

УДК 573.6.086.83:577.21:[615.373.3+615.277]

М.А. ЖУЧЕНКО^{1,*}, Н.А. ШАМОНОВ¹, М.В. СЕРЕБРЯКОВА^{1,2}, С.А. ЧЕРЕПУШКИН¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» («ГосНИИгенетика»), Москва, 117545

²Научно исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва

e-mail: axiflipper@gmail.com

Выделение и идентификация гибридного рекомбинантного онкопротеина E7 вируса папилломы человека 16 типа, конъюгированного с белком теплового шока 70

Ген рекомбинантного онкопротеина E7 вируса папилломы человека 16 типа, конъюгированного с белком теплового шока 70 (E7(16)-БТШ70), был экспрессирован в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для получения целевого белка, его первичной идентификации и установления его подлинности был проведен ряд хроматографических выделений. Использование металл-хелатной хроматографии было основано на избирательном связывании активных групп сорбентов с полигистидиновым фрагментом на С-конце полипептидной последовательности целевого белка, в то время как применение аффинной хроматографии — на ассоциации с АТР-связывающими регионами E7 и БТШ70. Степень чистоты целевого белка после обеих процедур не превысила 70%, что указывает на наличие множества низкомолекулярных примесей и продуктов олигомеризации целевой молекулы. Проведение хроматографической очистки в денатурирующих условиях с использованием сильных восстанавливающих агентов позволило выделить целевой белок, содержание мономера в котором превысило 97%. Посредством иммуноблоттинга и электрофореза была установлена подлинность целевого белка, масс-спектрометрическим методом было показано соответствие его первичной структуры заявленной последовательности.

Ключевые слова: белок теплового шока, вакцина, вирус папилломы человека.

Группа вирусов папилломы человека (ВПЧ) включает свыше 100 различных типов вирусов [1, 2]; более 20 из них инфицируют гениталии и слизистую ануса [3].

Установлено, что ВПЧ 16-го и 18-го типов служат основным провоцирующим фактором в развитии некоторых форм рака, в частности, рака шейки матки, аденокарциномы, рака влагалища, полового члена и др. [4, 5].

Терапия заболеваний, вызываемых ВПЧ, на сегодняшний день осуществляется биосинтетическими вакцинами, состоящими из пептидных фрагментов, синтезированных из аминокислот; эти фрагменты соответствуют аминокислотной последовательности тех структур вирусного белка, которые распознаются иммунной системой и вызывают иммунный ответ [6–9]. Использование одного или двух иммуногенных белков вместо

Жученко Максим Андреевич, Шамонов Николай Алексеевич, Серебрякова Марина Васильевна, Черепушкин Станислав Андреевич.

Список сокращений: БСА — бычий сывороточный альбумин, БТШ70 — белок теплового шока массой 70 кДа; ВПЧ — вирус папилломы человека; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ДТТ — дитиотреитол; трис-НСl — трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид; ТФУ — трифторуксусная кислота; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ЭФ в ПААГ — электрофорез в полиакриламидном геле; АДФ — аденозиндифосфорная кислота; АТР — аденозинтрифосфорная кислота; CR — консервативный регион; E7 — онкопротеин № 7 вируса папилломы человека; MS MALDI TOF — времяпролетная масс-спектрометрия в режиме матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации; PMSF — фенилметилсульфонилфторид, ppm (particles per million) — количество частиц на миллион; SB — натрий-боратный буферный раствор; SDS — додецилсульфат натрия; TBST — смесь трис(гидроксиметил)аминометанового буфера и полисорбата 20.

* Автор для переписки.

целого возбудителя обеспечивает формирование иммунитета при значительном снижении реактогенности вакцины и ее побочного действия [10, 11].

На сегодняшний день не существует терапевтической вакцины, используемой для лечения заболеваний аногенитальной области, вызванных ВПЧ 16-го и 18-го типов. В связи с этим мы решили создать гибридный белок, включение в состав которого онкопротеина E7 направлено на индукцию специфического иммунного ответа на ВПЧ, а использование последовательности БТШ70 связано с имеющейся информацией об иммуномодулирующих свойствах белков теплового шока [12—15].

Аминокислотную последовательность E7 можно условно разделить на три консервативных региона CR1, CR2 и CR3 [16, 17]. Первые два не имеют третичной структуры, в то время как CR3 автономно сворачивается в высоко структурированный цинк-связывающий домен с $\beta 1\beta 2\alpha 1\beta 3\alpha 2$ -топологией. Упорядоченная структура CR3-региона E7 опосредована димеризацией за счет гидрофобных контактов $\beta 2\beta 3'$ — участка антипараллельной внутримолекулярной β -складки и боковых аминокислотных цепей. Гидрофобные остатки составляют гидрофобное ядро каждого мономера; часть из них опосредуют внутримолекулярные контакты. Таким образом, димеризация приводит к образованию смежного гидрофобного ядра, в результате чего E7 представлен в растворе в виде димера [17—19].

