

Эффективность иммобилизации pMCT на геле гидроксида алюминия в вакцинах для иммунизации

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания
животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»
Боровск, Калужская обл., РФ*

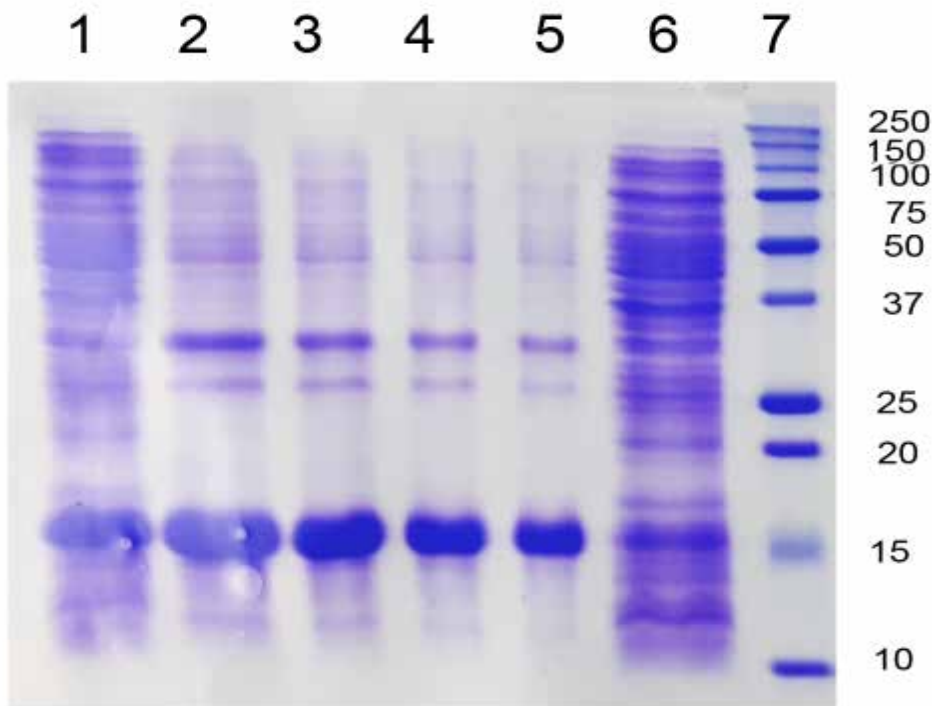
Колоскова Е.М.

XVII научно-практическая конференция
«Научные основы устойчивого развития сельскохозяйственного производства в
современных условиях»

с. Калужская опытная с/х станция
12 апреля 2023 года.

ПААГ электрофорез (15%ПААГ, 1% SDS) рМСТ, выделенного из биомассы *E. coli* BL21 (DE3)/ *pET28rMSTN*.

Дор.7 – маркер белковых масс.



Содержание рМСТ в объединенных фракциях (2-5) для иммунизации - 11,3 мг/мл.

(Выход РБ - 75 мг /1 л бакт. культуры)

Вакцина: раствор рМСТ (2 мг/мл в буфере с 4 М мочевиной) смешивали с равным объемом геля гидроокиси алюминия (ГА) (Щелковский биокомбинат).

Доза: 1 мг рМСТ/голову (1 мл суспензии).

Иммунизация:

Вакцина — препарат биологического происхождения, обеспечивающий организму появление приобретённого иммунитета к конкретному антигену.

Вакцина = Антиген + Адъювант

Антиген - рекомбинантный миостатин

Адъювант — гидроксид алюминия (ГА)

Для справки:

Адъювант- вещество, которое добавляют в вакцину для улучшения иммунной реакции организма, дает иммунной системе сигнал к выработке антител даже при отсутствии реальной инфекции. При этом можно уменьшить дозу антигена.

Адъюванты имитируют специфические наборы эволюционно консервативных молекул, ассоциированных с патогенами (липополисахариды, компоненты клеточных стенок бактерий, нуклеиновые кислоты после эндоцитоза и пр.).

Адъювант усиливает активности дендритных клеток, лимфоцитов и макрофагов путем имитации естественной инфекции.

Типы адъювантов (по происхождению)

Неорганические соединения: *соединения алюминия* (соли, гидроксид), соединения кальция

Масла: парафиновое масло, прополис, сквален.

Бактериальные препараты: убитые бактерии, модифицированная форма бактериального липида А белка (используется в нескольких вакцинах).

