

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СЛИТОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА OPRF-ATOX-OPRI

Е.М. Зими́на¹, А.А. Кало́шин¹, А.В. Солда́тенкова¹, Н.А. Миха́йлова¹, Е.Д. Мерку́шова²

¹ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – возбудитель острых и хронических инфекционных заболеваний у пациентов с иммунодефицитными состояниями разного происхождения. Традиционное лечение этой патологии малоэффективно ввиду устойчивости патогена к широкому спектру антибиотиков. Поэтому перспективным подходом для борьбы с синегнойной инфекцией может быть иммунопрофилактика. В России и за рубежом на протяжении многих лет разрабатываются вакцинные препараты на основе протективных антигенов *P. aeruginosa*, полученных в том числе генно-инженерными методами.

На основе результатов исследований иммунобиологических свойств ряда отдельных рекомбинантных белков *P. aeruginosa*, проведенных в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, получены варианты слитых рекомбинантных белков, среди которых наибольший интерес для последующего исследования представляет белок OprF-aTox-OprI.

Цель исследования – изучение протективной активности слитого рекомбинантного антигена.

При выполнении работы использовали полученный в лаборатории протективных антигенов слитый рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI, сорбированный на геле гидроокиси алюминия. Остаточное содержание белка в сорбированном препарате определяли в ИФА по методике, разработанной ранее в лаборатории протективных антигенов. Оценку защитного эффекта проводили на белых беспородных мышах при двукратной иммунизации с двухнедельным интервалом и последующем заражении живой вирулентной культурой *P. aeruginosa*. Уровень экспрессии генов определяли путем измерения количества комплементарной ДНК (кДНК) целевого гена с помощью ПЦР в «реальном времени». Для получения иммунных сывороток проводили подкожное введение антигена с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) с последующим внутривенным введением антигена через две недели. Полученные иммунные сыворотки использовали для исследования защитных свойств в отношении экзотоксина А *P. aeruginosa* на культуре клеток (линия Vero) и живой вирулентной культуры на животных (пассивная защита).

Определение протективных свойств рекомбинантных белков является основополагающим моментом при создании вакцин. На проявление которых влияют антигенные составляющие и используемый адъювант. Доступность распознаваемых структур клеткам иммунной системы обеспечивается подбором оптимального соотношения антигена и адъюванта, а также условий сорбции.

Условия сорбции изучали, изменяя следующие параметры: соотношение белок-адъювант и температуру сорбции. Были исследованы три соотношения белок-адъювант 1:1, 1:2 и 1:3 и два температурных режима (18 ± 2 и 5 ± 3 °C). Каждые три часа проводили отбор проб для определения содержания не связавшегося с сорбентом белка. По результатам исследования выявлена обратная зависимость содержания белка по отношению к адсорбенту. При соотношениях 1:2 и 1:3 регистрировали следовые количества антигена через три часа сорбции при обоих температурных режимах. При соотношении 1:1 белок сорбировался не полностью (20–25 % белка, в зависимости от температурного режима, находилось в несвязанном состоянии). На время сорбции также влияли температурные условия: при повышении температуры в соотношении 1:1 через шесть часов определяли следовые количества рекомбинантного белка, а при температуре 4 °C – около 20 %.

При исследовании влияния содержания адъюванта на протективную активность, основываясь на данных полученных в ходе разработки рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС), была проведена сорбция слитого рекомбинантного антигена в соотношении белок-адъювант 1:3. Для вакцины РВС данное соотношение обеспечивало максимальный защитный эффект. Однако, с гибридным белком OprF-aTox-OprI применение соотношения 1:3 при сорбции привело к снижению протективной активности вне зависимости от иммунизирующей дозы белка. В связи с этим проведена дальнейшая работа по подбору содержания адъюванта по отношению к белку.

Апробированы соотношения белок-адъювант 1:1 и 1:2 и иммунизирующие дозы белка 50, 75 и 100 мкг. Максимальный защитный эффект выявлен при соотношении белок-адъювант 1:1 и иммунизирующей дозе 50 мкг белка (индекс эффективности – ИЭ – 4,3). При соотношении белок-адъювант 1:2 наблюдали дозозависимый эффект (ИЭ 2,3 при иммунизирующей дозе 50 мкг белка увеличился до 3,5 при иммунизации 100 мкг белка).

Эффективность соотношения белок-адъювант 1:1 подтверждена исследованиями по оценке уровня экспрессии генов одного из ключевых факторов развития врожденного иммунного ответа – TLR4. У мышей, иммунизированных препаратом в данном соотношении, активация врожденного звена иммунного ответа и распознавание антигена происходило раньше, чем в контрольной группе и у мышей, иммунизированных препаратом с соотношением 1:2. При этом Общий уровень экспрессии целевого гена TLR4 свидетельствовал о более выраженном ответе на введение патогена (в 24 раза выше чем в контрольной группе на 2-е сутки после заражения).

Защитными свойствами обладали и сыворотки, полученные при иммунизации кроликов слитым рекомбинантным белком. Схема иммунизации была рассчитана на получение максимальных титров антител в краткие сроки. Оценка протективных свойств полученных сывороток проводили в двух тестах: нейтрализация токсина на культуре клеток и пассивной защиты. К суточному монослою культуры клеток линии Vero добавляли смесь разведенного в среде для культивирования токсина и иммунной сыворотки. Результаты оценивали визуально под микроскопом через 48 ч. Иммунные сыворотки обеспечивали защиту клеток от действия токсина. Через 48 ч наблюдали монослой живых прикрепленных клеток. Результат действия нативной сыворотки визуально не отличался от отрицательного контроля, при котором в поле зрения попадали единичные прикрепленные живые клетки.

Пассивную защиту оценивали путем введения цельной иммунной сыворотки и живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* с интервалом в 2 ч. Учитывали павших животных в течение 7 дней. Результаты опыта отображали в виде ЛД₅₀ и ИЭ. Высокие индексы эффективности специфической (13,9) и нативной (9,8) сывороток показывают не только уровень защиты организма специфическими антителами, но и вклад неспецифических компонентов.

По результатам проведенной работы выявлено влияние условий сорбции на проявление специфической активности слитого рекомбинантного антигена. Определено соотношение белок-адъювант обеспечивающее максимальный защитный эффект, подтвержденный иммунологическими исследованиями. Выявленные проективные свойства специфических сывороток открывают перспективу их применения как средства пассивной защиты.