

Использование рекомбинантного слитного белка тимозин альфа-фактор некроза опухолей-тимозин альфа человека для получения гибридом к тимозину альфа

С.С.Ветчинин, Е.В.Галкина

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

При использовании для иммунизации рекомбинантного слитного белка тимозин альфа-фактор некроза опухолей альфа-тимозин альфа были получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к рекомбинантному тимозину альфа человека. Моноклональные антитела были специфичны к N- и C-концам тимозина альфа и антигенной детерминанте, общей для тимозина альфа и фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α). Результаты гибридизации свидетельствовали о высокой эффективности использования слитных белков при получении моноклональных антител к низкомолекулярным пептидам.

Ключевые слова: тимозин альфа 1, фактор некроза опухолей альфа, слитный белок, гибридомы, моноклональные антитела

Для цитирования: Ветчинин С.С., Галкина Е.В. Использование рекомбинантного слитного белка тимозин альфа-фактор некроза опухолей-тимозин альфа человека для получения гибридом к тимозину альфа. Бактериология. 2017; 2(4): 36–39. DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-36-39

Use of recombinant fuse protein thymosine alpha-tumor necrosis factor alfa-human alpha thymosin to obtain hybridoma cells to thymosine alpha

S.S.Vetchinin, E.V.Galkina

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow region, Russian Federation

Hybridoma cells, producing monoclonal antibodies to human recombinant alpha thymosin, have been obtained during using of recombinant fuse protein thymosin alpha-tumor necrosis factor alfa-thymosin alfa. Monoclonal antibodies were specific to the N- and C-ends of thymosin alpha and antigenic determinate common for alpha thymosin and tumor necrosis factor alpha. Results of fusing revealed high efficiency of using fuse proteins for obtaining monoclonal antibodies to low molecular peptides.

Keywords: thymosin alpha 1, tumor necrosis factor alpha, fuse protein, hybridomes, monoclonal antibodies

For citation: Vetchinin S.S., Galkina E.V. Use of recombinant fuse protein thymosine alpha-tumor necrosis factor alfa-human alpha thymosin to obtain hybridoma cells to thymosine alpha. Bacteriology. 2017; 2(4): 36–39. (In Russian). DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-36-39

Тимозин альфа 1 оказывает потенцирующее влияние на противоинфекционный и противоопухолевый иммунитет. В настоящее время разработаны и приняты для применения в клинической практике такие препараты с использованием тимозина альфа, как задаксин (препарат на основе рекомбинантного тимозина альфа) и рефнот (препарат на основе рекомбинантного слитного белка фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) и тимозина альфа). Задаксин зарегистрирован в 35 странах мира и используется в основном

при лечении хронических вирусных гепатитов В и С [1–3]. Отмечены положительные результаты применения препарата при лечении пациентов с сепсисом, перитонитом и острой цитомегаловирусной инфекцией [4, 5], а также онкологических больных – применение в качестве противоракового иммуномодулирующего средства [6–11].

Получение панели моноклональных антител представляется актуальным с точки зрения разработки тест-систем для определения тимозина альфа 1 в сыворотке крови, что по-

Для корреспонденции:

Ветчинин Сергей Сергеевич, кандидат биологических наук, заведующий сектором Лайм-боррелиоза отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142283, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск, ГНЦ ПМБ
Телефон: 8 (4967) 36-0065
E-mail: vetchinin@obolensk.org

Статья поступила 25.11.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Sergey S. Vetchinin, PhD (Biol.), head of the Lyme-borreliosis sector, department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0065
E-mail: vetchinin@obolensk.org

The article was received 25.11.2017, accepted for publication 22.12.2017

зволяет получать дополнительную информацию об иммунном статусе пациентов при составлении оптимальных схем терапии, в частности у больных с хроническими вирусными гепатитами.

Конструирование гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКАт), представляет собой вероятностный, зависящий от многих объективных и субъективных факторов процесс. В частности, вероятность получения более широкого спектра гибридом существенно возрастает от величины гуморального ответа при иммунизации антигеном. Чем выше титр антител в сыворотке мышей, тем больше специфических В-клеточных клонов образуется в селезенке. Для того чтобы обеспечить высокий гуморальный ответ при использовании низкомолекулярных пептидов для иммунизации животных, требуется их конъюгация с высокомолекулярными носителями.