Растительные: сапонины

Цитокины: IL-1, IL-2, IL-12

Олигонуклеотиды

Комбинированные : *Полный адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда*

Полный адъювант Фрейнда (ПАФ) - раствор/суспензия инаktivированных *микобактерий туберкулеза* в минеральном масле (1930 год). Небезопасен для использования.

Неполный адъювант Фрейнда (НАФ) - масло в воде. Эмульсия пролонгирует выделение антигенов

Гидроксид алюминия, фосфат алюминия и квасцы - основные формы алюминия, используемые в качестве адъювантов.

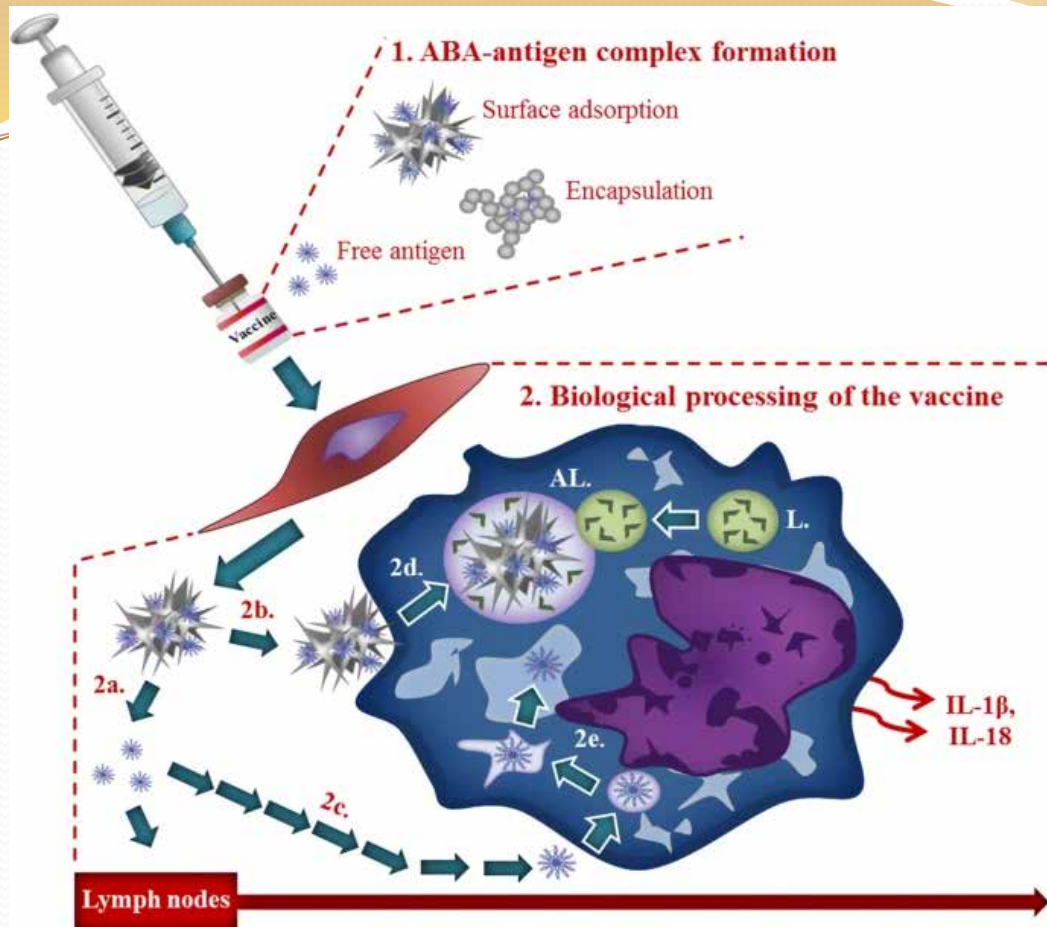
Возможные механизмы действия:

- способность адсорбировать антигены, депо антигенов
- активация системы комплемента, эозинофилов, макрофагов, дендритных клеток, профагоцитарного эффекта
- активация провоспалительного пути: продукция цитокинов (IL-1 β , IL-18).

Факторы, оказывающие влияние на реакции:

- скорость и сила адсорбции,
- размер и однородность частиц (наночастицы эффективнее микрочастиц),
- дозировка адъюванта и природа антигенов.

Адъюванты на основе ГА преимущественно стимулируют иммунные реакции Th2-типа (гуморальный иммунный ответ – антитела) , но в зависимости от способа вакцинации могут усиливать как Th1 (клеточный ответ – макрофаги и цитотоксические Т-клетки), так и Th2 клеточные реакции.



