УДК 66.047 DOI: http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-2-29-30

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА PHOE *K.PNEUMONIAE*

А.Е. Зайцев, А.А. Калошин

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

Актуальность. *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae)*, грамотрицательная условно-патогенная бактерия, относящаяся к семейству *Enterobacteriae*. Она способна вызывать инфекции различной локализации, включая пневмонию, сепсис, абсцессы и инфекции мочевыводящих путей, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом[1]. В последние годы отмечается рост числа внутрибольничных инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, в частности у пациентов на ИВЛ [2]. Наиболее эффективными препаратами против бактериальных патогенов, таких как *K. pneumoniae* являются антибиотики, но способность *K. pneumoniae* продуцировать β-лактамазы, делает этот возбудитель резистентным к β – лактамным антибиотикам. *K. pneumoniae* вошла в список патогенов, для которых, согласно данным ВОЗ, требуется приоритетная разработка вакцин. Ключевыми факторами патогенности *K. pneumoniae* являются: капсульный полисахарид, который защищает бактерию от фагоцитоза [3], липополисахарид, играющий важную роль в развитии воспалительного процесса [4], а также белки наружной мембраны, которые играют ключевую роль в защите бактерии от внешних факторов. Одним из таких белков, является PhoE, принадлежащий к семейству поринов. Роль PhoE в патогенности *K. pneumoniae* изучена недостаточно полно, однако известно, что порины обеспечивают транспорт питательных веществ в бактериальную клетку, а также обладают иммуногенностью. Поскольку PhoE является поверхностным белком, он может рассматриваться как потенциальная мишень для разработки вакцин [5]. PhoE является перспективным антигеном-кандидатом для вакцины против *K. pneumoniae*, поэтому дальнейшее изучение его иммуногенности, структуры, функций может способствовать разработке новых подходов к профилактики инфекций, вызванных этим патогеном.

Цель. Изучение иммуногенных и протективных свойств рекомбинантного белка PhoE *K. pneumoniae*, полученного в НИИВС им. И.И. Мечникова.

Материалы и методы. Поверхностный рекомбинантный белок PhoE был получен в НИИВС им. И.И. Мечникова. Для иммунизации животных белок адсорбировали на геле алюминия гидроксида (Sigma-Aldrich CO., США). В эксперименте использовали беспородных мышей массой 14-16 г., разделенных на 6 групп по 8 голов в каждой. Мышей иммунизировали дозами PhoE 25мкг +AL25 мкг, PhoE50 мкг +AL50 мкг, PhoE50+AL200, PhoE50 мкг +AL500 мкг. В качестве контроля использовали группу мышей иммунизированных дозой AL 50 мкг (адъювантный контроль), и группу неиммунизированных мышей. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом 14 суток. Через 7 дней после второй иммунизации у мышей собирали пуловые сыворотки для определения уровня IgG-антител к PhoE методом ИФА. Уровень антител оценивали по значениям ОП при разведении сывороток 1:100. Через 14 суток после второй иммунизации мышей заражали внутрибрюшинно штаммом К2 *K. pneumoniae* (50 м.к. в 0,5 мл). Количество выживших мышей учитывали в течении 8 суток после заражения.

Результаты. Концентрации гидроксида алюминия 50 и 25 мкг (соотношение с PhoE 1:1) давали не полную адсорбцию белка и вызывали образование IgG-антител у единичных мышей. Концентрации гидроксида алюминия 500 мкг (соотношение с PhoE 1:10) вызывали полную адсорбцию белка и образование IgG-антител у всех мышей в группе. Средний уровень антител в группе PhoE50+AL500 мышей составил 1,3 ед. ОП и достоверно превышал показатель контрольной группы— 0,2 ед. ОП ($p < 0,05$). В группе мышей иммунизированных дозой PhoE50+AL200 на 6-е сутки после заражения выживаемость мышей составила 75% (6/8), тогда как в контрольной группе — 25% (2/8).

Вывод. Результаты исследования показали, что рекомбинантный белок PhoE обладает иммуногенными свойствами, зависящими от концентрации адъюванта и представляет собой перспективный объект для более детального изучения. Дальнейшее изучение PhoE может способствовать созданию эффективных средств профилактики клебсиеллезных инфекций.