Известно, что тимозин альфа 1 – это пептидный гормон тимуса, состоящий из 28 аминокислотных остатков, имеющий молекулярную массу 3108 Да [12], что явно недостаточно для получения высокого гуморального ответа даже при применении многократной и продолжительной схемы иммунизации. Для преодоления этих трудностей при иммунизации животных использовали рекомбинантный слитный белок, состоящий из трех пептидов: тимозин альфа 1-фактор некроза опухолей альфа-тимозин альфа 1 (Т-Ф-Т). При тестировании МКАт в иммуноферментном анализе (ИФА) твердую фазу сенсibilизировали рекомбинантными Т-Ф-Т, тимозином альфа 1, протимозином альфа и ФНО- α [13].

Материалы и методы

Иммунизация мышей. Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно 100 мкг Т-Ф-Т с полным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1. Через 28 дней подкожно вводили по 100 мкг Т-Ф-Т с неполным адъювантом Фрейнда (Sigma, США). Затем через 28 дней следовали три внутривенные инъекции по 20 мкг с десятидневными промежутками. Для гибридизации использовали спленоциты мышей с титрами сыворотки в ИФА не менее 1:10 000.

Гибридизация. Слияние миеломных клеток линии Р3-Х63-Аg8.653 со спленоцитами иммунных мышей проводили с использованием 50% (вес/объем) полиэтиленгликоля 4000 (Merck, Германия) и 5% (объем/объем) ДМСО (Sigma, США), рН 8,0 [14].

Селекцию гибридных клеток проводили на среде RPMI 1640, содержащей 20% (объем/объем) эмбриональной сыворотки теленка, 1 мМ L-глутамин, 1 мМ гипоксантина, 0,1 мМ тимидина и 0,3 мкМ аминоптерина (Sigma, США) в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для скрининга гибридных клеток, продуцирующих МКАт, использовали твердофазный ИФА на 96 луночных планшетах (Costar, США). Продуценты МКАт клонировали методом предельных разведений.

Криоконсервация гибридом. Гибридомы культивировали на среде RPMI 1640 (Sigma, США), содержащей 10% (объем/объем) эмбриональной сыворотки теленка (Gibco, США), 1 мМ L-глутамин (Sigma, США) до концентрации 10⁶ клеток/мл в среде замораживания, содержащей 90% феталь-

ной сыворотки теленка и 10% диметилсульфоксида (Sigma, США) и помещали в хранилище с жидким азотом.

Имуноферментный анализ. В лунки планшета для ИФА вносили по 100 мкл рекомбинантных Т-Ф-Т, тимозина альфа 1, протимозина или ФНО- α в 0,01 М карбонатном буфере, рН 9,6 (ПанЭко, Россия) с концентрацией 5 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ПанЭко, Россия) с 0,5% Твин 20 (ФБР-Т) 3 раза. Для блокирования неспецифических мест связывания в лунки добавляли по 100 мкл 1% раствора бычьего сывороточного альбумина в ФБР-Т и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Лунки промывали 3 раза ФБР-Т, добавляли по 100 мкл различных разведений сывороток иммунных мышей в ФБР-Т или культуральной жидкости гибридом и инкубировали в течение 45 мин при 37°C. Лунки промывали пятикратно ФБР-Т, добавляли по 100 мкл антимишинных кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США) в рабочем разведении и инкубировали 45 мин при 37°C. Пятикратно отмывали планшеты и вносили в лунки по 100 мкл раствора субстрата (0,1% раствор ортофенилендиамина (Sigma, США) в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере, 1 мкл/мл 33% H₂O₂). Через 10 мин инкубации реакцию останавливали добавлением 50 мкл 4 N раствора H₂SO₄. Учет результатов производили на планшетном фотометре «Униплан» (Россия) при длине волны 492 нм [15].

