

УДК 57.084.1, 57.083.3, 571.27

DOI: 10.31040/2222-8349-2025-0-1-75-79

**ИММУНОГЕННОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА CtxB
ПРИ ПОДКОЖНОМ И ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ**

© Х. Жамгочян, М.С. Котлярова, М.С. Шумков, А.В. Гончаренко

В состав холерного токсина входит нетоксичная β -субъединица (белок CtxB), обеспечивающая взаимодействие токсина с клетками кишечного эпителия и в итоге приводящая к попаданию токсина внутрь клетки. Иммунный ответ на CtxB имеет важное значение для защиты от холеры, в связи с чем этот белок включается в состав противохолерных вакцин. Кроме того, известно, что использование холерного токсина и его субъединицы CtxB приводит к усиленному формированию мукозального иммунитета на совместно вводимые антигены, что обеспечивает возможность использования CtxB в качестве мукозального адъюванта.

В настоящей работе на модели мышей линии BALB/c проведена оценка формирования гуморального иммунного ответа на полученный ранее рекомбинантный белок CtxB. Показано, что иммунизация CtxB приводит к образованию антител как при пероральном, так и при подкожном введении. Они обнаруживаются и в сыворотке крови, и в кишечном лаваже, что свидетельствует о формировании как системного, так и мукозального иммунного ответа. Поскольку при иммунизации не использовались адъюванты, полученные результаты также указывают на возможность применения рекомбинантного CtxB в качестве эффективного «усилителя» иммунного ответа.

Ключевые слова: CtxB, рекомбинантный белок, иммунный ответ, антиген, адъювант.

Введение. Холерный токсин – сложная молекула, являющаяся главным фактором развития патологического процесса при инфицировании холерным вибрионом (*Vibrio cholerae*). Сорбция токсина на клетках эпителия кишечника осуществляется за счет его β -субъединицы (CtxB), которая сама по себе нетоксична [1] и успешно используется как компонент противохолерных вакцин (в частности, шведского препарата Dukoral).

Первичное прикрепление CtxB к энтероцитам обусловлено связыванием этого белка с рецептором GM1, который широко представлен не только на клетках кишечного эпителия, но и на поверхности антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток и В-клеток. Способность CtxB взаимодействовать с клетками иммунной системы лежит в основе использования β -субъединицы холерного токсина в качестве адъюванта и иммунорегулятора [2, 3].

Ранее мы создали систему гетерологичной экспрессии β -субъединицы холерного токсина в клетках *E. coli* и отработали алгоритм наработки этого белка [4]. В настоящей работе была впервые проведена оценка иммуногенности очищенного полипептида с целью определения возможности его применения в качестве компонента вакцинного препарата при подкожном и пероральном введении.

Материалы и методы.

Система экспрессии и способ очистки рекомбинантного белка CtxB. Система гетерологичной экспрессии гена β -субъединицы холерного токсина (CtxB) была создана нами ранее [4]. Она представляет собой штамм *E. coli* BL21 DE3, трансформированный плазмидой pET22b («Novagen», США), в которую под T7_{lac}-промотор клонирован ген *ctxB*, модифицированный таким образом, что его начальный

ЖАМГОЧЯН Хамесд, Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, e-mail: hamesdja22@gmail.com

КОТЛЯРОВА Мария Сергеевна – к.б.н., Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, e-mail: kotlyarovams@gmail.com

ШУМКОВ Михаил Сергеевич – к.б.н., Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, e-mail: shumkovm@gmail.com

ГОНЧАРЕНКО Анна Владимировна – к.б.н., Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, e-mail: pylaevanna@gmail.com

фрагмент, кодирующий лидерную последовательность, заменен на последовательность, кодирующую сигнал секреции белка внешней мембраны *E. coli* OmpA.

Наработка рекомбинантной β -субъединицы холерного токсина производилась при росте бактериальной культуры в среде M9 с глицерином при 25°C в течение 18 часов. Очистку CtxB осуществляли из культуральной жидкости методом металл-хелатной хроматографии [4].

Эксперименты с животными. Исследования на животных были одобрены Этическим комитетом ФИЦ Биотехнологии РАН.

