

На правах рукописи

КАЛЮКИНА АРИНА СЕРГЕЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА
HSP70 ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ МИКОБАКТЕРИИ В ПРОФИЛАКТИКЕ
ТУБЕРКУЛЕЗА.**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА

2007

Работа выполнена на кафедре биологической химии Московской Медицинской Академии им. И.М. Сеченова и во Всероссийском Научном Центре молекулярной диагностики и лечения.

Научные руководители: доктор химических наук, профессор
Северин Евгений Сергеевич

кандидат биологических наук

Федоров Алексей Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Соколов Николай Николаевич

кандидат биологических наук

Савватеева Мария Владимировна

Ведущая организация

Центральный Научно-исследовательский
Институт Туберкулеза РАМН

Защита состоится « 29 » марта 2007г. в 12³⁰ часов на заседании Диссертационного Совета Д 001.010.01 при ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, Погодинская ул., д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, Погодинская ул., д.10.

Автореферат разослан « 26 » февраля 2007 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

В.С. Былинкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальность проблемы.

Туберкулез – болезнь, являющаяся одной из самых актуальных проблем мирового здравоохранения, ежегодно уносит жизни более 1 млн. человек [Dye C. et. al., 2005]. В нашей стране туберкулез продолжает оставаться одной из наиболее распространенных инфекций и представляет огромную опасность для здоровья населения. В последние годы туберкулез стал характеризоваться высокой тенденцией к прогрессированию, быстрым развитием каверн, полирезистентностью возбудителя болезни к противотуберкулезным лекарствам [Попович В.К., 2005; Соловьева И.П., 1998].

Следовательно, одной из важнейших задач, стоящих перед современной медициной, является разработка новых методов предупреждения заболевания туберкулезом.

За последние годы был сделан ряд значительных открытий в области изучения патогенеза заболевания, особенностей его возбудителя. В частности одним из значимых достижений науки последних двух десятилетий явилось открытие и изучение функций белков теплового шока. Данные несколько групп белков присутствуют в клетках любого организма и являются необходимыми в целом ряде процессов. Так, эти белки исполняют роль молекулярных шаперонов (т.е. являются белками – дуэньями), которые необходимы для приобретения биологически активных конформаций вновь синтезированными белками. У позвоночных белки теплового шока выполняют важные роли в иммунной системе, связываясь с антигенами патогенных микроорганизмов и антигенами, специфическими для злокачественных опухолей [Pierce S.K., 1994]. Клетки иммунной системы имеют рецепторы к белкам теплового шока, в результате чего эти комплексы вызывают сильный иммунный ответ [Wang Y. et al., 2001]. Кроме этого, сами по себе, белки теплового шока патогенных микроорганизмов являются одними из наиболее сильных антигенов [Heikema A. et al., 1997; Zigel U. et al., 2001]. Одним из наиболее перспективных направлений создания новых генно-инженерных вакцин является использование белков теплового шока либо как иммуногенов, либо носителей белков-иммуногенов.

Основным средством профилактики туберкулеза является вакцина БЦЖ – живые микобактерии штамма *M. bovis* БЦЖ (бацилла Calmett-Guerren), лиофильно высушенные в 1,5% растворе глутамата натрия. Вакцина вызывает Т-клеточный иммунный ответ. Принцип защитного действия прививки против туберкулеза заключается в ограничении распространения возбудителя из места первичной инфекции гематогенным путем, что снижает риск развития заболевания и реактивации процесса. Вакцина БЦЖ обеспечивает защиту от форм первичного туберкулеза, она наиболее эффективна при введении до момента инфицирования. Эффективность защитного действия вакцины БЦЖ значительно варьирует, от высоких процентов предупреждения развития туберкулеза у детей (92-100%) [Митинская Л.А., 2001], у взрослого населения она не подтверждается (0 - 80%) [Grange J.M., 2000]. Определенную проблему при применении вакцины БЦЖ составляет, во-первых, гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), индуцируемая вакцинацией, которую сложно отличить от ГЗТ, вызванной *M. tuberculosis* и, следовательно, использование туберкулина (комплекса белков туберкулезной микобактерии) в кожных тестах для диагностических и эпидемиологических целей, влечет за собой сложности, связанные с дифференциальной диагностикой собственно туберкулезной инфекции и поствакцинальной аллергии [Lowrie, D.V. et al., 1995]. Во-вторых, поскольку БЦЖ является живой вакциной, ее применение противопоказано при иммунодефицитных состояниях (в т.ч. ВИЧ-инфекции), так как возможно развитие туберкулеза [Mustafa A.S., 2001].

Основные направления поиска новой противотуберкулезной вакцины лежат в сфере создания субъединичных вакцин в сочетании с разрешенными для применения у человека адьювантами. Субъединичными называют вакцины, которые содержат только отдельные компоненты патогенного микроорганизма – рекомбинантные белки или синтетические пептиды, содержащие основные эпитопы антигенов, активно распознаваемые иммунной системой хозяина. Достоинства субъединичных вакцин заключаются в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызвать нежелательные эффекты в организме-хозяине. В качестве основного компонента для прототипа противотуберкулезной вакцины был выбран белок теплового шока

M. tuberculosis, принадлежащий к семейству HSP70 (heat shock protein, молекулярная масса 70 кД).

Исходя из этого, **целью данного исследования** является изучение возможности применения рекомбинантного белка *Mycobacterium tuberculosis* HSP70 для профилактики туберкулеза в качестве компонента прототипа противотуберкулезной вакцины.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие **задачи**:

- разработка методов получения рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70;
- получение рекомбинантного белка HSP70 в форме, пригодной для проведения доклинических исследований (чистота, отсутствие деградации, минимальное содержание эндотоксинов);
- изучение физико-химических свойств рекомбинантного белка HSP70, важных для последующей конъюгации с адьювантом;
- изучение влияния рекомбинантного белка HSP70 на иммунный ответ на мышах;
- повышение антигенных свойств рекомбинантного белка HSP70 за счет конъюгации с полиоксидонием;
- изучение влияния рекомбинантного белка HSP70 и его конъюгата с полиоксидонием на гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ.

Научная новизна работы.

Получен рекомбинантный белок туберкулезной микобактерии HSP70 в форме, позволяющей осуществить дальнейшие доклинические исследования. Изучены его физико-химические свойства, важные для конъюгации с адьювантом. Охарактеризована способность рекомбинантного белка туберкулезной микобактерии HSP70 к стимулирующему влиянию на Т-клеточный иммунный ответ. Впервые получен конъюгат рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70 и полиоксидония, изучены его параметры. Антигенные свойства конъюгата изучены *in vivo* (на мышах).

Практическая значимость исследования.

Экспериментально было показано, что рекомбинантный белок *M. tuberculosis* HSP70 и его конъюгат с полиоксидонием являются сильными стимуляторами как Т-клеточного, так и гуморального иммунного ответа, причем конъюгация белка с полиоксидонием значительно усиливает этот ответ. Полученные результаты позволяют

рассматривать данный конъюгат в качестве прототипа субъединичной противотуберкулезной вакцины.