Результаты и обсуждение

В результате гибридизации получена 21 гибридома, продуцирующая МКАт к Т-Ф-Т. При проверке МКАт в твердофазном ИФА с рекомбинантными ФНО- α и тимозином альфа обнаружено, что МКАт 8 гибридом взаимодействовали только с Т-Ф-Т, 7 гибридом – с тимозином альфа, протимозином альфа и ФНО- α , 3 гибридомы – с тимозином альфа

Таблица. Взаимодействие МКАт с рекомбинантными белками

МКАт	ТФТ	ТФТ, Т, проТ, ФНО	ТФТ, Т	ТФТ, Т, проТ	ФНО
D6-1	D6-1				
D9-1				D9-1	
E6-1		E6-1			
E9-1		E9-1			
F7-1				F7-1	
C4-3	C4-3				
C8-3				C8-3	
D3-3	D3-3				
D7-3		D7-3			
F10-3		F10-3			
C7-4	C7-4				
E8-4		E8-4			
F5-4	F5-4				
F8-4			F8-4		
D5-5			D5-5		
D9-5	D9-5				
E4-5		E4-5			
E8-5	E8-5				
E9-5			E9-5		
F6-5	F6-5				
C6-1		C6-1			

ИФА – иммуноферментный анализ; МКАт – моноклональные антитела; Т-Ф-Т – рекомбинантный слитный белок тимозина альфа и фактора некроза альфа; ФНО – фактор некроза опухолей альфа; Т – тимозин альфа; проТ – протимозин альфа.

и 3 гибридомы – с тимозином альфа и протимозином альфа (таблица).

Взаимодействие МКАт только с Т-Ф-Т свидетельствует о наличии у слитного белка структурной детерминанты, отсутствующей у ФНО и тимозина альфа 1. Отсутствие гибридом, МКАт которых связывались бы только с ФНО, обусловлено тем, что N- и C-концевые участки ФНО скрыты в слитном белке.

Так как тимозин альфа 1 является продуктом протеолитического расщепления протимозина альфа по дипептиду Asp–vGly в позиции 29–30 с N-конца [16], можно предположить, что МКАт гибридом D9-1, F7-1 и С8-3 связываются с N-концевым фрагментом тимозина альфа 1 (отсутствие связывания с протимозином альфа), а МКАт гибридом Е6-1, Е9-1, D7-3, F10-3, Е8-4, Е4-5, С6-1 связываются с его С-концевым фрагментом (имеется связывание с протимозином альфа). Взаимодействие МКАт ряда гибридом как с тимозином альфа 1, так и с ФНО альфа, возможно, связано с наличием в структуре пептидов гомологичных участков.

Таким образом, применение подобных конструкций для низкомолекулярных пептидов увеличивает вероятность получения более широкого репертуара гибридом-продуцентов МКАт.

Полученные МКАт к тимозину альфа 1 в перспективе могут использоваться в тест-системах не только при контроле качества лечебных препаратов, но и при получении дополнительной информации по уровню тимозина в сыворотках людей в норме и при патологии, в частности при лечении различных вирусных и бактериальных заболеваний.

Выражение признательности

Авторы благодарны В.А.Шмелеву за предоставление антигенов для иммунизации и тестирования моноклональных антител.

Литература

- Loggi E, Gramenzi A, Margotti M, Cursaro C, Galli S, Vitale G, et al. In vitro effect of thymosin-alpha1 and interferon-alpha on Th1 and Th2 cytokine synthesis in patients with eAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2008 Jun;15(6):442-8. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00960.x
- Piratvisuth T. Reviews for APASL guidelines: immunomodulator therapy of chronic hepatitis B. *Hepatol Int.* 2008 Jun;2(2):140-6. DOI: 10.1007/s12072-008-9046-5
- Yang YF, Zhao W, Zhong YD, Yang YJ, Shen L, Zhang N, Huang P. Comparison of the efficacy of thymosin alpha-1 and interferon alpha in the treatment of chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Antiviral Res.* 2008 Feb;77(2):136-41. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.10.014
- Garaci E, Favalli C, Pica F, Sinibaldi Vallebbona P, Palamara AT, Matteucci C, et al. Thymosin alpha 1: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Sep;1112:225-34. DOI: 10.1196/annals.1415.044
- Goldstein AL, Goldstein AL. From lab to bedside: emerging clinical applications of thymosin alpha1. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 May;9(5):593-608. DOI: 10.1517/14712590902911412
- Gish R, Baron A. Hepatocellular carcinoma (HCC): current and evolving therapies. *Drugs. Biologics.* 2008 Sep;2(3):453-62.
- Славина ЕГ, Черткова АИ, Заботина ТН, Борунова АА, Нуртдинова ВА, Абрамов МЕ, Кадагидзе ЗГ. Рефнот – новый отечественный иммуномодулятор для лечения меланомы. *Российский аллергологический журнал.* 2012;5(1):248-9.