Было показано, что E7 демонстрирует АТФ-зависимую шаперонную активность в отношении модельных белков [20, 21]. На основании имеющейся информации можно подытожить, что широкая специфичность E7 при взаимодействии с белками-субстратами может усложнить его очистку как за счет межмолекулярных взаимодействий типа E7 — субстрат, так и за счет сильного связывания с сорбентом при хроматографической очистке.

БТШ70, в свою очередь, также проявляет АТФ-шаперонную активность [22, 23]. Так, в реакциях фолдинга, опосредованных БТШ70, белки-субстраты подвергаются циклам связывания/высвобождения [24]. БТШ70 состоит из двух основных регионов: высоко консервативного N-концевого АТФ-зависимого региона и С-концевого региона, который также разделен на два участка: консервативный субстрат-связывающий регион и менее консервативный, сильно насыщенный гидрофобными участками С-концевой регион [22, 25, 26].

N-Концевая область БТШ70 состоит из двух больших глобулярных субдоменов, разделенных глубокой центральной расщелиной и соединенных двумя пересекающимися альфа-спиралями [22].

АТФ, связываясь с N-концевым регионом БТШ70, способен регулировать конформационные изменения на С-конце в месте нахождения связывающего региона, изменяя его сродство к субстрату [25].

Субстрат-связывающий регион БТШ70 обладает высокой аффинностью к коротким гидрофобным белковым последовательностям растянутой конформации, что определяется наличием у БТШ70 сегментов распознавания [27—29].

Таким образом, биохимическая активность БТШ70 близка к активности, описанной для E7: оба белка обладают АТФ-связывающими регионами, опосредующими сильные внутри- и межмолекулярные взаимодействия, а также субстрат-связывающими областями, обладающими аффинностью к коротким гидрофобным фрагментам. Эти обстоятельства могут служить отправной точкой для выбора стратегии и условий очистки данных целевых белков. В литературе имеется информация о выделении и очистке БТШ70 и E7 [30], однако, в данной работе предстояло еще доказать, что искомая гибридная молекула обладает физико-химическими и биологическими свойствами, схожими со свойствами составляющих ее частей.

Целью настоящего исследования является подтверждение гипотезы о шаперонной активности гибридной молекулы E7(16)-БТШ70 и ее выделение для изучения профиля примесей в препарате и установления подлинности полученного белка.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве исходного сырья использовали клеточный лизат штамма *Saccharomyces cerevisiae* SCR-702-E7(16)-HSP70 («ГосНИИгенетика»). Культивирование штаммов-продуцентов проводили в ферментере Biostat C30 (ВВІ, Германия). В ходе процесса культивирования в среду асептически вносили подпитки — стерильные растворы сахарозы (Panreac), глюкозы (Panreac), глицерина (Panreac), дрожжевого экстракта (Sigma-Aldrich), казаминовых кислот (BD Vacto), фосфатов (Sigma-Aldrich). Биомассу продуцента диспергировали в лизирующем буфере ЛБ (100 мМ трис-НСІ (AppliChem), рН 8,0, 30 мМ имидазол (Panreac), 500 мМ NaCl, 4 М мочевины (Panreac), 0,1 % полисорбата 20 (Panreac), 1 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich), 5 мМ дитиотреитол (Panreac), 2 мМ PMSF (Sigma-Aldrich), рН 8,0). Суспензию клеток разрушали в дезинтеграторе APV 1000 (APV, Дания). Общее число необходимых циклов дезинтеграции определялось по результатам фазово-контрастной микроскопии (Carl Zeiss Axiostar, Германия) (не менее 95% клеток должно было быть разрушено).

Металл-хелат-аффинная хроматография на сорбенте IMAC 6 FF

Хроматографическую очистку проводили в системе АКТА Purifier 100 со встроенным УФ-детектором (GE Healthcare, Швеция) при температуре 2—8°. В качестве металл-хелат-аффинного сорбента использовали хроматографический сорбент IMAC 6 FF (GE Healthcare).

Колонну диаметром 50 мм и высотой 200 мм уравнивали буферным раствором IMAC A (20 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, 10 mM L-глутатион, 0,1 % полисорбата 20, pH 8,0) со скоростью 25 мл/мин.

В предварительно профильтрованный лизат дрожжевых клеток, полученный в процессе дезинтеграции биомассы [31], добавляли глицерин до конечной концентрации 10%. Полученный раствор наносили на колонну при скорости потока 25 мл/мин; колонну затем промывали 2 л буферного раствора IMAC A.

Элюцию с колонны осуществляли градиентом концентрации от 0 до 60% буферного раствора IMAC B (20 mM трис-HCl, pH 8,0, 500 mM имидазол, 500 mM NaCl, 10 mM L-глутатион, 1 mM ЭДТА, 10 % глицерина, 0,1 % полисорбата 20, pH 8,0) объемом 500 мл при скорости потока 25 мл/мин.