Результаты экспериментальных исследований прототипа конъюгированной субъединичной противотуберкулезной вакцины на основе рекомбинантного белка HSP70 и адьюванта полиоксидония представляют практический интерес при дальнейших исследованиях в этой области. Обнаруженный потенциал прототипа конъюгированной субъединичной противотуберкулезной вакцины можно охарактеризовать как высокий, что делает возможным развитие этого направления в области создания новых препаратов, предназначенных для профилактики туберкулеза.

Апробация работы.

Результаты исследования были доложены на Клинической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической медицины» (декабрь 2003, Москва), XIII Российском Национальном конгрессе «Человек и лекарство» (апрель 2005, Москва), Международной школе-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия» (ноябрь 2005, Москва), Международной конференции «Basic Science for Biotechnology and Medicine» (сентябрь 2006, Новосибирск), Международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (ноябрь 2006, Москва-Пушино), а также научных семинарах Всероссийского Научного Центра молекулярной диагностики и лечения и научных семинарах кафедры биохимии ММА им. И.М. Сеченова. Апробация работы состоялась на совместном заседании научно-методической конференции кафедры биохимии ММА им. И.М. Сеченова и лаборатории генных технологий ВНЦМДЛ 6 декабря 2006г.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Структура диссертации.

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, выводы, заключение, список цитированной литературы, включающий 138 источников. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 2 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Культуры микроорганизмов

Для получения рекомбинантного белка туберкулезной микобактерии HSP70 использовался штамм *E. coli* BL21/DE3.

Генно-инженерные процедуры

В работе использовались стандартные методы генетики *E. coli*. Для осуществления экспрессии HSP70 была сконструирована плазмидная ДНК, содержащая ген, кодирующий белок HSP70 туберкулезной микобактерии и нуклеотидную последовательность, кодирующую шесть остатков гистидина (т.н. гистидиновый таг, 6 x His-tag). В качестве источника гена белка HSP70 была использована геномная ДНК *M. tuberculosis*. Ген был выделен методом амплификации. Нуклеотидная последовательность, соответствующая гену HSP70 по сайтам рестрикции NdeI и XhoI была вставлена в вектор pQE30. Плазида любезно предоставлена Н. В. Гороховец (МНИИМЭ). Для целей данной работы ген HSP70, также несущий последовательность шести остатков гистидина, был переклонирован в вектор pET11c joy по сайтам рестрикции NdeI и XhoI. Манипуляции с ДНК осуществлялись в соответствии со стандартными протоколами [Маниатис Т. и др., 1984].

Очистка рекомбинантного белка из биомассы

Очистку осуществляли с помощью металло-хелатной хроматографии на никелевой смоле. Использовали никельсодержащую смолу (Amersham Biosciences, Швеция).

Анализ белка

Анализ белка проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [Laemmli, 1970]. Олигомерное состояние рекомбинантного белка HSP70 в растворе изучалось методами гель-фильтрации [Остерман Л.А., 1985] в хроматографической колонке 1,2x30 см с носителем «Сефакрил S-300» и электрофореза в нативных условиях [Остерман Л.А., 1981].

Определение концентрации полученного рекомбинантного белка

Концентрация полученного белка определялась по методу BCA (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma, USA) [Авдеев В.Г., 1977].

Очистка полученного белка от эндотоксина осуществлялась с использованием Detoxi-Gel™ (Endotoxin Removing Gel), содержащим полимиксин В, иммобилизованный на агарозе. Процедура очистки проводилась согласно рекомендациям производителя (Pierce, USA).

Определение содержания эндотоксина

Для определения соответствия полученного продукта требованиям, предъявляемым препаратам, проходящим доклинические испытания, рекомбинантный белок HSP70 был проверен на содержание эндотоксина методом ЛАЛ-тест по стандартной методике для данного теста [Ситникова А.Г. и др., 1994].

Лиофилизация

Высушивание путем замораживания в вакууме проводили из буфера PBS на установке фирмы «Lyovac» (Германия) в течение 36-48 часов.

Анализ иммунного ответа на рекомбинантный белок HSP70 на мышах

Животные. Мыши линии BALB/c, самки, массой 18-22 г, содержались на стандартном рационе в условиях вивария. В каждой опытной группе находилось по 3 животных.

Иммунизация. Животные иммунизировались 100 мкг белка HSP70 в 100 мкл стерильного фосфатного буфера – опытная группа, 100 мкл стерильного фосфатного буфера – контрольная группа, внутривенно. Через 4 недели проводилась повторная иммунизация. Через 2 недели после повторной иммунизации животных забивали для получения клеточной культуры лимфоцитов селезенки.

Имуноферментный анализ. Изучение антительного иммунного ответа проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) сывороток иммунизированных мышей, используя 96-луночные планшеты (Corning-Costar) с адсорбированным на них антигеном (рекомбинантным белком HSP70) в количестве 1 мкг в 100 мкл фосфатного буфера, pH 7,4, в лунке. Разведение антител 1:500 – 1:16000.

Культура клеток. Получали культуру клеток лимфоцитов селезенки. Клетки отмывали и ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки телят, 1% L-глутамин, 50 мМ β-меркаптоэтанол и 1% пенициллин-стрептомицин. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах (7x10⁵ клеток в лунке) в трех параллелях, в присутствии или отсутствии HSP70, при 37° С, во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ в течение 72 ч. За 6 ч до окончания инкубации в

опытные и контрольные лунки вносили по 1 μCi ^3H -тимидина (ГНЦ Курчатовский центр, Москва, Россия). Клетки собирали на стекловолокнистые фильтры и измеряли включение радиоактивного тимидина. Проводилась оценка индекса стимуляции (ИС) пролиферации (ИС = О/К, где О – среднее количество импульсов в минуту в трех параллелях с антигеном, К - среднее количество импульсов в минуту в трех параллелях без антигена). В качестве стандартного положительного контроля стимуляции пролиферации использовался фитогемагглютинин (ФГА).

Конъюгация рекомбинантного белка HSP70 и полиоксидония

Основные этапы конъюгации соответствовали ранее отработанной методике [Пинегин Б.В., Сараф А.С., 2001]. Анализ полученного конъюгата проводили методом ситовой хроматографии высокого давления с использованием детектора малоуглового рассеяния лазерного света (Low angle laser light scattering (LALLS) detector).

Изучение влияния рекомбинантного белка HSP70 и его конъюгата с полиоксидонием на Т-клеточный и гуморальный иммунный ответ на мышах

Животные. Мыши линии BALB/c, самки, массой 18-22 г, содержались на стандартном рационе в условиях вивария.

Иммунизация. Животные иммунизировались 100 мкг белка HSP70 в 100 мкл стерильного фосфатного буфера – 1-я опытная группа, 250 мкг конъюгата (содержал 20% рекомбинантного белка HSP70) в 100 мкл стерильного фосфатного буфера – 2-я опытная группа, 100 мкл стерильного фосфатного буфера – контрольная группа, внутривенно. Каждая группа состояла из 3 животных. Через 4 недели проводилась повторная иммунизация. Через 2 недели после повторной иммунизации животных забивали для получения клеточной культуры лимфоцитов селезенки и сыворотки периферической крови.