- Шмелёв ВА. Интерферон-гамма, фактор некроза опухолей, тимозин-альфа1 – противоионфекционные и противоопухолевые цитокины и препараты. М.: МедПрактика-М, 2008, 536 с.
- Шмелёв ВА. Рефнот. Рекомбинантный фактор некроза опухолей-тимозин- α 1, препарат с низкой системной токсичностью для лечения онкологических заболеваний. М., Рефнот-Фарм, 2010, 92 с.
- Владимирова ЛЮ, Захарова НП, Подзорова НА. Клинико-рентгенологические результаты лечения больных местно-распространенным раком молочной железы с перитуморальным применением рекомбинантного фактора некроза опухоли – тимозин- α 1. *Фундаментальные исследования.* 2015;1-8:1548-53.
- Нефедова НА, Харлова ОА, Данилова НВ, Мальков ПГ, Гайфуллин НМ. Маркеры ангиогенеза при опухолевом росте. *Архив патологии.* 2016;78(2):55-63. DOI: 10.17116/patol201678255-62
- Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, et al. Thymosin alpha 1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Feb;74(2):725-9.
- Шмелёв ВА, Бунина ЗФ, Кудрявцева ТЮ, Зинченко ЕВ, Болдарева ЕФ, Коробко ВГ. Получение группы гибридных белков, состоящих из фактора некроза опухолей α и тимозина α 1. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 1995;1:9-14.
- Nowinski RC, Lostrom ME, Tam MR, Stone MR, Burnette W.N. The isolation of hybrid lines producing monoclonal antibodies against the p 15 (E) protein of ceotropic murine Leukemia viruses. *Virology.* 1979;93:111-26.
- Михайлов АТ, Смирский ВН. Методы иммунологического анализа в биологии развития. М.: Наука, 1991, с. 176.
- Sarandeses CS, Covelo G, Diaz-Jullien C, Freire M. Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha 1 and thymosin alpha 11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):13286-93. DOI: 10.1074/jbc.M213005200

References

- Loggi E, Gramenzi A, Margotti M, Cursaro C, Galli S, Vitale G, et al. In vitro effect of thymosin-alpha1 and interferon-alpha on Th1 and Th2 cytokine synthesis in patients with eAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2008 Jun;15(6):442-8. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00960.x
- Piratvisuth T. Reviews for APASL guidelines: immunomodulator therapy of chronic hepatitis B. *Hepatol Int.* 2008 Jun;2(2):140-6. DOI: 10.1007/s12072-008-9046-5
- Yang YF, Zhao W, Zhong YD, Yang YJ, Shen L, Zhang N, Huang P. Comparison of the efficacy of thymosin alpha-1 and interferon alpha in the treatment of chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Antiviral Res.* 2008 Feb;77(2):136-41. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.10.014
- Garaci E, Favalli C, Pica F, Sinibaldi Vallebbona P, Palamara AT, Matteucci C, et al. Thymosin alpha 1: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Sep;1112:225-34. DOI: 10.1196/annals.1415.044
- Goldstein AL, Goldstein AL. From lab to bedside: emerging clinical applications of thymosin alpha1. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 May;9(5):593-608. DOI: 10.1517/14712590902911412
- Gish R, Baron A. Hepatocellular carcinoma (HCC): current and evolving therapies. *Drugs. Biologics.* 2008 Sep;2(3):453-62.
- Slavina EG, Chertkova AI, Zabolina TN, Borunova AA, Nurtdinova VA, Abramov ME, Kadagidze ZG. Refnot – novyi otechestvennyi immunomodulyator dlya lecheniya melanomy. *Russian Allergology Journal.* 2012;5(1):248-9. (In Russian).
- Shmelev VA. Interferon-gamma, faktor nekroza opukholei, timozin-al'fa1 – protivoinfektsionnye i protivopukholevye tsitokiny i preparaty. Moscow: "MedPraktika-M" Publ., 2008, 536 p. (In Russian).
- Shmelev VA. Refnot. Rekombinantnyi faktor nekroza opukholei-timozin- α 1, preparat s nizkoi sistemnoi toksichnost'yu dlya lecheniya onkologicheskikh zabolevanii. Moscow, Refnot-Farm, 2010, 92 p. (In Russian).