Детекцию осуществляли при длине волны 280 нм. Начиная с оптической плотности 0,030 ед. абсорбции собирали целевую фракцию.

Аффинная хроматография на АТР-сефарозе 4В

Синтез аффинного сорбента осуществляли с использованием бромциан-активированной сефарозы 4В (GE Healthcare, Швеция). Процесс активации матрицы раствором АТР проводили согласно инструкции компании-производителя.

Хроматографическую очистку осуществляли с использованием системы АКТА Purifier (GE, США) при температуре 2—8° на колонке диаметром 16 мм и высотой 100 мм.

В качестве подвижных фаз служили уравнивающий буферный раствор А (0,3 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM трис-HCl, pH 7,4), промывочный буферный раствор Б (5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 mM трис-HCl, pH 7,4) и элюирующий буферный раствор В (5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 mM трис-HCl, 20 mM АТР, pH 7,4).

В предварительно профильтрованный лизат дрожжевых клеток, полученный путем дезинтеграции биомассы, добавляли глицерин до конечной концентрации 10%. После нанесения раствора на аффинный сорбент уравнивающий буфер-

ным раствором А, сорбент с адсорбированным белком отмывали буферным раствором Б, а далее осуществляли градиентную элюцию целевого белка буферным раствором В.

Собирали фракции, содержащие целевой белок, начиная с оптической плотности 0,010 ед. абсорбции (λ280 нм).

Гель-электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез белкового препарата проводили по стандартной методике Лэммли в невозвращающихся условиях в 8 %-ном ПААГ с последующим окрашиванием Coomassie R250 (Sigma-Aldrich) или нитратом серебра (Sigma-Aldrich). В пробы, предназначенные для масс-спектрологии, добавляли 5 мкл 15 mM иодацетамида (AppliChem).

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Хроматографическое разделение белкового препарата проводили с использованием хроматографической системы Dionex UltiMate 3000 (Dionex, США) на колонке Superose 6 (размер колонки 300×10 мм) (GE Healthcare). Подачу элюента осуществляли в изократическом режиме со скоростью потока 0,5 мл/мин.

В качестве подвижной фазы использовали смесь 50 mM фосфата натрия и 150 mM NaCl, pH 7,0. Детекцию осуществляли при длине волны 210 нм. Температура колонки составляла 15—25°, а автосамплера — 4 ± 1°. Нагрузка по белку на колонку была равна 20 мкг.

Времяпролетная масс-спектрология в режиме матрично-активированной лазерной десорбции (MALDI) и ионизации

Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле. После проведения электрофоретического разделения содержащий примесные белки фрагмент ПААГ размером 3—4 мм², окрашенный Coomassie R250, в стерильных условиях извлекали пинцетом и помещали в пробирку. Для удаления красителя фрагмент дважды промывали в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила (Panreac) в 0,1 M NH₄HCO₃ (Panreac) в течение 20 мин при 37°. После удаления раствора добавляли 100 мкл ацетонитрила и дегидратацию геля проводили в течение 30 мин. Удалив ацетонитрил и высушив фрагмент геля, добавляли 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega, США) в 0,05 M NH₄HCO₃ (Panreac) в концентрации 15 мкг/мл.

Гидролиз белка проводили в течение 16 ч при 37°, затем для завершения гидролиза к раствору добавляли 7 мкл 0,5 %-ной ТФУ (Panreac) в 10%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Для проведения масс-спектрометрии смешивали 2 мкл раствора образца и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (Aldrich, 10 мг/мл в 20%-ном водном ацетонитриле + 0,5% ТФУ); полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme (BrukerDaltonics, Германия), оснащенном ультрафиолетовым лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,005 % (50 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 600—5000 m/z, выбирая мощность лазера, способствующую достижению наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора; точность измерения фрагментных ионов была не ниже 1 Да.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры обрабатывали с использованием программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). При помощи программы Mascot (опция «Пептидный фингерпринт») проводили поиск в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной выше точностью и с учетом возможных окисления метионинов кислородом воздуха и модификации цистеинов иодоацетамидом или акриламидом геля. Данные анализа кандидатных белков с коэффициентом достоверности >87 в базе данных NCBI считали надежными (p<0,05). Также были получены спектры фрагментации отдельных пептидов. С использованием программного обеспечения Biotools 3.3 (Bruker Daltonics) проведен поиск по объединенным MS+MS/MS-результатам.