Shardlow, E., Mold, M. & Exley, C. Unraveling the enigma: elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. *Allergy Asthma Clin Immunol* **14**, 80 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0305-2>

Биопроцессинг: 1). Вакцина содержит АГ/ГА: АГ - поверхностный, включенный и, потенциально свободный АГ. 2). Процессинг компонентов вакцины: независимое перемещение АГ/ГА (<200 нм) в лимфатические узлы (2a); захват воспалительными моноцитами/макрофагами более крупных АГ/ГА - микропиноцитоз (2bс); внутриклеточные АГ либо обрабатываются лизосомальной системой (L), либо избегают захвата лизосомами через разрыв эндосомы (2e); АГ/ГА (адсорбированный или окклюзированный) - фагоцитоз (2b) – аутофагия (эндосомы созревают в аутофагосомы и аутолизосомы (AL) (2d). Активируются инфламасомы, высвобождаются провоспалительные цитокины $IL-1\beta$, $IL-18$

Схема иммунизации овец.

№ овцы	Адьювант, мкл	рМСТН 5мг/мл, мкл	ФР, мкл	Способ иммунизации
1	ПАФ, 700	200	200	подкожно
2	НАФ, 700	200	200	подкожно
3	Гель $Al(OH)_3$, 550	200	350	подкожно
4	Гель $Al(OH)_3$, 550	200	350	В/мышечно, бедро.

Примечание:

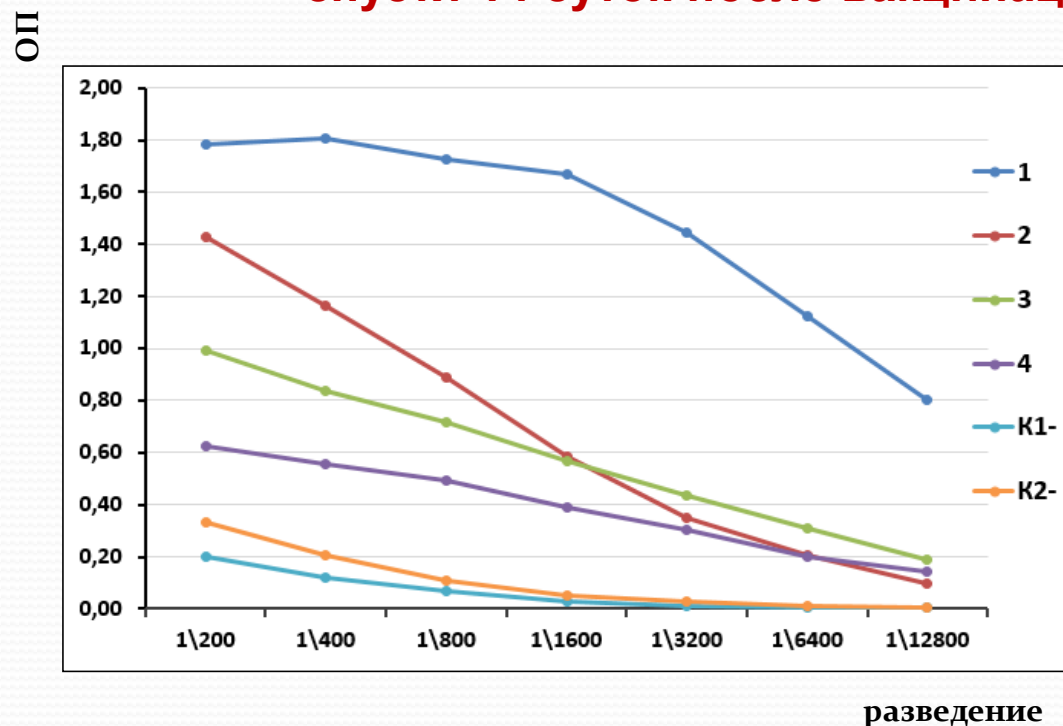
ПАФ – полный адьювант
Фрейнда
НАФ - неполный адьювант
Фрейнда,
ФР – физиологический
раствор

Справка:

Полный адьювант Фрейнда - применяется для изготовления водно-масляных эмульсий антигенов.

Приготовлен из неподдающих метаболизму масел. Каждая ампула 10 мл содержит 1,5 мл маннида моноолеат, 8,5 мл парафинового масла, а также 10 мг инактивированных, высушенных *Mycobacterium tuberculosis*.

Титр сывороток овец, иммунизированных рМСТ спустя 14 суток после вакцинации.