Имуноферментный анализ. Изучение антительного иммунного ответа проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) сывороток иммунизированных мышей, используя 96-луночные планшеты (Corning-Costar) с адсорбированным на них антигеном (рекомбинантным белком HSP70) в количестве 1 мкг в 100 мкл фосфатного буфера, pH 7,4, в лунке. Разведение антител: для сыворотки мышей, иммунизированных HSP70 1: 500 – 1:16000; для сыворотки мышей, иммунизированных конъюгатом HSP70 с полиоксидонием 1: 10000 – 1: 320000. Адсорбцию проводили в течение ночи при 4°C, после чего плашки трижды промывали

фосфатным буфером и блокировали 2 часа в растворе 2% сухого обезжиренного молока в фосфатном буфере, затем плашки снова трижды промывали фосфатным буфером. В подготовленные таким образом плашки вносили тестируемые антитела в 2% молоке на фосфатном буфере, рН 7,4, с 0,1% неионным детергентом Твин-20 (PBST) и инкубировали не менее 2 часов. Затем плашки промывали трижды буфером PBST. Образующиеся иммунные комплексы детектировали с помощью моноклональных антител против IgG мыши, меченных пероксидазой хрена. Образовавшиеся меченные ферментом иммунные комплексы проявляли с использованием субстрата, содержащего орто-фенилендиамин (ОФД) и перекись водорода. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл 1М H₂SO₄, оптическое поглощение измеряли при длине волны 492 нм.

Культура клеток. Получали культуру клеток лимфоцитов селезенки. Клетки отмывали и ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки телят, 1% L-глутамина, 50 мМ β-меркаптоэтанола и 1% пенициллин-стрептомицина. Клетки культивировали в 96-луночных плашках (7×10⁵ клеток в лунке) в трех параллелях в присутствии или отсутствии HSP70 при 37° С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ в течение 72 ч. За 6 ч до окончания инкубации в опытные и контрольные лунки вносили по 1 μCi ³H-тимидина. Клетки собирали на стекловолокнистые фильтры и измеряли включение радиоактивного тимидина. Проводилась оценка индекса стимуляции (ИС) пролиферации (ИС = О/К, где О – среднее количество импульсов в минуту в трех параллелях с антигеном, К - среднее количество импульсов в минуту в трех параллелях без антигена). В качестве стандартного положительного контроля стимуляции пролиферации использовался фитогемагглютинин (ФГА).

Проточная цитометрия. Проводилась по стандартной методике [M.G.Ormerod, 1990; Laff S.A., Langolis R.J., 1990]. Получали гомогенную суспензию изолированных лимфоцитов мыши из селезенки. Для идентификации лимфоцитов и определения их субпопуляционного состава использовали набор моноклональных антител Mouse BD Fc Block™. Детекцию проводили на приборе EPICS-C («Coulter Electronics», USA).

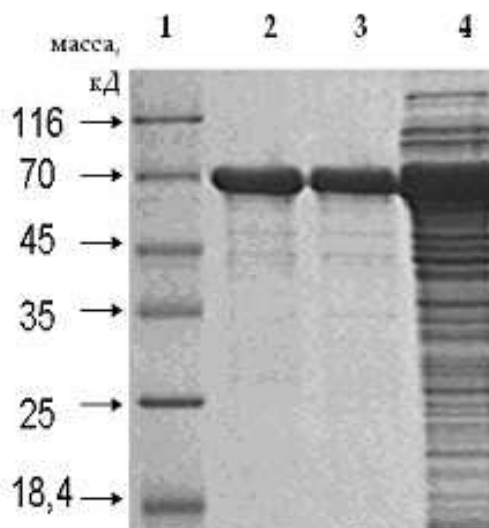
Результаты и их обсуждение

Получение рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70

На первом этапе работы нами были протестированы различные условия экспрессии белка HSP70 (различная температура роста культур, варьирование количеств индуктора *lac*-промотора изопропил- β -D-тиогалактопиранозида (ИПТГ), продолжительность индукции). Оптимальными условиями экспрессии оказались: выращивание культур при 37°C, индукция ИПТГ (до концентрации 1 мМ), продолжительность индукции – 3 часа.

Уровень экспрессии целевого белка составлял от 40 до 50% от общего клеточного белка (рис.1., дорожка 4). Общий выход целевого белка при экспрессии составлял около 200 мг с литра культуры клеток, что соответствует 100 мг с грамма биомассы. Белок находился в растворимой фракции цитоплазмы. Белок полностью адсорбировался на носитель при очистке методом металло-хелатной хроматографии, за счет аффинного связывания шести гистидиновых остатков с ионами никеля. Чистота выделенного белка составляла не менее 95% (рис.1.) Концентрация белка составляла 1,33 мг/мл (по методу BCA).

Рис.1. Электрофореграмма рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70 в 12% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (ДДС-Na). 1- маркер (Fermentas); 2,3 – очищенный белок HSP70, 4 – белок HSP70 в лизате клеток *E.coli*.



Общий выход очищенного белка составлял не менее 100 мг с литра бактериальной культуры.

Изучение физико-химических свойств рекомбинантного белка HSP70, важных для последующей конъюгации с адьювантом

Как известно, конформация рекомбинантного белка может отличаться от той, которую он имеет в клетке (в данном случае, в составе *M. tuberculosis*), что может приводить к изменению его свойств.

Было изучено олигомерное состояние полученного рекомбинантного белка в растворе. Для этого белок подвергали гель-фильтрации и электрофорезу в нативных условиях. Гель-фильтрация в хроматографической колонке 1,2x30 см с носителем «Сефакрил S-300» показала, что белок выходит единым гомогенным пиком, при этом подвижность HSP70 соответствует его мономерной форме, в сравнении с использовавшимися стандартными белками и компонентами с известными молекулярными массами (рис.2.).

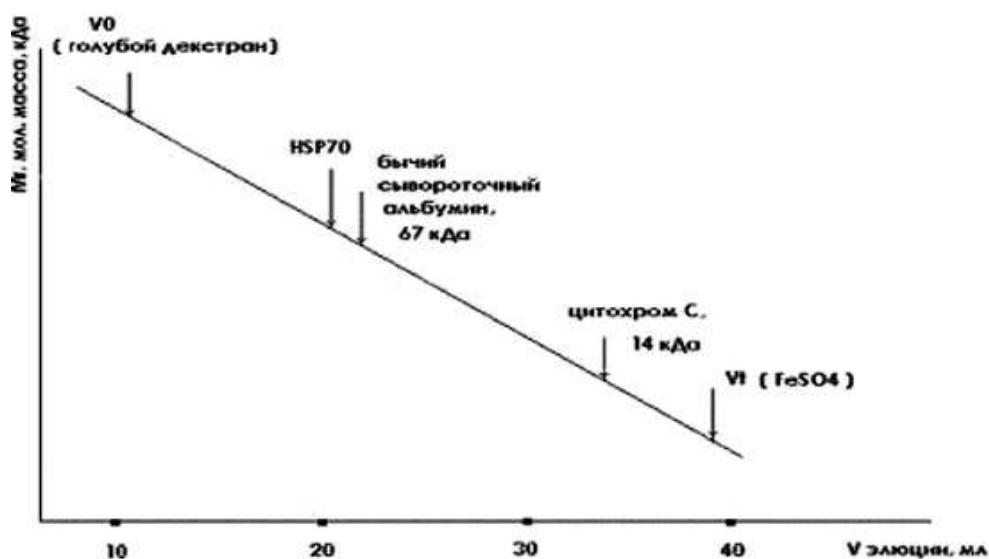


Рис.2. Гель-фильтрация рекомбинантного белка HSP70.