Определение специфичности и чувствительности антител к белку E7(16)-БТШ70 методом иммуноблоттинга

Раствор белка E7(16)-БТШ70 разводили водой до концентрации 0,02 мг/мл. К 20 мкл образца добавляли 20 мкл двукратного буфера для образцов с или без ДТТ, инкубировали 5 мин при 100° и образцы наносили на гель. Электрофорез проводили в 8%-ном ПААГ при напряжении 200 В, силе тока 0,4 А в течение 40 мин, после чего осуществ-

ляли полусухой перенос на нитроцеллюлозную мембрану при напряжении 15 В, силе тока 2 А в течение 45 мин. Мембраны блокировали 3 %-ным БСА в буфере TBST (50 мМ трис-НСl, 150 мМ NaCl, 0,1% полисорбата 20, pH 7,6) с 1 мМ MgCl₂ и выдерживали в течение ночи при 4°.

Мембраны инкубировали с первичными антителами (концентрация 5 мкг/мл) к E7(16) (Mab 716-332, HyTest, Финляндия) и белку теплового шока (Mab TS29, HyTest, Финляндия) в 1 %-ном БСА (в TBST с MgCl₂) в течение 2 ч при 37°, после чего производили их отмывку в TBST с MgCl₂.

Инкубацию с вторичными антителами (Anti-Mouse IgG, A3562, Sigma, разведение 1:5000) в 1 %-ном БСА (в TBST с MgCl₂) проводили в течение 1 ч при 37°, после чего мембраны отмывали TBST с MgCl₂.

Инкубацию с субстратом для щелочной фосфатазы (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT tablet) продолжали до появления окрашивания, но не более 5 мин. Фотосъемку гелей осуществляли с помощью системы для документирования гелей G-Box Chemix XR5 (Syngene); результаты обрабатывали в программе GeneTools.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Очистку лизата проводили, принимая во внимание структурные особенности как белков E7 и БТШ70 по отдельности, так и гибридной молекулы. Наличие АТР-связывающих регионов E7 и БТШ стало причиной проведения хроматографии на аффинной колонне, активированной АТР. Закодированный на этапе разработки генетической конструкции полигистидиновый регион в последовательности E7(16)-БТШ70 предназначался для избирательного связывания целевой молекулы с никелем металл-хелатной колонны. Чистота фракций элюата E7(16)-БТШ70, собранных после очистки на металл-хелатной колонне, была оценена с помощью электрофореза с окрашиванием серебром в невозстанавливающих условиях. Электрофореграмма фракции элюата с наибольшим содержанием мономера целевого белка в различных разведениях приведена на рис 1. Наряду с целевым белком на электрофореграмме видны полосы как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных примесей, вероятно, представленных продуктами олигомеризации мономера E7(16)-БТШ70. Чистота мономера не превышает 70%.

Результаты оценки чистоты элюатов, полученных после очистки на аффинной колонне, активированной АТР, схожи с данными, полученными для металл-хелатной хроматографии (данные не приведены).

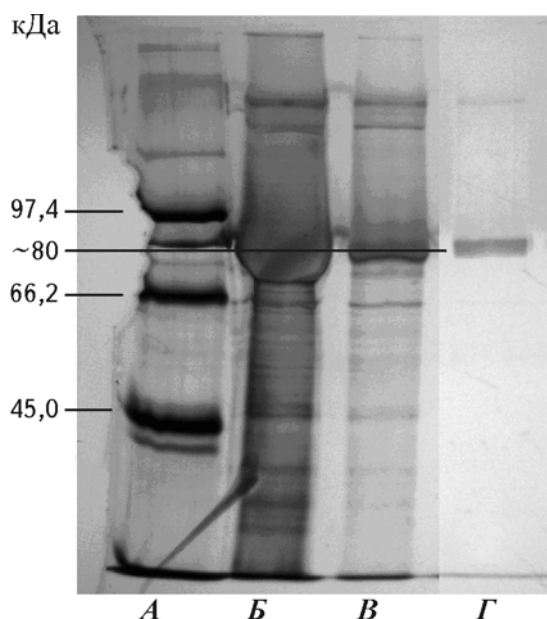


Рис. 1. Электрофореграмма фракции E7(16)-БТШ70 после металл-хелат-аффинной хроматографии. А — маркеры молекулярной массы (Bio-Rad); нагрузка: Б — 10 мкг белка; В — 1000 нг белка; Г — 15 нг белка. Сплошной чертой отмечена полоса целевого гибридного белка E7(16)-БТШ70

Наличие большого количества низкомолекулярных примесей в хроматографических фракциях при очистке может быть обусловлено как крайней нестабильностью белка, приводящей к его деградации в растворе в результате гидролиза, так и его склонностью к взаимодействию с короткими пептидами гидрофобной природы, способными накапливаться в лизате при дезинтеграции биомассы.

Профиль примесей был идентифицирован с помощью MS MALDI TOF. Образцы примесей получали путем электрофореза в ПААГ с последующей

окраской кумасси. Окрашенные фрагменты геля, соответствующие разделенным по подвижности фрагментам белка, извлекали и анализировали.