1 – иммунизация с ПАФ
2 - иммунизация с НАФ
3, 4 – иммунизация ГА
K1 , K2 -
неиммунизированные
овцы

Выводы:

- 1) оптимальное разведение сывороток для ИФА - 400-800 раз. ОП сывороток иммунизированных животных в 4-15 раз выше, чем у контрольных;
- 2) титр сывороток зависит от используемого адъюванта и места введения антигена (высокий титр – при п/к иммунизации с ПАФ, низкий – в/мышечно с гелем ГА);
- 3) рМСТ обладает иммуногенной активностью и может быть использован для иммунизации животных в составе вакцин в качестве антигена.

Цель эксперимента: проверить эффективность связывания рМСТ (Аг) с гелем ГА

Схема эксперимента:

Гомогенную вакцину (нагрузка по РБ – 1 мг/мл) ЦФ при 13,4 кrpm 10 5 минут:

Результат: прозрачный супер 0 (ПААГ ЭФ, дор.1) и осадок АГ/ГА (Осадок 1)

Супер 0: pH 5.

Варианты обработки АГ/ГА.

1. **Снятие хаотропом** Осадок 1 + 1 мл буфера С (20 мМТрис-Cl, 8М мочевины, 0,5М NaCl, 5 мМ имидазол, 5 мМ МЭ, pH 7,9). 3 часа при 37°C, регулярное перемешивание. Супер 1: pH 7-8.

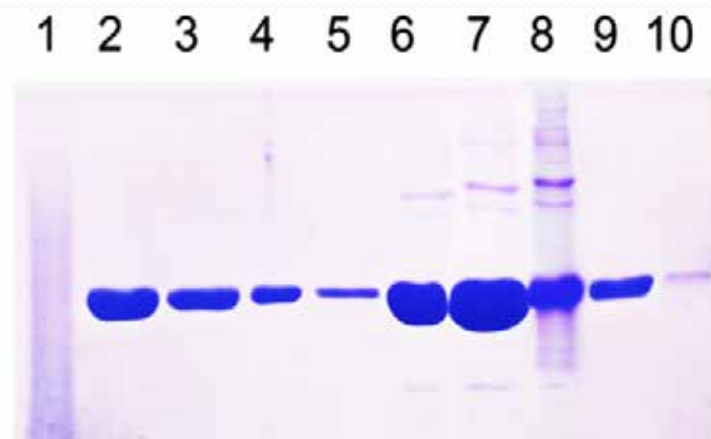
Осадок 2 + 1 мл 8М мочевины в H₂O. 1 час при 37°C, регулярное перемешивание. Быстро отстаивается. Супер 2: pH 7.

2. **Снятие детергентом.** Осадок 2-1 – осадок 2 после экстракции мочевиной, обработка SDS

3. **Растворение ГА.** Осадок 3 +0,9 мл H₂O+ 0,1 мл **УК** лед. 3 часа при 37°C, регулярное перемешивание. Не оседает. ЦФ при 13,4 кrpm 10 минут: прозрачный супер + белый осадок 20-30 мкл. Супер 3: pH 2-3.

Осадок 4 +0,9 мл H₂O+ 0,1 мл **HCl** конц.. Оседает. ЦФ при 13,4 кrpm 10 минут: прозрачный супер + белый осадок 20-30 мкл. Супер 4: pH 1-2.

Дорожка	Образец	Обработка
1	Супер 0	50 мкл +50 мкл 2хБО**
2	Супер 1 (буф.С)	50 мкл +50 мкл 2хБО
3	Супер 1 (буф.С)	12 мкл + 38 мкл ТЕ +50 мкл 2хБО
4	Супер 2 (мочевина)	50 мкл +50 мкл 2хБО
5	Супер 2 (мочевина)	12 мкл + 38 мкл ТЕ +50 мкл 2хБО
6	Осадок 2-1	50 мкл 1%SDS +50 мкл 2хБО
7	Осадок 2-1	50 мкл 1%SDS +50 мкл 2хБО
8	Маркер	раствор рМСТ для вакцины
9	Супер 3 (УК)*	12 мкл + 38 мкл ТЕ +50 мкл 2хБО
10	Супер 4 (HCl)*	12 мкл + 38 мкл ТЕ +50 мкл 2хБО



Выводы:

1. Весь белок (рМСТ) в вакцине находится в связанном состоянии с гидроксидом алюминия
2. Белок легко снимается с осадка детергентами (дор. 6,7)
3. Кроме целевого белка, связанного с ГА, в растворе содержится значительное количество компонентов, взаимодействующих с кумасси R-250 (1).

Спасибо за внимание!

