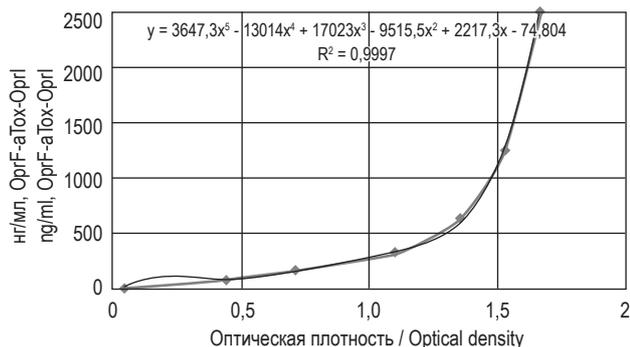
При конструировании сэндвич-метода для выявления слитого рекомбинантного антигена использованы антитела к разным эпитопам. В настоящем исследовании апробированы 55 вариантов пар антител. Поскольку рекомбинантный слитый белок представляет собой аминокислотную последовательность трех разных антигенов *P. aeruginosa*, исследовали пары антител, специфичные к эпитопам, находящимся на разных участках слитого белка. Для количественного определения рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI были выбраны два варианта ИФА, обладающие наибольшей чувствительностью и включающие антитела, специфичные ко всем трем участкам слитого белка: анатоксину, OprF и OprI.

Поскольку в процессе синтеза не исключена деградация полипептидной цепи, наиболее перспективными вариантами выявления полноразмерного белка можно считать тесты, в которых в качестве пары используются моноклональные антитела к эпитопам, находящимся на N- и C-концах полипептидной цепи, а именно специ-

ТАБЛИЦА 1. ПРЕДЕЛЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ТЕСТОВ

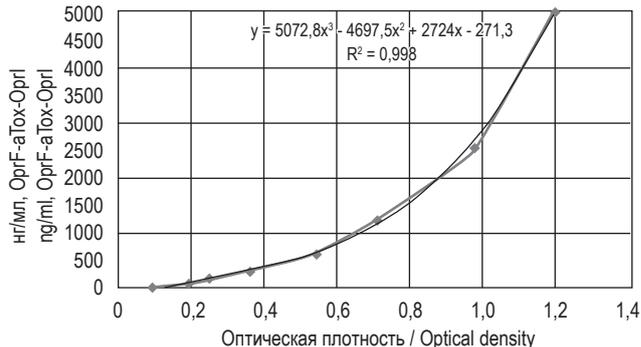
TABLE 1. QUANTIFICATION LIMITS FOR VARIOUS ELISAs

МкАт на подложке Absorbad Mab	КГ Conjugated Mab						
	№ 1-ПХ OprI, нг/мл No. 1-HRP OprI, ng/ml	№ 2-ПХ OprI, нг/мл No. 2-HRP OprI, ng/ml	№ 1-ПХ OprF, нг/мл No. 1-HRP OprF, ng/ml	№ 5-ПХ OprF, нг/мл No. 5-HRP OprF, ng/ml	№ 6-ПХ OprF, нг/мл No. 6-HRP OprF, ng/ml	№ 7-ПХ OprF, нг/мл No. 7-HRP OprF, ng/ml	№ 8-ПХ OprF, нг/мл No. 8-HRP OprF, ng/ml
№ 5 OprF	3,7	2,9	–	–	–	–	–
№ 7 OprF	74,9	16,3	–	–	–	–	–
№ 28 анатоксин No. 28 toxoid	33,7	13,6	19,9	88,8	78,7	17,6	74,2



**Рисунок 1.** Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации OprF-aTox-OprI (нг/мл) с использованием пары МкАт № 5 к OprF – МкАт № 2 к OprI, конъюгированных с пероксидазой хрена

Figure 1. Standard curve of the dependence of optical density on the concentration of OprF-aTox-OprI (ng/ml). ELISA with using a pair of Mab No. 5 specific to OprF and Mab No. 2 specific to OprI conjugated to horseradish peroxidase



**Рисунок 2.** Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации OprF-aTox-OprI (нг/мл) в тесте с использованием пары МкАт № 28 к анатоксину – МкАт № 2 к OprI, конъюгированных с пероксидазой хрена

Figure 2. Standard curve of the dependence of optical density on the concentration of OprF-aTox-OprI (ng/ml). ELISA with using a pair of Mab No. 28 specific to toxoid and Mab No. 2 specific to OprI conjugated to horseradish peroxidase

фичным к аминокислотным последовательностям белков OprF и OprI. Вариант теста с использованием в качестве иммобилизованных антител МкАт № 5, специфичных к OprF, и конъюгата МкАт № 2-ПХ, специфичного к OprI, удовлетворял требуемым условиям и обладал достаточной чувствительностью: ПКО составил 2,9 нг/мл (0,0058% от предполагаемого содержания антигена в вакцине).

Такой тест может быть использован для количественного определения рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI, а также оценки полноты сорбции вакцины на его основе.

С другой стороны, для контроля подлинности вакцинного препарата, состоящего из слитого рекомбинантного белка, требуется подтверждение наличия эпитопов всех трех антигенов, вхо-

дящих в его состав. С этой целью дополнительно отработан второй вариант теста с использованием МкАт № 28, специфичного к анатоксину, и конъюгата МкАт № 2-ПХ, специфичного к OprI (ПКО составил 13,6 нг/мл – 0,027% от предполагаемого содержания антигена в вакцине).