Электрофоретический анализ белка в нативных условиях (без добавления ДДС-Na) может использоваться для определения олигомерного и конформационного состояния белков, так как условия анализа позволяют сохранить пространственную структуру большинства белков. Такой электрофоретический анализ белка HSP70 показывает присутствие только одной полосы, соответствующей мономеру и полное отсутствие каких-либо других олигомерных форм и агрегатов с меньшей электрофоретической подвижностью (рис.3.).

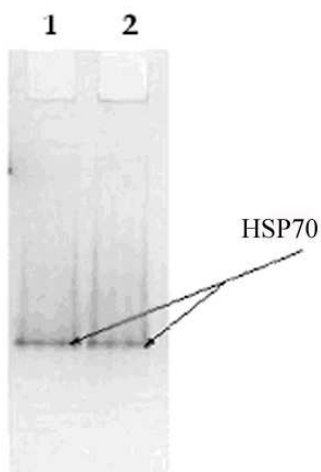


Рис.3.
 Электрофореграмма
 рекомбинантного белка
 теплового шока *M.*
tuberculosis HSP70 в
 нативных условиях.
 1, 2 – белок HSP70

Таким образом, согласно проведенным двум независимым тестам, выделенный HSP70 является мономером.

Хотя проведенные тесты не свидетельствуют о сохранении нативной конформации белка, известно, что для неправильно свернутых и денатурированных белков характерна тенденция к агрегации. Отсутствие агрегации свидетельствует о сохранении основных конформационных свойств белка. Принципиальным для нашей работы является сохранение растворимости рекомбинантного белка и его стабильность в растворе как мономера, что важно для дальнейшего использования данного рекомбинантного белка в качестве основы для субъединичной вакцины.

Очистка полученного рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70 от эндотоксина

Белок, получаемый в системе экспрессии в клетках кишечной палочки, содержит эндотоксин - липополисахарид клеточной стенки грамотрицательных бактерий, который вызывает нежелательные побочные эффекты в организме человека. Освободить получаемый продукт от эндотоксина позволяет использование аффинного сорбента, содержащего полимиксин В, который обладает высоким сродством к эндотоксину [Issekutz A.C., 1983]. Для этого проводили хроматографию полученного препарата белка на указанном носителе. При этом эндотоксин остается сорбированным на носителе, а белок проходит через него, не задерживаясь.

Для определения соответствия полученного продукта требованиям, предъявляемым препаратам, проходящим доклинические испытания, рекомбинантный белок HSP70 после очистки на полимиксине В был проверен на содержание эндотоксина методом ЛАЛ-тест по стандартной методике.

Количественно определение содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате возможно путем анализа серии его разведений. Расчет основных показателей для данного препарата белка: допустимая норма введения - 5 ЕЭ/кг * час; концентрация препарата белка HSP70 (определена методом ВСА) - 1,33 мг/мл; доза препарата, вводимая в течение 1 часа на человека - 0,05 мг (для препаратов вводимых парентерально); доза препарата, вводимая в течение 1 часа на 1 кг массы – 0,05мг / 70кг = $\sim 0,7 \times 10^{-3}$ мг; максимально допустимая концентрация эндотоксина - 7000 ЕЭ/мл (9310 ЕЭ/мл); максимально допустимая степень разведения (отношение максимально допустимой концентрации эндотоксина, ЕЭ/мл к заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива) - 310 333 раз; заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива - 0,03 ЕЭ/мл. Для расчета концентрации бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце умножают чувствительность ЛАЛ-реактива (λ) на значение фактора разведения, являющегося результатом реакции (таблица 1.).

Таблица 1. Результаты ЛАЛ-теста для разведений препарата белка HSP70

повторность	Разведение препарата белка							ЛАЛ-вода («-» контроль)	0,06 ЕЭ/мл («+» контроль)
	1:500	1:600	1:700	1:800	1:900	1:1000	1: 10 000		
1	+	+	+	+	+	-	-	-	+
2	+	+	+	+	+	-	-	-	+

«+» - образование твердого геля, положительный результат; «-» - гель не образуется, отрицательный результат.

Для результатов, полученных для нескольких повторностей, рассчитывают среднее геометрическое значение.

Концентрация бактериальных эндотоксинов в исследуемом образце рекомбинантного белка HSP70 составила ~ 27 ЕЭ/мл.

Содержание эндотоксина 27 ЕЭ/мл значительно ниже максимально допустимой концентрации эндотоксина 9310 ЕЭ/мл, определенной для данного препарата. В настоящее время мы не можем указать точную дозировку препарата, но можно сказать, что при данной чистоте препарата по эндотоксинам его можно вводить парентерально

до 1 мл (1,33 мг), что явно превышает ожидаемое содержание белка в одной дозе вакцины.

Для изучения условий хранения белка его подвергали лиофилизации из буфера PBS. После одного месяца его хранения в лиофилизованном состоянии препарат рекомбинантного белка HSP70 подвергали анализу.

Полностью отсутствует его деградация по результатам электрофореза с добавлением ДДС-Na (рис.4.). После растворения белок сохраняет свою мономерную форму по результатам электрофоретического анализа в нативных условиях (данные не представлены).

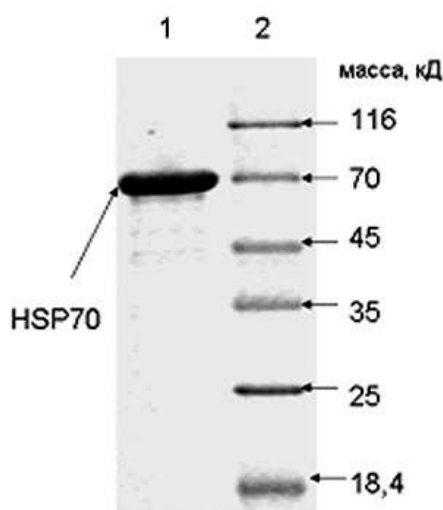


Рис.4. Электрофореграмма очищенного белка HSP70 после хранения в лиофилизованном виде в течение месяца.

1 – белок HSP70; 2 – маркер (Fermentas)

Таким образом, процесс лиофилизации и хранение белка в течение продолжительного периода времени не влияют на интактность и олигомерное состояние выделенного белка.