Литература

1. Hu Y., Anes J., Devineau S., Fanning S. Emerging trends in antimicrobial resistance patterns of *Salmonella*: a five-year retrospective analysis // Foodborne Pathogens and Disease. 2021. Vol. 18. № 2. P. 63–84.
2. Li J., Li Y., Song N., Chen Y. Molecular epidemiology and risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in Eastern China // Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2020. Vol. 21. P. 306–313.
3. Paczosa M.K., Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2016. Vol. 80. № 3. P. 629–661.
4. Whitfield C., Trent M.S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides // Annual Review of Biochemistry. 2014. Vol. 83. P. 99–128.
5. Zhang X., Li C., Wang Y. et al. PhoE as a potential vaccine candidate against *Klebsiella pneumoniae* infections // Vaccine. 2022. Vol. 40. № 12. P. 1785–1793.

УДК 543.544 DOI: http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-2-30-32

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО СЛИТОГО ПОЛИПЕПТИДА ИЗ КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ДЕНГЕ

В.С. Лемешева, Д.Н. Поляков, Н.С. Савельев, Ю.В. Плетюхина, С.О. Рабдано

ФГБУ СПбНИИВС ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Капсидный белок вируса денге (С-белок) представляет собой высокоосно́вный нуклеопротеин, образующий гомо-олигомеры, способные к неспецифичному связыванию ДНК и РНК. В жизненном цикле вируса С-белок ответственен за упаковку и сохранность геномной РНК и формирование нуклеокапсида [1]. Благодаря своим структурным и антигенным свойствам он рассматривается как перспективный объект для создания вакцин и фундаментальных исследований [2]. Экспрессия рекомбинантных белков в *Escherichia coli* является доступной и эффективной системой получения субъединичных вакцинных антигенов, однако склонность капсидных белков к комплексообразованию и связыванию нуклеиновых кислот (НК) существенно усложняет процесс очистки [2-5]. В связи с этим актуальной задачей является разработка оптимизированной технологии выделения и очистки высокоосно́вных белков. Для создания тетравалентной вакцины против всех четырех серотипов денге в качестве одного из белков-кандидатов была сконструирована химера, содержащая последовательности четырех белков капсида, и последовательность из шести гистидинов на С-конце (His-тег). Получившийся белок обладает положительным зарядом, высоким сродством к обоим типам НК и имеет тенденцию к самосборке. Целью данного исследования является разработка технологии выделения и очистки созданного рекомбинантного слитого полипептида из капсидных белков вируса денге. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Оценка расчетных характеристик белка по его аминокислотной последовательности.
2. Подбор условий разрушения биомассы *E. coli*, содержащей целевой белок.
3. Оптимизация условий осаждения сульфатом аммония.
4. Тестирование доступных хроматографических подходов (SEC, IEX, IMAC, HIC).
5. Оценка вклад добавок/солей/нуклеаз, а также типа и параметров хроматографирования.

Разработка технологии выделения и очистки производилась с использованием биомассы клеток *E.coli*, содержащих целевой белок, наработанной при помощи биореактора. Разрушение биомассы осуществляли при помощи дезинтегратора под давлением Lab Homogenizer Panda Plus 1000 GEA.

Расчетные характеристики полипротеина, полученные при помощи ресурсов ProtParam (https://protparam.net/) и ProtPI (https://www.protpi.ch/) показали большое количество осно́вных и гидрофобных групп. При этом, отрицательное значение индекса GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) указывает на высокую гидрофильность белка. Расчетная масса белка составила 46,7 кДа, pI 13, а заряд при pH 7,4 равен +90,5.

Подбор условий разрушения биомассы показал, что белок имеет растворимую форму и преимущественно находится в надосадочной жидкости после осаждения клеточного дебриса. Тестировались буферы на основе Tris-HCl и фосфатно-солевые. Высокое содержание NaCl (до 1 М) в составе буфера для разрушения не улучшает растворимость, а добавление $MgCl_2$ (до 8 мМ) и/или EDTA (до 5 мМ) не влияет на поведение нуклеопротеинового комплекса в растворе, например, при осаждении сульфатом аммония и при хроматографировании. Наиболее удачным, с точки зрения последующих этапов очистки, оказался буфер, содержащий Tris-HCl 50 мМ, pH 8.