Было установлено, что примеси E7(16)-БТШ70 представлены фрагментами целевого белка совместно с фрагментами белков штамма-продуцента. При анализе пептидов, не соответствующих исходной аминокислотной последовательности E7(16)-БТШ70, были обнаружены такие белки штамма *Saccharomyces cerevisiae*, как фактор элонгации трансляции 1-альфа (TEF1 α), рибосомные протеины L26bp и 33b, гликогенные ферменты дрожжей UGP1p, UTP1p и др. Коэффициент достоверности превышал значение 87, результат был определен надежно ($p < 0,05$). Полученные данные могут подтвердить выдвинутое предположение о шаперонной активности гибридной молекулы, препятствующей очистке от низкомолекулярных примесей.

Для получения фракции мономера со степенью чистоты более 97% было решено использовать восстанавливающие агенты и проводить хроматографическую очистку в денатурирующих условиях. Агенты добавляли в исходный материал. Скрининг осуществляли методом эксклюзионной хроматографии за счет отличий в профиле элюции исследуемых образцов. Ранее было определено, что время удерживания пика гибридного белка составляет от 31 до 32 мин (данные не приведены).

В эксперименте изучали влияние следующих восстанавливающих и денатурирующих агентов: 30 мМ L-глутатиона восстановленного (AppliChem); 30 мМ L-цистина (Panreac); 0,01% полисорбата 80 (Panreac); 0,3% натрия додецилсульфата (SDS) (Sigma-Aldrich); 40 мМ дитиотреитола (ДТТ), и их комбинаций. Результаты отражены на рис. 2.

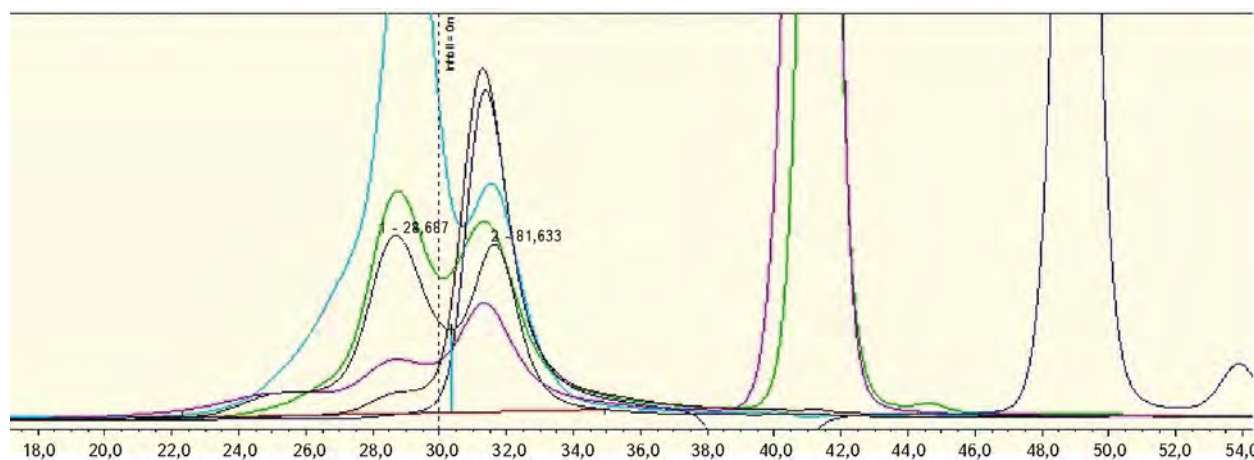


Рис. 2. Профиль элюции эксклюзионной ВЭЖХ гибридного белка E7(16)-БТШ70, полученный при использовании различных восстанавливающих агентов: черный — исходный образец, стандарт сравнения E7-БТШ70; розовый — с использованием L-глутатиона восстановленного; зеленый — с использованием цистина; голубой — с использованием полисорбата 80; коричневый — с использованием SDS; синий — с использованием SDS+ДТТ

Полное восстановление мономера достигается при совместном использовании SDS и ДТТ. Для оценки идентичности целевого белка были собраны и проанализированы фракции элюата, предварительно обработанного SDS и ДТТ. Результат контроля чистоты элюата (для нивелирования эффекта разбавления сконцентрированного до концентрации исходного материала) приведены на рис. 3.

Результат электрофоретического разделения показал, что предварительная совместная обработка SDS + ДТТ приводит к значительному сокращению количества низкомолекулярных примесей и продуктов олигомеризации, что позволяет добиться степени чистоты мономера, равной 97,5%. В качестве дополнительных методов контроля полученной фракции E7(16)-БТШ70 были использованы MS MALDI TOF, опция «пептидный фингерпринт» — определение аминокислотной последовательности искомого белка и иммуноблоттинг с окраской специфичными к E7 и БТШ70 антителами (оценка подлинности).