Изучение влияния рекомбинантного белка HSP70 на иммунный ответ на мышах

Белок *M. tuberculosis* HSP70 является сильным антигеном, что было подтверждено рядом исследований. При получении рекомбинантного белка его конформация может отличаться от той, что он имеет в составе туберкулезной микобактерии, что может приводить к изменению его антигенных свойств.

Влияние HSP70 на гуморальный иммунный ответ

Методом непрямого твердофазного ИФА были проанализированы сыворотки мышей, иммунизированных рекомбинантным белком HSP70 (рис.5.).

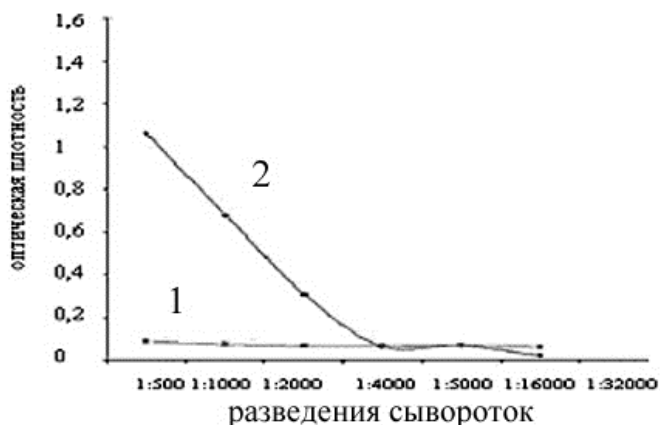


Рис.5. Влияние рекомбинантного белка HSP70 на гуморальный иммунный ответ.

1 - отрицательный контроль, 2 - иммунизация HSP70

Титр антител к белку составляет 1:4000, следовательно, HSP70 можно охарактеризовать, как достаточно сильный антиген.

Влияние HSP70 на T-клеточный иммунный ответ

Клеточный иммунитет является самым важным компонентом ответа иммунной системы на туберкулезную инфекцию. От нормального взаимодействия клеток иммунной системы зависит уничтожение и удаление микобактерий, попавших в организм. T-лимфоциты играют в этом взаимодействии одну из наиболее значительных ролей.

В ходе эксперимента была показана индуцированная рекомбинантным белком HSP70 пролиферация T-лимфоцитов (рис.6.).

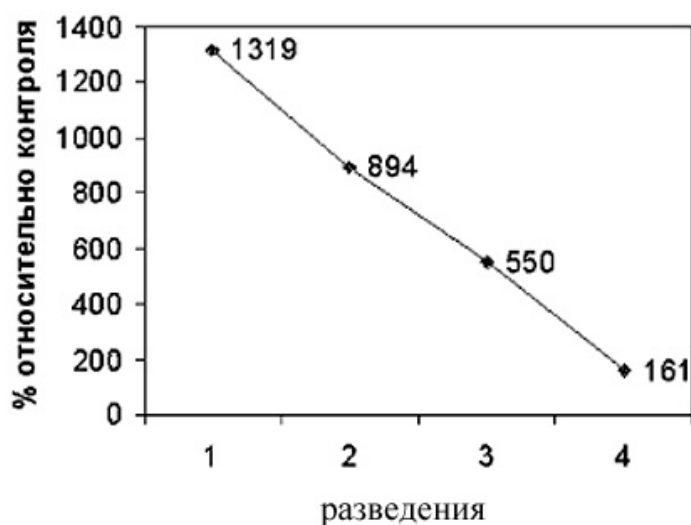


Рис.6. Влияние HSP70 на T-клеточный иммунный ответ. По оси абсцисс – разведения антигена, по оси ординат - % относительно отрицательного контроля.

Стимуляция пролиферации, в сравнении с отрицательным контролем, составляла 1329% для HSP70. Стандартный положительный контроль стимуляции пролиферации ФГА в тех же условиях показывал 618% стимуляции пролиферации. Таким образом, HSP70 является более сильным активатором пролиферации, чем ФГА, что позволяет охарактеризовать белок HSP70 как сильный стимулятор Т-клеточного ответа.

Полученные результаты подтверждают, что рекомбинантный HSP70 является сильным антигеном и вызывает Т-клеточный иммунный ответ. Механизм действия вакцины БЦЖ состоит в активации именно Т-клеточного иммунного ответа, и тот факт, что HSP70 вызывает данный тип иммунной реакции позволяет рассматривать его в качестве кандидата для создания субъединичной противотуберкулезной вакцины.

Получение конъюгата рекомбинантного белка HSP70 и полиоксидония

Следующим этапом работы была конъюгация полученного рекомбинантного белка HSP70 и полиоксидония - сополимера N-оксида 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиил)-1,4-этиленпиперазиний бромида с молекулярной массой 100 Кд, относящегося к классу водорастворимых производных гетероцепных алифатических полиаминов, физиологически активного высокомолекулярного соединения, обладающего выраженной иммуномодулирующей активностью. Полиоксидоний успешно применяется в качестве адъюванта в субъединичных вакцинах [Пинегин Б.В., Сараф А.С., 2001; Петров Р.В. и др., 2002]. Применение полиоксидония в качестве адъюванта в субъединичных вакцинах основано на образовании ковалентной связи между функциональными группами в составе полиоксидония и белками-иммуногенами.

Данный этап работы осуществлялся совместно с ГНЦ Институт иммунологии.

Активированную (гидразидную) форму полиоксидония растворяли в смеси воды и 37% HCl, охлаждали до 0 – 4 °С, далее вводили порциями при перемешивании за 30 мин нитрит натрия, перемешивали при той же температуре 1,5 часа, температуру увеличивали до 20 °С, раствор нейтрализовали добавлением порциями карбоната калия до pH 6,5 – 7,0. Далее к полученному раствору добавляли растворенный в воде рекомбинантный белок HSP70 и полученную смесь оставляли на ночь при 37 °С.

Анализ методом ВЭЖХ на ситовой колонке (см. ниже) показывает полное вхождение исходного белка в высокомолекулярную фракцию. Конъюгат выделяли диализом полученного раствора против воды с последующей лиофильной сушкой. Выход препарата составил 8 – 9 мг. Анализ проводили методом ситовой хроматографии

высокого давления с использованием детектора малоуглового рассеяния лазерного света (Low angle laser light scattering (LALLS) detector).

Молекулярная масса конъюгата составляет 1300 кДа (рис. 7.).