Для оценки формирования иммунного ответа на рекомбинантный белок CtxB самки мышей линии BALB/c массой 18–20 г были 3-кратно с интервалом в 30 дней иммунизированы путем подкожного введения 100 мкг CtxB в 200 мкл стерильного PBS, pH=7.4 (группа CtxB п/к) либо перорально путем внутрижелудочного введения через зонд 100 мкг CtxB в карбонатном буфере, pH 8.75 (группа CtxB п/о). Животным контрольных групп подкожно либо перорально вводили буферные растворы без CtxB. На протяжении всего эксперимента проводили оценку динамики изменения веса иммунизированных животных. Через 4 недели после последней иммунизации мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации. Из полости сердца собирали кровь, инкубировали ее при комнатной температуре в течение 20 мин для формирования сгустка, затем центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин и 4°C. Надосадочную жидкость (сыворотку крови) переносили в новые пробирки и хранили при –20°C.

Кишечный лаваж собирали по методике, адаптированной из Lyske et al [5]. Тонкую кишку мыши вырезали, зажимали один конец хирургическим зажимом и заполняли 3 мл раствора ингибитора протеаз (ингибитор трипсина 0.1 мг/мл, 50 мМ ЭДТА и 1мМ PMSF в PBS, pH=7.4). Аналогичным образом зажимали другой конец кишки и проводили инкубацию в течение 10 минут при комнатной температуре. После этого содержимое кишки (кишечный лаваж) помещали в пробирку и центрифугировали 10 минут при 1800 об/мин и температуре 4°C. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и хранили при –20°C до проведения анализа.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Наличие антител к CtxB в сыворотке крови и ки-

шечном лаваже проверяли методом иммуноферментного анализа. Для этого в лунки 96-луночного иммунологического планшета (Совтех) вносили по 100 мкл CtxB (1 мкг/мл) в солевом фосфатном буферном растворе (PBS) pH 7.4 и инкубировали ночь при 4°C, после чего плашку отмывали PBS с добавлением 0.05% Tween 20 (PBS-Tween). Затем проводили инкубацию с блокирующим раствором (0.1% BSA в PBS) по 150 мкл на лунку в течение 2 часов при 37°C, отмывали плашку 3 раза PBS-Tween, вносили по 100 мкл анализируемых образцов (сывороток крови в разведении 1:400 и кишечных лаважей в разведении 1:20). В качестве положительного контроля использовали моноклональные антитела к CtxB (HyTest Кат. № 2C4) в разведении 1:1000. После инкубации в течение 2 ч при 25°C, лунки плашки промывали 3 раза PBS-Tween и инкубировали с козьими поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена HRP (HyTest Кат. № GAM) в течение 1 часа при 25°C. Планшеты трижды отмывали PBS-Tween и вносили по 100 мкл раствора хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ) (НВО ИММУНОТЕХ). Реакцию проводили в темноте при 25°C. Через 15 минут реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1М H₂SO₄. Измерение оптической плотности в лунках проводили на планшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) при 460 нм.

Статистическая обработка. Для оценки статистической значимости различий сравниваемых групп использовался дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим применением критерия Ньюмана-Кейлса.

Результаты и обсуждения. Холерный токсин и его β -субъединица (CtxB) являются мощными иммуногенами и адъювантами, которые могут стимулировать формирование иммунного ответа на слизистой оболочке как на сами белки, так и на совместно вводимые антигены, модулировать индукцию пероральной толерантности и стимулировать появление антител изотипа А (IgA) [6]. В настоящей работе мы провели оценку формирования специфического гуморального иммунного ответа при подкожной и пероральной иммунизации мышей линии BALB/c полученным ранее рекомбинантным белком CtxB [4]. Для перорального введения препарата использовался антацидный

буферный раствор позволяющий снизить кислотность среды в желудке экспериментальных животных и обеспечить лучшую сохранность антигена, что является общепринятой практикой при введении пероральных вакцин в виде суспензии, в частности, при использовании противохолерной вакцины Дюкорал [7]. Подкожное введение препарата осуществлялось в солевом фосфатном буфере (PBS), также хорошо совместимом с внутренней средой организма млекопитающих. В период иммунизации негативных изменений в состоянии и поведении животных отмечено не было, масса мышей разных групп различалась незначительно.

Анализ содержания антител к CtxB в сыворотке крови и кишечном лаваже иммунизированных животных, проведенный через 4 недели после последней вакцинации, продемонстрировал формирование системного иммунного ответа вне зависимости от пути введения рекомбинантного белка (рис.).

По результатам ИФА сыворотки крови (рис. а) в обеих группах животных, иммунизированных CtxB, полученные значения оптической плотности были выше, чем в контрольных группах ($p \leq 0.001$). При этом различия между животными, получавшими рекомбинантный белок подкожно и перорально, были незначительны ($p = 0.889$).