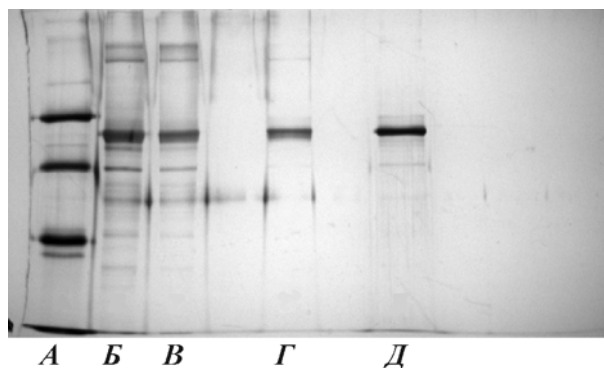


Рис. 3. Профиль электрофоретического разделения элюата мономера E7(16)-БТШ70: А — маркеры молекулярной массы (Bio-Rad); Б — E7-БТШ70 до разделения, нагрузка 500 нг; В — E7-БТШ70 до разделения, нагрузка 250 нг; Г — элюат мономера E7-БТШ70 без добавления ДТТ; Д — элюат мономера E7-БТШ70 с добавлением ДТТ

Элюат мономера подвергли триптическому гидролизу, после чего был снят масс-спектр. Спектрограмма триптического гидролизата E7(16)-БТШ70 представлена на рис. 4. В качестве критериев

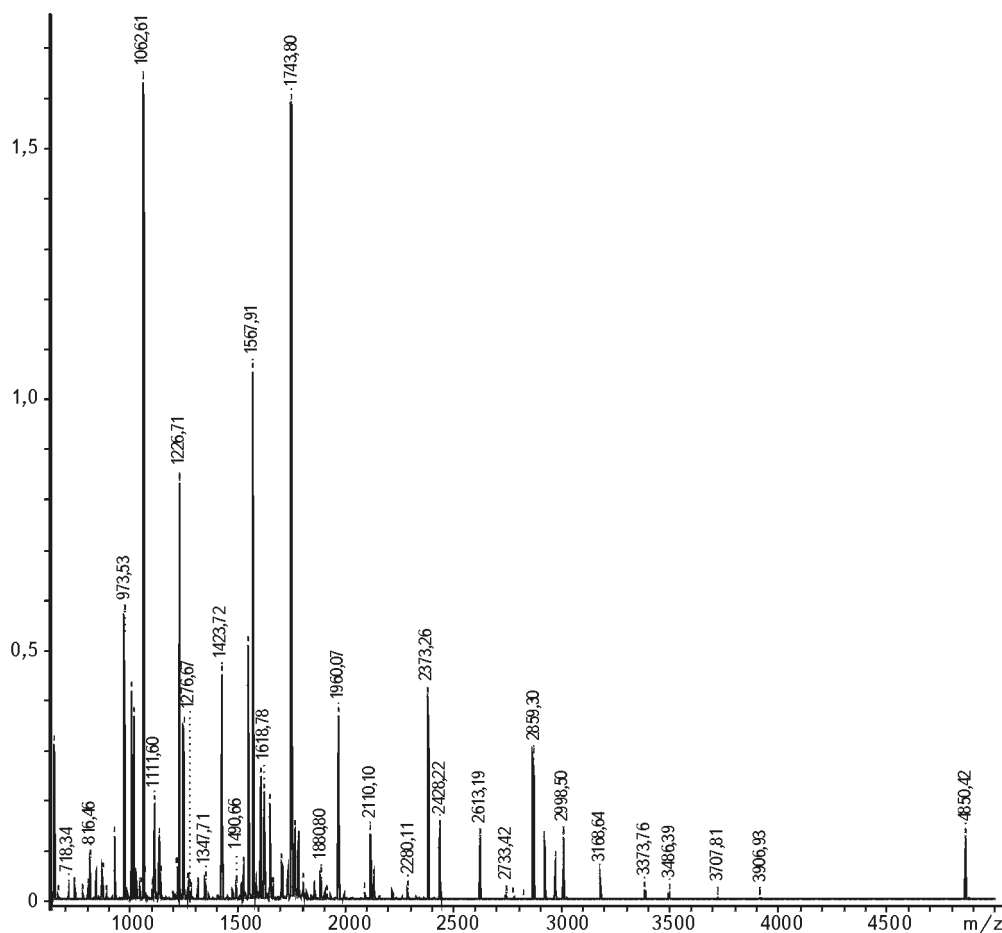


Рис. 4. Масс-спектрограмма триптического гидролизата белка E7(16)-БТШ70

Коэффициенты достоверности кандидатных пептидов

Наименование кандидатного пептида	Масса, Да	Коэффициент достоверности
E7(16)-БТШ70	77323	431
QTmC888	13348	40
QTmBt5363.1	10529	39
SQGLEAN_13326	38266	38
QTmBt9472.2	28736	36
QTmC2222_1	8858	32
QTmBt1914.1	8740	32
QTmBt5963	9596	32
QTmC380	9596	32
QTmC6277	7768	32
QTmC1784_1	3002	32
QTmBt7193	4483	31
Lavysh_85_hypothetical_protein_56146-56334r_MW-6982	6978	31
QTmBt3980.1	17176	28
QTmC2269	2829	27
QTmBt3702	1407	26
QTmC3812	1407	26
QTmBt8020.2	20864	26
QTmC10946	23621	26
QTmBt6231.1	8900	26

достоверности опции «пептидный фингерпринт» были выбраны следующие: количество совпавших пептидов в составе одного белка, перекрытие совпавшими пептидами последовательности белка.