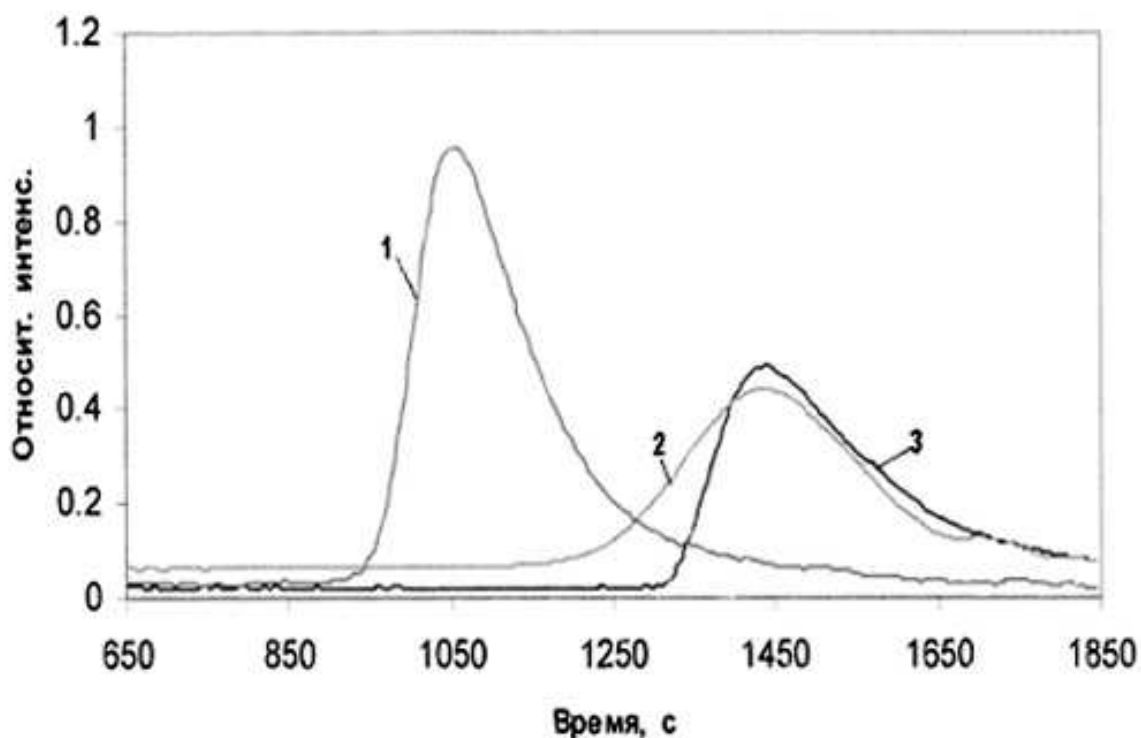


Рис.7. Хроматография конъюгата белка HSP70 и полиоксидония.

1 – конъюгат белка теплового шока HSP70 и полиоксидония; 2 – полиоксидоний; 3 – белок теплового шока HSP70. M_w (конъюгата) = $1,3 \times 10^6$; M_w (полиоксидония) = 75×10^3 ; M_w (белка HSP70) = 70×10^3

Комбинация LALLS и второго детектора, чувствительного к концентрации вещества, дает возможность прямого определения молекулярной массы (M_w), не прибегая к калибровке хроматографической системы. Данный метод обеспечивает корректное определение M_w даже в тех случаях, когда молекулярно-массовые характеристики объектов выходят за пределы разделяющей способности хроматографической колонки или когда имеет место неспецифическое взаимодействие вещества и неподвижной фазы колонки.

Были отработаны адекватные условия для конъюгации. Получен препарат с содержанием белка 20% (0,2 мг белка в 1 мг вещества).

Изучение влияния рекомбинантного белка HSP70 и его конъюгата с полиоксидонием на Т-клеточный и гуморальный иммунный ответ на мышах

Иммунизация мышей рекомбинантным белком HSP70 и его конъюгатом с полиоксидонием вызывает комплексные изменения в организме иммунизированных животных. Прежде всего, эти изменения затрагивают клеточное звено иммунитета. Наблюдается значительное увеличение количества Т-клеток (CD4+ и CD8+) с сохранением нормального иммунорегуляторного индекса (соотношения CD4+/CD8+).

При изучении гуморального иммунитета выявлено увеличение содержания в сыворотке крови иммуноглобулинов класса IgG. Вполне вероятно, что усиление антигенных свойств прототипа субъединичной вакцины путем конъюгации рекомбинантного белка HSP70 с полиоксидонием позволит уменьшить дозу бактериального антигена в составе вакцины, одновременно с этим повысить эффективность вакцинации, а также приведет к большей экономичности. Примером может служить использование полиоксидония в качестве адъюванта в противогриппозной субъединичной вакцине Гриппол. Полиоксидоний обладает выраженным адъювантным и иммуномодулирующим эффектом. Первое свойство позволило существенно снизить в составе вакцины дозы вирусных антигенов и параллельно с этим существенно повысить эффективность и напряженность противовирусного иммунитета. Со вторым свойством полиоксидония связана его способность оказывать нормализующий эффект на состояние всех компонентов иммунной системы [Петров Р.В. и др., 2003].

Оценка гуморального (антительного) ответа

Методом непрямого твердофазного ИФА был проведен сравнительный анализ антительного ответа мышей, иммунизированных рекомбинантным белком HSP70 и антительного ответа мышей, иммунизированных конъюгатом.

При определении титра антител в исследуемой сыворотке за титр в ИФА к используемому антигену принимают то наибольшее разведение сыворотки, при котором значение её оптической плотности превышает значение оптической плотности контрольной сыворотки. Рекомбинантный белок HSP70 известен как достаточно сильный иммуноген, что было подтверждено экспериментально. Титр антител к

рекомбинантному белку HSP70 составил 1:4000. Конъюгация с полиоксидонием усиливает уровень антительного ответа по сравнению с HSP70 (рис. 8.). Титр антител к конъюгату составил 1 : 160000. Таким образом, можно говорить о том, что конъюгация значительно (в 40 раз) усиливает гуморальный иммунный ответ.