10. Vladimirova LY, Zakharova NP, Podzorova NA. Clinical and radiological results of treatment of locally advanced breast cancer patients with peritumoral application of recombinant tumor necrosis factor-alpha-thymosin-alpha1. *Fundamental Research*. 2015;1-8:1548-53. (In Russian).
11. Nefedova NA, Kharlova OA, Danilova NV, Malkov PG, Gaifullin NM. Markers of angiogenesis in tumor growth. *Arkhiv Patologii (Archive of Pathology)*. 2016;78(2):55-63. DOI: 10.17116/patol201678255-62 (In Russian).
12. Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, et al. Thymosin alpha 1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Feb;74(2):725-9.
13. Shmelev VA, Bunina ZF, Kudryavtseva TYu, Zinchenko EV, Boldareva EF, Korobko VG. Poluchenie gruppy gibridnykh belkov, sostoyashchikh iz faktora nekroza opukholei α i тимозина α 1. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 1995;1:9-14. (In Russian).
14. Nowinski RC, Lostrom ME, Tam MR, Stone MR, Burnette W.N. The isolation of hybrid lines producing monoclonal antibodies against the p 15 (E) protein of ceotropic murine Leukemia viruses. *Virology*. 1979;93:111-26.
15. Mikhailov AT, Simirskii VN. *Metody immunologicheskogo analiza v biologii razvitiya*. Moscow: "Nauka" Publ., 1991, p. 176. (In Russian).
16. Sarandeses CS, Covelo G, Diaz-Jullien C, Freire M. Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha 1 and thymosin alpha 11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem*. 2003 Apr 11;278(15):13286-93. DOI: 10.1074/jbc.M213005200

Информация об авторе:

Галкина Елена Вячеславовна, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142283, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск, ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 31-2156
 E-mail: elen12123@yandex.ru

Information about author:

Elena V. Galkina, reseacher of microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 31-2156
 E-mail: elen12123@yandex.ru

НАУЧНЫЕ КОНФЕРЕНЦИИ

Зарубежные научные конференции

February 12–14, 2018 Baltimore, MD	ASM Biothreats
February 25–27 Delhi, India	Big data in biomedicine
February 28–March 2 Cambridge, UK	Proteomics in Cell Biology and Disease Mechanisms
04–08 March Banff, Alberta, Canada	Manipulation of the Gut Microbiota for Metabolic Health
04–08 March Banff, Alberta, Canada	Microbiome, Host Resistance and Disease
06–08 March Cambridge, UK	Bioinformatics Resources for Protein Biology
11–16 March Ventura, CA, USA	Driving Antibacterial Discovery and Development to Address the Clinical Demands of the Next Decade
18–20 March Bristol, UK	54th BSMM Annual Scientific Meeting
28 March Birmingham, UK	ECS Research Symposium. Epidemiology and Infection Control
May 21–22 New York, USA	Bacteriology and Infectious Diseases
June 7–11 Atlanta, GA	ASM Microbe

Российские научные конференции

28–30 марта 2018 г.	VII Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» http://konferencii.ru/info/123101
19 апреля 2018 г.	XII Международная научно-практическая конференция «Научный форум: медицина, биология и химия» https://nauchforum.ru/conf/med/xii
17–18 мая 2018 г.	Всероссийская научно-практическая конференция «Микробиология: от микроскопа до геномного анализа» http://www.altaastra.com/events/microbiology-17-may-2018.html
23–25 мая 2018 г.	Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» http://www.biomos.ru/conference/
6–8 июня 2018 г.	Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения) http://mycology.szgmu.ru/congress2018/