Ближайшее совпадение представлено заявленной аминокислотной последовательностью E7(16)-БТШ70, перекрытие последовательности составило 73%, коэффициент достоверности — 413, что означает, что результат определен надежно ($p < 0,05$). Все остальные кандидатные пептиды обладают коэффициентом достоверности, не превышающим 40, перекрытие последовательности составило менее 10%. 20 кандидатов, представленных в порядке убывания достоверности поиска, приведены в таблице.

Специфичность и чувствительность антител к белку E7(16) и БТШ70 были доказаны методом иммуноблотинга с использованием антител к E7(16) (Mab 716-332) и к БТШ70 (Mab TS29). Фотографии мембраны, окрашенной антителами к

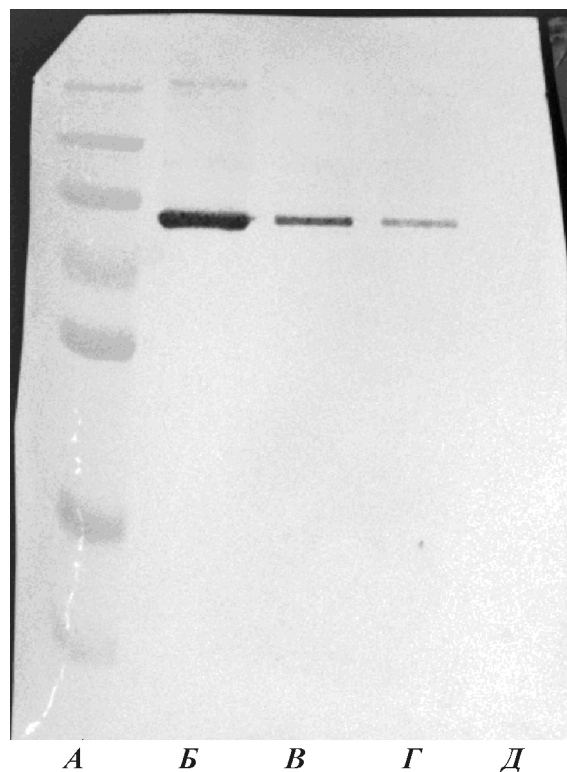


Рис. 5. Результаты иммуноблотинга гибридного белка E7(16)-БТШ70 с антителами к E7(16): А — маркеры; нагрузка по белку: Б — 250 нг; В — 50 нг, Г — 25 нг; Д — 5 нг

E7(16), приведены на рис. 5, а антителами к БТШ70 — на рис. 6. Предел обнаружения для Mab 716-332 составил 5 нг, для Mab TS29 эту величину не оценивали. Результаты иммуноблотинга показывают строгую специфичность связывания E7(16)-БТШ70 с соответствующими антигенами.

Таким образом, попытки получения рекомбинантного белка E7(16)-БТШ70 посредством никель-хелатной и аффинной хроматографии не позволили очистить целевой белок от примесей; измеренная степень его чистоты не превышала 70%. Изучение профиля примесей в препарате позволило предположить, что после проведения хроматографической очистки белковые фракции содержали продукты деградации целевого белка и фрагменты белков штамма-производителя *Saccharomyces cerevisiae*. Наличие примесных пептидов, по-видимому, обусловлено шаперонной активностью онкопротеина E7 и белка теплового шока 70.

Обработка восстанавливающими агентами и SDS перед разделением пробы с помощью эксклюзионной хроматографии показала, что профиль элюции зависит от типа используемых агентов; совместное использование SDS и ДТТ способствует переходу белка в мономерное, не связанное с примесными белками состояние. Полученная фракция