В кишечном лаваже иммунизированных мышей по результатам ИФА также обнаружено

статистически значимое накопление антител (рис. б). Однако в этом случае подкожное введение антигена способствовало формированию более выраженного гуморального иммунного ответа ($p = 0.0084$) в сравнении с пероральной иммунизацией.

Таким образом, полученный нами рекомбинантный белок CtxB вызывал появление антител у иммунизированных мышей как при подкожном, так и при пероральном его введении. Антитела были обнаружены и в сыворотке крови, и в кишечном лаваже, то есть развивался как генерализованный (системный), так и мукозальный гуморальный иммунный ответ.

Формирование иммунитета к CtxB уже способно обеспечить эффективную защиту организма при заражении холерой [8]. Однако еще более выраженный протективный эффект наблюдается при сочетании антигенов рекомбинантного CtxB с инактивированными клетками токсигенных штаммов *V. cholerae* [9]. В то же время, использование в качестве антигена является не единственным вариантом применения рекомбинантного CtxB. Например, была показана его роль как мукозального адьюванта [10]. Более того, как подтвердили наши эксперименты, CtxB способен вызывать иммунный ответ сам по себе, без использования «усилителей» иммунного ответа, что также указывает на возможность применения этого белка в качестве самостоятельного адьюванта [11].

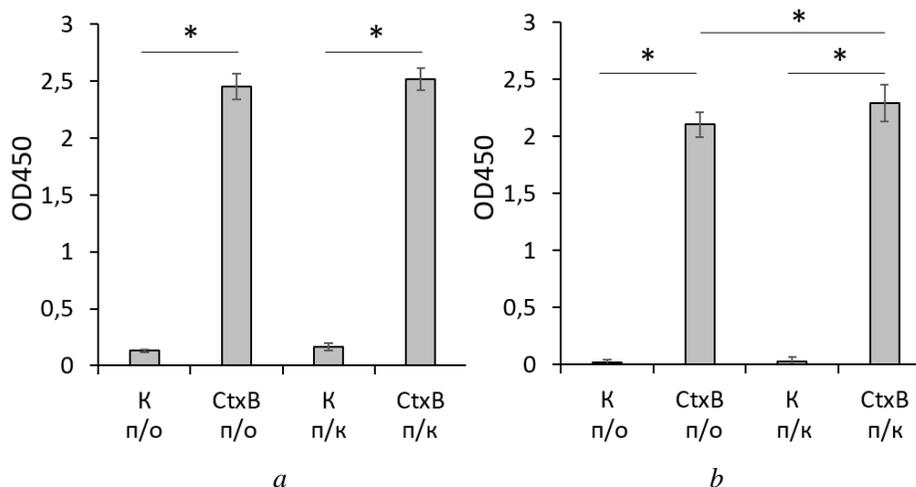


Рис. Результаты ИФА для определения присутствия антител к CtxB: а – в сыворотке крови, разведение образцов 1:500; б – в кишечном лаваже, разведение образцов 1:20. Животных иммунизировали подкожно (п/к) или перорально (п/о). Представлены результаты измерения оптической плотности при 450 нм (OD450). В качестве контроля (К) использован буферный раствор без антигена: PBS для подкожной иммунизации и карбонатный буферный раствор – для пероральной. Данные показаны в формате среднее \pm среднее квадратичное отклонение (SD). * – статистически значимые различия, $p \leq 0.05$

Поскольку CtxB эффективно взаимодействует с GM1-рецептором, его рассматривают, в первую очередь, в роли адьюванта для пероральных вакцин [10, 12], проявляющего свое действие на слизистых кишечника. Мукозальный иммунитет желудочно-кишечного тракта, в значительной степени, обеспечивающий невосприимчивость организма к патогенной кишечной микрофлоре, базируется преимущественно на иммуноглобулинах IgA – секреторных антителах, которые могут связывать токсины и препятствовать колонизации бактериями слизистой. Создание вакцины, эффективной для индукции мукозального иммунитета может способствовать более качественной защите от патогенов в области развития инфекционного процесса [13].

Таким образом, собранные экспериментальные данные свидетельствуют о возможности использования нарабатываемого в созданной нами экспрессионной системе рекомбинантного белка CtxB как эффективного антигена, вызывающего выраженный иммунный ответ, а отсутствие необходимости добавки при вакцинации дополнительных «усилителей» иммунного ответа указывает на высокий потенциал этого белка в качестве адьюванта, способствующего усилению формирования иммунитета к иным антигенам.