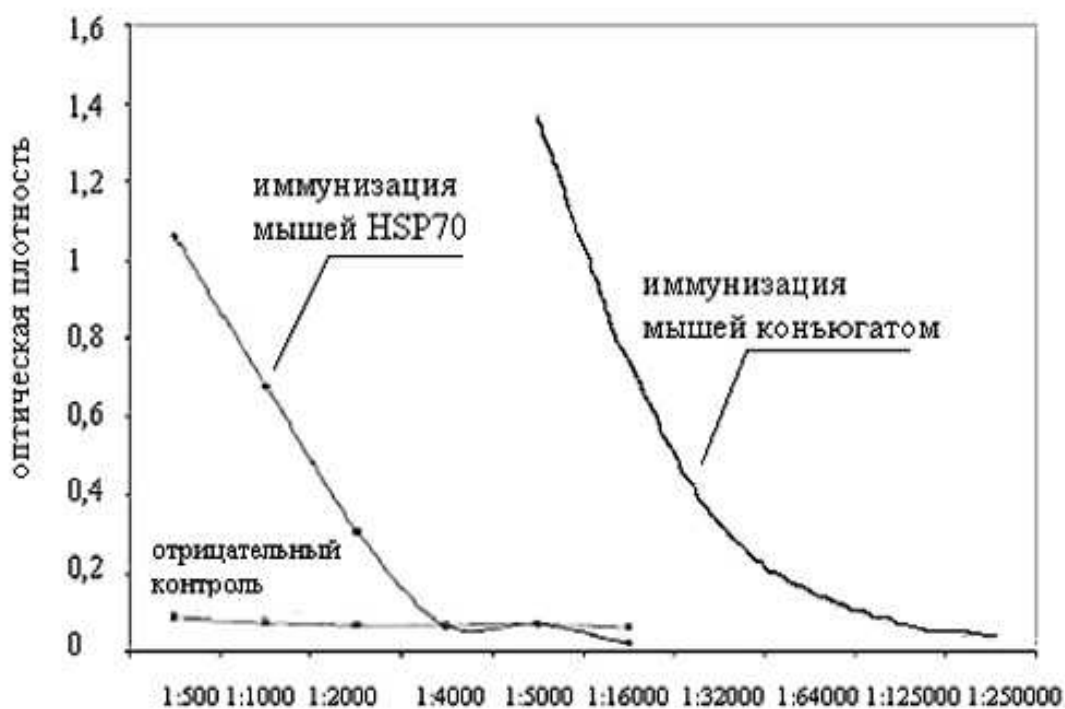


Рис.8. Влияние рекомбинантного белка HSP70 *M. tuberculosis* и его конъюгата с полиоксидонием на гуморальный иммунный ответ.

Показано, что при вакцинном процессе БЦЖ после введения вакцины титры антител прогрессивно нарастают и достигают максимума в тот период, когда максимально выраженной является резистентность вакцинированных животных к последующему заражению [Глебович О.В. и др., 1978].

Антительный ответ не лежит в основе борьбы с микобактериями, но является важным показателем, отражающим общую активацию иммунной системы, направленную на борьбу с туберкулезом. (Vordermeier Н.М., 1996; А.М. Dannenberg, 2001).

Оценка Т-клеточного ответа

Клеточный иммунитет является центральным звеном резистентности к туберкулезу. Для активации адаптивного иммунного ответа к туберкулезной микобактерии необходимо представление белковых антигенов именно из этой бактерии. Это представление осуществляют антиген-представляющие клетки (АПК). В процессе фагоцитоза АПК представляют пептиды из туберкулезных микобактерий на собственной поверхности с помощью молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) II класса. Т-клетки хелперного ряда, несущие маркер CD4+, играют важную роль в формировании противотуберкулезного иммунитета. CD4+Т-лимфоциты распознают именно комплекс молекулы МНС II класса с пептидами антигенов. Активируясь, Т-лимфоциты-хелперы секретируют различные цитокины. В частности, интерлейкин-2 (IL-2), стимулирующий пролиферацию как Т-хелперов, так и цитотоксических CD8+лимфоцитов (киллеров) и интерферон- γ (IFN- γ), который активирует макрофаги. Пролиферируя, CD4+Т-лимфоциты играют важную роль в формировании туберкулезной гранулемы и ограничении распространения возбудителя в тканях. CD8+лимфоциты распознают молекулы МНС I класса и играют важную роль при инфекционном процессе, вызванном колонизацией туберкулезных микобактерий. Одной из основных составляющих патогенеза туберкулеза является персистенция туберкулезных микобактерий в макрофагах. Цитотоксические CD8+лимфоциты способны уничтожить инфицированные макрофаги, а также непосредственно уничтожить персистирующие внутри макрофагов туберкулезные микобактерии.

Был сравнен иммунный ответ на белок HSP70 у мышей, иммунизированных конъюгатом и мышей, иммунизированных HSP70. Было показано, что иммунизация конъюгатом значительно усиливает иммунный ответ (рис.9.).

Пролиферация Т-клеток достаточно сильная в случае иммунизации только рекомбинантным белком HSP70 и еще более значительная при иммунизации конъюгатом. В обоих случаях имеются участки линейной зависимости от концентрации антигена. При иммунизации рекомбинантным белком HSP70 и при иммунизации конъюгатом пролиферация в обоих случаях превышала значение таковой для стандартного контроля стимуляции пролиферации (ФГА). ФГА известен как один из наиболее сильных стимуляторов пролиферации. Контроль использовался для каждой из групп мышей.

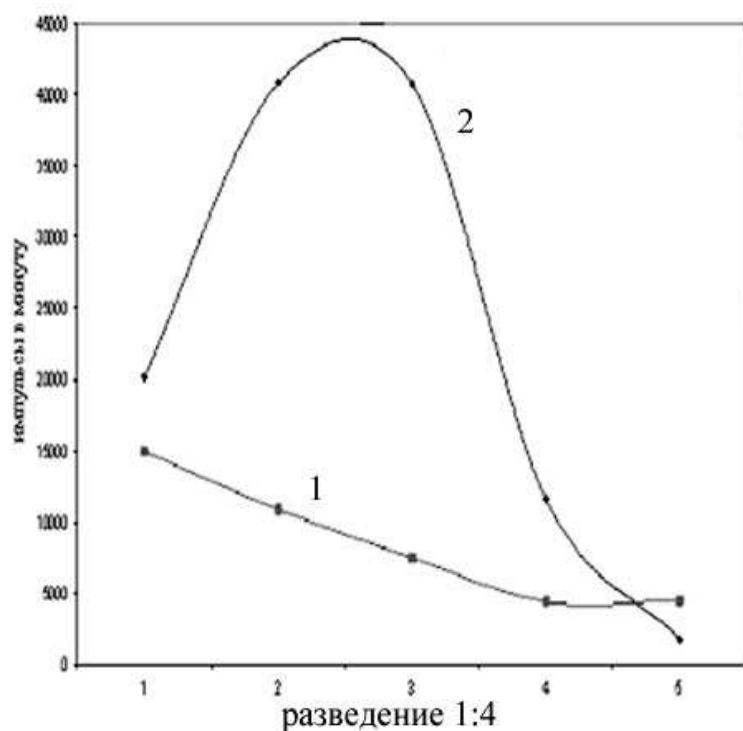


Рис.9. Влияние рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70 и его конъюгата с полиоксидонием на Т-клеточный иммунный ответ. 1 – иммунизация рекомбинантным белком HSP70; 2 – иммунизация конъюгатом. Данные приведены за вычетом значения фона.

Иммунизация рекомбинантным белком HSP70 усиливает пролиферацию в 2,1 раза по сравнению со своим стандартным положительным контролем, иммунизация конъюгатом усиливает пролиферацию в 1,7 раза. По сравнению с иммунизацией рекомбинантным белком HSP70 конъюгат усиливает пролиферацию в 2,7 раза.

Методом проточной цитометрии было установлено соотношение CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов (рис.10.). Показано, что, стимулируя Т-клеточный ответ, рекомбинантный белок и его конъюгат с полиоксидонием не нарушают соотношения CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов (иммунорегуляторный индекс), который составил 1,38 для мышей, иммунизированных рекомбинантным белком HSP70 и 1,39 для группы, иммунизированной конъюгатом (нормальное значение иммунорегуляторного индекса составляет 1,2-2,5).