Таким образом, в результате проведенных исследований разработаны два метода ИФА для контроля качества рекомбинантного слитого белка OprF-aTox-OprI. Первый вариант позволяет определить количество белка и оценить полноту его сорбции на геле гидроокиси алюминия. Для подтверждения подлинности белка целесообразно применять оба метода, поскольку они позволяют доказать наличие всех трех антигенов, присутствующих в слитом белке.

## Список литературы / References

1. Благовидов Д.А., Костинов М.П., Симонова О.И., Шмитко А.Д., Буркина Н.И., Шахназарян М.К. Переносимость вакцины против *P. aeruginosa* у детей с муковисцидозом и врожденными пороками развития легких // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2016. Т. 15, № 2 (87), С. 55-66. [Blagovidov D.A., Kostinov M.P., Simonova O.I., Shmitko A.D., Burkina N.I., Shahnazaryan M.K. The tolerability of the vaccine against *P. aeruginosa* in children with cystic fibrosis and congenital lung development. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, Vol. 15, no. 2 (87), pp. 55-66. (In Russ.)]
2. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* // Вестник Российской академии медицинских наук, 2016, Т. 71, № 1. С. 5-10. [Kaloshin A.A., Leonova E.I., Soldatenkova A.V. Assessment of protective properties of the recombinant complex of the outer membrane protein F and the toxoid of *Pseudomonas aeruginosa*. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2016, Vol. 71, no. 1, pp. 5-10. (In Russ.)]
3. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2015. Т. 17, № 3. С. 170-186. [Lazareva A.V., Tchebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Tchebotar V.I., Mayanskiy N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 170-186. (In Russ.)]

4. Михайлова Н.А., Зими́на Е.М., Солдатенкова А.В., Калошин А.А. Разработка вакцины на основе рекомбинантных антигенов синегнойной палочки // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. № 1. С. 74-80. [Mikhailova N.A., Zimina E.M., Soldatenkova A.V., Kaloshin A.A. Development of the vaccine based on the recombinant antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 1, pp. 74-80. (In Russ.)]

5. Патент РФ № 2677790 С1, 2017.09.22. – Калошин А.А., Зими́на Е.М., Михайлова Н.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК рРА-OPRF-АТОХ-OPRI, кодирующая синтез гибридного рекомбинантного белка, включающего аминокислотные последовательности белков F и I наружной мембраны и атоксического варианта экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*, штамм *Escherichia coli* PA-OPRF-АТОХ-OPRI – продуцент гибридного рекомбинантного белка, и способ получения указанного белка. [RU patent No. 2677790 C1, 2017.09.22 – Kaloshin A.A., Zimina E.M., Mikhailova N.A. Recombinant plasmid DNA pPA-OPRF-ATOX-OPRI, encoding the synthesis of a hybrid recombinant protein, including the amino acid sequences of the outer membrane F and I proteins and the atoxic variant of exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* strain PA-OPRF-ATOX-OPRI – producer recombinant protein recombinant and method for producing said protein].

6. Солдатенкова А.В., Зими́на Е.М., Кудряшова А.М., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Борисова О.В., Свиридов В.В., Михайлова Н.А. Разработка иммуноферментных методов оценки контроля качества рекомбинантной вакцины синегнойной // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. № 1. С. 95-100. [Soldatenkova A.V., Zimina E.M., Kudryashova A.M., Gavrilo N.F., Yakovleva I.V., O.V. Borisova, V.V. Sviridov, N.A. Mikhailova. Development of ELISAs for the quality control of a recombinant pseudomonas vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 1, pp. 95-100. (In Russ.)]

7. Doring G., Meisner C., Stern M. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 26, pp. 11020-11025.

8. Farajnia S., Peerayeh S.N., Tanomand A., Majidi J., Goudarzi G., Naghili B., Rahbarnia L. Protective efficacy of recombinant exotoxin A – flagellin fusion protein against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Can. J. Microbiol.*, 2015, Vol. 61, no. 1, pp. 60-64.

9. Zuercher A.W., Imboden M.A., Jampen S., Bosse D., Ulrich M., Chtioui H., Lauterburg B.H., Lang A.B. Cellular immunity in healthy volunteers treated with an octavalent conjugate *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 143, no. 1, pp. 132-138.

**Авторы:**

**Солдатенкова А.В.** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Кудряшова А.М.** – научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Гаврилова Н.Ф.** – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Яковлева И.В.** – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Борисова О.В.** – к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Свиридов В.В.** – к.м.н., заведующий лабораторией клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Михайлова Н.А.** – д.м.н., профессор, заведующая лабораторией протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Authors:**

**Soldatenkova A.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Kudryashova A.M.**, Research Associate, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Gavrilo N.F.**, PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Yakovleva I.V.**, PhD (Biology), Leading Senior Research Associate, Laboratory of Cell Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Borisova O.V.**, PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Sviridov V.V.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Cell Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Mikhailova N.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.12.2019

Отправлена на доработку 29.01.2020

Принята к печати 11.03.2020

Received 03.12.2019

Revision received 29.01.2020

Accepted 11.03.2020