Литература

1. Wernick N.L., Chinnapen D.J., Cho J.A., Lencer W.I. Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum // *Toxins*. 2010. V. 2. P. 310–325. <https://doi.org/10.3390/toxins2030310>
2. Stratmann T. Cholera toxin subunit B as adjuvant – an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity // *Vaccines*. 2015. V. 3. № 3. P. 579–596. <https://doi.org/10.3390/vaccines3030579>
3. Lingwood C. Therapeutic uses of bacterial subunit toxins // *Toxins*. 2021. V. 13. № 6. P. 378–399. <https://doi.org/10.3390/toxins13060378>
4. Жамгочян Х., Замахаев М.В., Случанко Н.Н., Гончаренко А.В., Шумков М.С. Создание системы гетерологичной экспрессии и оптимизация способа наработки β-субъединицы холерного токсина в клетках *E. coli* // *Биохимия*. 2023. Т. 88. № 9. С. 1581–1596. doi: 10.31857/S0320972523090105
5. Lycke N., Erlandsson L., Ekman L., Schön K., Leanderson T. Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection // *J. Immunol.* 1999. V. 163. № 2. P. 913–919. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.2.913>
6. Kim P.-H., Eckmann L., Lee W.J., Han W., Kagnoff M.F. Cholera toxin and cholera toxin B subunit

induce IgA switching through the action of TGF-β1 // *J. Immunol.* 1998. V. 160. № 3. P. 1198–1203. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.3.1198>

7. Song K.R., Lim J.K., Park S.E., Saluja T., Cho S.-I., Wartel T.A., Lynch J. Oral cholera vaccine efficacy and effectiveness // *Vaccines*. 2021. V. 9. № 12. P. 1482–1500. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121482>

8. Price G.A., Holmes R.K. Evaluation of TcpF-A2-CTB chimera and evidence of additive protective efficacy of immunizing with TcpF and CTB in the suckling mouse model of cholera // *PLOS One*. 2012. V. 7. № 8. e42434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042434>

9. Boustanshenas M., Bakhshi B., Ghorbani M. Investigation into immunological responses against a native recombinant CTB whole-cell *Vibrio cholerae* vaccine in a rabbit model // *J. Appl. Microbiol.* 2013. V. 114. № 2. P. 509–515. <https://doi.org/10.1111/jam.12043>

10. Souod N., Kargar M., Hoseini M.H., Jafarinia M. Fusion-expressed CtxB-TcpA-C-CPE improves both systemic and mucosal humoral and T-cell responses against cholera in mice // *Microbial Pathogenesis*. 2021. V. 157. P. 104978–104992. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104978>

11. Kubota E., Joh T., Tanida S., Sasaki M., Kataoka H., Watanabe K., Itoh K., Oshima T., Ogasawara N., Togawa S., Wada T., Yamada T., Mori Y., Fujita F., Shimura T., Ohara H., Isaka M., Yasuda Y., Itoh M. Oral Vaccination Against *Helicobacter pylori* with Recombinant Cholera Toxin B-Subunit // *Helicobacter*. 2005. V. 10. P. 345–352. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2005.00328.x>

12. Wang T., Chen J.-P., Li H., Zhi K.-Q., Zhang L., Yang Ch.-L., Tao D.-Ch. Co-expression and immunity of *Legionella pneumophila mip* gene and immunoadjuvant *ctxB* Gene // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2005. V. 37. № 3. P. 199–204. <https://doi.org/10.1093/abbs/37.3.199>

13. Lavelle E.C., Ward R.W. Mucosal vaccines – fortifying the frontiers // *Nat. Rev. Immunol.* 2022. V. 22. P. 236–250. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00583-2>

References

1. Wernick N.L., Chinnapen D.J., Cho J.A., Lencer W.I. Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum // *Toxins*, 2010, vol. 2, pp. 310–325. <https://doi.org/10.3390/toxins2030310>
2. Stratmann T. Cholera toxin subunit B as adjuvant – an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity // *Vaccines*, 2015, vol. 3, no. 3, pp. 579–596. <https://doi.org/10.3390/vaccines3030579>
3. Lingwood C. Therapeutic uses of bacterial subunit toxins // *Toxins*, 2021, vol. 13, no. 6, pp. 378–399. <https://doi.org/10.3390/toxins13060378>
4. Zhamgochyan Kh., Zamakhayev M.V., Sluchanko N.N., Goncharenko A.V., Shumkov M.S. Sozdaniye sistemy geterologichnoy ekspressii i optimizatsiya sposoba narabotki β-sub'yediniy kholernogo toksina v kletkakh *E. coli* // *Biokhimiya*,