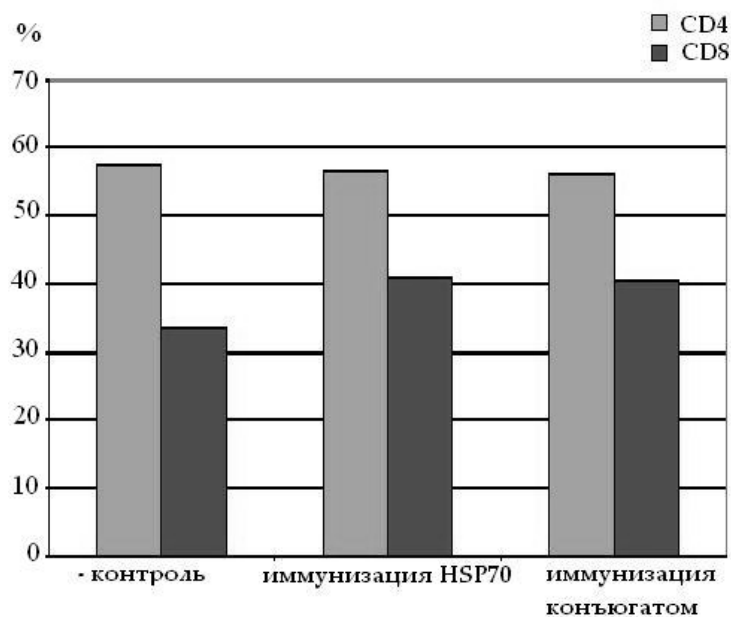


Рис.10. Распределение CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов при стимуляции клеточного иммунного ответа по результатам проточной цитометрии.

Формирование эффективной иммунологической защиты зависит от клеточного взаимодействия. Способность лимфоцитов синтезировать цитокины делает возможным активацию макрофагов и цитотоксических лимфоцитов. Если макрофаги, захватившие туберкулезные микобактерии, активированы, возможно уничтожение и элиминация патогена, что играет важную роль при первом контакте организма с туберкулезной микобактерией. Вакцина БЦЖ эффективна в предотвращении заболевания тяжелыми формами туберкулеза, однако не предотвращает инфицированности микобактерией и возможности развития туберкулезного процесса в дальнейшем. Персистенция туберкулезных микобактерий в макрофагах является одним из основных составляющих патогенеза заболевания. CD8+лимфоциты способны оказывать цитотоксическое действие на макрофаги, инфицированные туберкулезными микобактериями.

Таким образом, введение рекомбинантного белка туберкулезной микобактерии HSP70 и его конъюгата с полиоксидонием вызывает комплекс изменений в иммунной системе, затрагивающий как гуморальное, так и клеточное составляющие иммунитета. Антительный ответ не лежит в основе борьбы иммунной системы с микобактериями, но является важным показателем, отражающим общую активацию иммунной системы по отношению к возбудителю туберкулёза. В основе этой резистентности лежит активация клеточного иммунного ответа. Нами показано, что введение рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70 и его конъюгата с полиоксидонием вызывает активную пролиферацию Т-клеток, как CD4+лимфоцитов (хелперов), так и цитотоксических CD8+лимфоцитов (киллеров) с сохранением их нормального

соотношения. Конъюгация рекомбинантного белка HSP70 с полиоксидонием в значительной мере усиливает его антигенные свойства. Представленные результаты свидетельствуют о высоком потенциале полученного прототипа конъюгированной субъединичной противотуберкулезной вакцины на основе рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70. В дальнейшем предстоит изучение вакцинного эффекта полученных препаратов (рекомбинантного белка HSP70 и его конъюгата с полиоксидонием) на модели мышей, зараженных туберкулезом.

ВЫВОДЫ:

1. Отработан метод получения рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70 с чистотой 98%.
2. Изучены основные физико-химические параметры рекомбинантного белка *M. tuberculosis* HSP70. Показано, что белок сохраняет растворимость и стабильность в растворе как мономер, что важно для дальнейшего использования данного рекомбинантного белка в качестве основы для субъединичной вакцины.
3. Показано, что белок HSP70 соответствует требованиям проведения доклинических испытаний (чистота, отсутствие деградации, содержание эндотоксинов).
4. Экспериментально показано на мышах, что рекомбинантный белок HSP70 является сильным стимулятором Т-клеточного иммунного ответа.
5. Впервые получен конъюгат рекомбинантного белка HSP70 и иммуномодулятора полиоксидония, изучены и охарактеризованы его свойства.
6. В экспериментах на мышах показано, что рекомбинантный белок *M. tuberculosis* HSP70 и его конъюгат с полиоксидонием оказывают стимулирующее влияние как на Т-клеточный, так и на гуморальный иммунный ответ, причем конъюгат белка с полиоксидонием является более эффективным стимулятором гуморального и Т-клеточного ответа. Полученные результаты позволяют рассматривать данный конъюгат в качестве прототипа субъединичной противотуберкулезной вакцины.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Калюкина А.С., Позднякова Н.В. Получение рекомбинантного белка HSP70 *M. Tuberculosis* с целью возможного клинического применения в качестве субъединичной вакцины против туберкулеза // Актуальные вопросы клинической медицины: материалы. клинической конференции молодых ученых (19 дек. 2003г., г. Москва). – М., 2003. – С. 327-332.
2. Калюкина А.С. Получение рекомбинантного белка HSP70 *M. Tuberculosis* для возможного применения в профилактике туберкулезной инфекции // Системная биология и биоинженерия: материалы международной школы-конференции молодых ученых (28 нояб. – 2 дек. 2005г., г. Москва). – М., 2005. – С.142-143.
3. Калюкина А.С., Северин Е.С., Зыкова И.Е. Новые подходы к диагностике туберкулеза // Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии. - 2005. - №3. - С.11-17.
4. Калюкина А. С. Получение рекомбинантных белков *Mycobacterium tuberculosis* для возможного применения в диагностике и профилактике туберкулезной инфекции // XIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сборник материалов конгресса (3-7 апр. 2006г., г. Москва). – М., 2006. – С. 156.
5. Калюкина А.С., Лауринавичюте Д.К., Юркова М.С., Федоров А.Н., Северин Е.С. Изучение основных физико-химических параметров и влияния на пролиферативную активность Т-лимфоцитов рекомбинантного белка HSP70 *M.tuberculosis* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006. - № 4. – С. 37-41.
6. Kalyukina A.S., Laurinavichiute D.K., Yurkova M.S., Fedorov A.N., Severin E.S. *M. tuberculosis* recombinant protein HSP70 effect on the proliferative activity of T-lymphocytes // Basic Science for Biotechnology and Medicine: proceedings of International conference (sep. 3-7 2006, Novosibirsk). – Novosibirsk, 2006. - P. 79.
7. Калюкина А.С., Юркова М.С., Лауринавичюте Д.К., Федоров А.Н., Северин Е.С. Влияние рекомбинантного белка HSP70 *M. tuberculosis* на пролиферативную активность Т-лимфоцитов // Генетика микроорганизмов и биотехнология: материалы международной школы-конференции (28 нояб. – 1 дек. 2006г., Москва-Пушино). – Москва – Пушино, 2006. - С. 49.