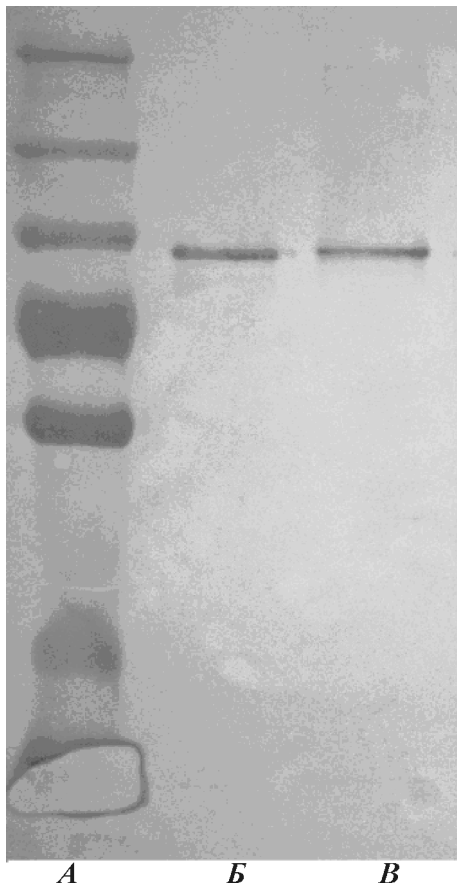


Рис. 6. Результаты иммуноблотинга гибридного белка E7(16)-BTШ70 с антителами к БТШ70; А - маркеры, Б, В — нагрузка 100 нг

мономера была проанализирована для определения подлинности.

Степень чистоты мономера, определенная методом электрофореза в ПААГ с окраской серебром, составила 97,5%; аминокислотная последовательность, определенная масс-спектрометрическим методом, с высокой достоверностью соответствует заявленной. Подлинность полученного гибридного белка была доказана также методом иммуноблотинга как результат специфического связывания E7(16)-BTШ70 с антителами к E7 и БТШ70.

Приведенная методика выделения подходит исключительно для первичной идентификации целевого белка и установления его подлинности. Методику также можно использовать для получения стандартного образца предприятия. Использование SDS и ДТТ при хроматографической очистке не приемлемо в промышленном масштабе из-за ограничений, связанных с высокой токсичностью реагентов при парентеральном пути введения разрабатываемой вакцины. Тем не менее, проведенные работы показывают необходимость дальнейшего использования денатурирующих условий при

очистке белка. Работы с гибридными молекулами E7-BTШ70 будут продолжены.

Получено 23.01.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bosch, F.X.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer / F.X. Bosch, A. Lorincz, N. Muñoz, C.J.L.M. Meijer, K.V. Shah // *J. Clin. Pathol.* — 2002. — V. 244. — P. 55—65.
2. *Cogliano, V.* Carcinogenicity of human papillomaviruses / V. Cogliano, R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi // *Lancet Oncol.* — 2005. — V. 6. — P. 204.
3. World Health Organization. Human papillomavirus infection and cervical cancer. — 2004, http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/
4. *Goodman, A.* Primary vaginal cancer // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* — 1998. — V. 7(2). — P. 347—361.
5. *Zhou, J.* Expression of vaccinia recombinant HPV16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles // *Virology.* — 1991. — V. 5. — P. 21.
6. *Le Tallec, D.* The GSK HPV-16/HPV-18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine, demonstrates stability upon long-term storage and under simulated cold chain break conditions / D. Le Tallec, D. Doucet, T.M. Cervarix // *Human Vaccines.* — 2009. — V. 5. — N. 7. — P. 467—474.
7. GlaxoSmithKline Inc., PRODUCT MONOGRAPH CERVARIX® Human Papillomavirus vaccine Types 16 and 18 (Recombinant, AS04 adjuvanted), 2012. <http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/product-monographs/Cervarix.pdf>
8. Merck, GlaxoSmithKline Inc., PRODUCT MONOGRAPH GARDASIL® Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine, 2012. http://www.merck.ca/assets/en/pdf/products/GARDASIL-PM_E.pdf
9. *McLemore, M.R.* Gardasil®: introducing the new Human papillomavirus vaccine // *Clin. J. Oncol. Nursing.* — 2006. — V. 10(5). — P. 559—560.
10. *Giannini, S.L.* Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only / S.L. Giannini, E. Hanon, P. Moris, M. Van Mechelen, S. Morel, F. Dessy, M.A. Fourneau, B. Colau, J. Suzich, G. Losonksy, M.T. Martin, G. Dubin, M.A. Wetten-dorff // *Vaccine.* — 2006. — V. 24 (5937). — P. 49.
11. *Harper, D.M.* Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial / D.M. Harper, E.L. Franco, C. Wheeler, D.G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind, T. Zahaf, B. Innis, P. Naud, N.S. De Carvalho, C.M. Roteli-Martins, J. Teixeira, M.M. Blatter, A.P. Kom, W. Quint, G. Dubin // *Lancet.* — 2004. — V. 364(1757). — P. 65.
12. *Ma, Jia-Hai.* Heat shock protein 70/MAGE-3 fusion protein vaccine can enhance cellular and humoral immune responses to MAGE-3 in vivo / Jia-Hai Ma, Yan-Fang Sui, Jing Ye, Ya-Yu Huang, Zeng-Shan Li, Guang-Sheng Chen, Ping Qu Hong-Ping Song, Xiu-Min Zhang // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2005. — V. 54. — P. 907—914.