2023, vol. 88, no. 9, pp. 1581-1596. doi: 10.31857/S0320972523090105

5. Lycke N., Erlandsson L., Ekman L., Schön K., Leanderson T. Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection // *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, no. 2, pp. 913-919. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.2.913>

6. Kim P.-H., Eckmann L., Lee W.J., Han W., Kagnoff M.F. Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF- β 1 // *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, no. 3, pp. 1198-1203. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.3.1198>

7. Song K.R., Lim J.K., Park S.E., Saluja T., Cho S.-I., Wartel T.A., Lynch J. Oral cholera vaccine efficacy and effectiveness // *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 12, pp. 1482-1500. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121482>

8. Price G.A., Holmes R.K. Evaluation of TcpF-A2-CTB chimera and evidence of additive protective efficacy of immunizing with TcpF and CTB in the suckling mouse model of cholera // *PLOS One*, 2012, vol. 7, no. 8, e42434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042434>

9. Boustanshenas M., Bakhshi B., Ghorbani M. Investigation into immunological responses against a native recombinant CTB whole-cell *Vibrio cholerae* vaccine in a rabbit model // *J. Appl. Microbiol.*, 2013, vol. 114, no. 2, pp. 509-515. <https://doi.org/10.1111/jam.12043>

10. Souod N., Kargar M., Hoseini M.H., Jafarina M. Fusion-expressed CtxB-TcpA-C-CPE improves both systemic and mucosal humoral and T-cell responses against cholera in mice // *Microbial Pathogenesis*, 2021, vol. 157, pp. 104978-104992. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104978>

11. Kubota E., Joh T., Tanida S., Sasaki M., Kataoka H., Watanabe K., Itoh K., Oshima T., Ogasawara N., Togawa S., Wada T., Yamada T., Mori Y., Fujita F., Shimura T., Ohara H., Isaka M., Yasuda Y., Itoh M. Oral Vaccination Against *Helicobacter pylori* with Recombinant Cholera Toxin B-Subunit // *Helicobacter*, 2005, vol. 10, pp. 345-352. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2005.00328.x>

12. Wang T., Chen J.-P., Li H., Zhi K.-Q., Zhang L., Yang Ch.-L., Tao D.-Ch. Co-expression and immunity of *Legionella pneumophila mip* gene and immunoadjuvant *ctxB* Gene // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, vol. 37, no. 3, pp. 199-204. <https://doi.org/10.1093/abbs/37.3.199>

13. Lavelle E.C., Ward R.W. Mucosal vaccines – fortifying the frontiers // *Nat. Rev. Immunol.*, 2022, vol. 22, pp. 236-250. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00583-2>

FORMATION OF IMMUNE RESPONSE TO RECOMBINANT CtxB PROTEIN FOLLOWING ITS SUBCUTANEOUS AND PERORAL INJECTION

© Kh. Jamgochian¹, M.S. Kotliarova², M.S. Shumkov², A.V. Goncharenko²

¹Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49, ulitsa Timiryazevskaya, 127434, Moscow, Russian Federation

²Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, 33, Leninskiy prospekt, build. 2, 119071, Moscow, Russian Federation

Cholera toxin includes a non-toxic β -subunit (CtxB protein), which interacts with intestinal epithelial cells and leads to the entry of the toxin into the cell eventually. Since the immune response to CtxB is important for defence against cholera, this protein is included in cholera vaccines. In addition, the use of cholera toxin and its β -subunit is known to lead to enhanced mucosal immunity to co-administered antigens, thus providing the possibility of using CtxB as a mucosal adjuvant.

In the present study, the formation of humoral immune response to the previously obtained recombinant CtxB protein was evaluated in the model of BALB/c mice. It was shown that immunisation with CtxB leads to the formation of antibodies following both oral and subcutaneous administration. The antibodies are detected in both serum and intestinal lavage, indicating the formation of both a systemic and mucosal immune response. Since no adjuvants were used during immunisation, the results also indicate the possibility of using recombinant CtxB as an effective ‘enhancer’ of the immune response.

Keywords: CtxB, recombinant protein, immune response, antigen, adjuvant.