
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МЕНИНГОКОККОВАЯ ПОЛИВАКЦИНА НА ОСНОВЕ ОЧИЩЕННОЙ IGA1 ПРОТЕАЗЫ*

А.П. Аллилуев, И.В. Анохина

Кафедра микробиологии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

Л.Д. Румш, О.В. Котельникова, Е.Ю. Дрожжина

Лаборатория химии протеолитических ферментов
ИБХ им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Россия, 117997

Л.С. Жигис, Е.Ю. Ягудаева, О.А. Разгуляева, В.С. Зуева

Лаборатория полимеров для биологии
ИБХ им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Россия, 117997

Л.В. Козлов, А.М. Бичучер

Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского
ул. Ад. Макарова, 10, Москва, Россия, 125212

А.Э. Аваков

Филиал ФГУН (НПО Микроген) Предприятие по производству
бактерийных препаратов им. Г.Н. Габричевского
Успенский пер., 10, Москва, Россия, 127006

IgA1 протеаза, выделенная методами препаративной химии из промежуточных продуктов очистки менингококковой полисахаридной серогруппы А вакцины, обладает выраженной иммуногенной и протективной активностью для лабораторных мышей, обеспечивая их защиту от смертельного заражения вирулентными штаммами серогрупп А и В менингококков. Протективный эффект и нарастание анти-IgA1 антител позволяют прогнозировать вакцинные потенции изучаемого препарата, который может рассматриваться, в первую очередь, в качестве кандидата отсутствующей до настоящего времени менингококковой серогруппы В вакцины.

Ключевые слова: IgA1 протеаза, менингококк, полисахарид, поливалентная вакцина, иммуногенность, протективность.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект ОФИ № 08-04-12126).

В 2009 г. исполнилось 40 лет после первой публикации о возможности использования в качестве менингококковых вакцин их капсульных полисахаридов [1]. В последующие годы была подтверждена эпидемиологическая эффективность капсульных менингококковых вакцин серогрупп А и С, а затем Y и W135. Тогда же было установлено, что капсульный полисахарид серогруппы В не может быть использован в качестве менингококковой вакцины из-за своих биологических особенностей. Начались попытки различных авторов использовать в качестве вакцины другие компоненты клеточной стенки этого микроба. В настоящий момент, более или менее, отвечают требованиям, предъявляемым к менингококковой вакцине, препараты, предложенные кубинскими, норвежскими и новозеландскими разработчиками [2]. Однако все описанные выше препараты, включающие серотиповые и серосубтипные маркеры, обладают сходным недостатком, основанном на полиморфизме клеточных маркеров менингококка.

С учетом всего сказанного, работы по усовершенствованию менингококковой вакцины против серогруппы В продолжаются. Ряд менингококковых вакцинных препаратов был предложен и отечественными исследователями [3, 4, 5, 12].

Между тем авторам этой статьи представилось интересным использовать в качестве менингококкового вакцинного препарата секретируемую менингококком и рядом других патогенов, IgA1 протеазу, являющуюся фактором патогенности этого микроба и играющую важную роль при адгезии и колонизации менингококков на эпителии слизистой оболочки носоглотки человека. Казалось логичным, что этот белковый полимер, обладающий достаточно высокой молекулярной массой (около 120 кД), будучи выделенным в очищенном от примесей виде будет иммуногенен для лабораторных животных и человека. В таком случае антитела против эпитопов этого фермента будут его блокировать и тем самым нейтрализовать его способность разрушать IgA1 антитела слизистой оболочки носоглотки человека, защищая тем самым организм от проникновения менингококков.

Материалы и методы. С учетом сложности работ с микробами третьей группы мы сочли целесообразным использовать для наших целей готовые микробные взвеси менингококков серогруппы А (штамм А208), выращиваемые на предприятии МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, выпускающего полисахаридную менингококковую серогруппы А вакцину для вакцинопрофилактики этой инфекции [6]. Наряду с целым рядом удобств при работе с микробами этой серогруппы существовала и опасность того, что выделенная протеаза будет обладать групповой специфичностью, т.е. не разрушать IgA1 антитела, направленные против возбудителя менингита серогруппы В.

Дальнейшие исследования, представленные в данной статье, показали, что эти опасения оказались напрасными.

Для выделения фермента использовали культуральную жидкость (КЖ) после ее обработки антибиотиком (гентамицином), мертиолатом и ЭДТА и два промежуточных продукта, получаемых в процессе выделения капсульного полисахарида: цетавлоновый осадок, образованный после фиксации КЖ этим реагентом, и цетавлоновый супернатант. Процедура выделения и очистки IgA1 протеазы, отличная от описанного в литературе метода [8, 9], подробно изложена нами ранее [7] и была аналогичной для всех трех образцов. Все три полученных образца

IgA1 протеазы обладали сходной молекулярной массой 116—120 кД при электрофорезе в 10%-м полиакриламидном геле и характеризовались высокой специфической ферментативной активностью (536—959,6 тыс. ед./мг).

Полученные фракции анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в додецилсульфате Na (ЭФ в ПААГ — ДСН).

Ферментативную активность IgA1 протеазы определяли с помощью иммуноферментного анализа [10].

Данные ЭФ свидетельствовали о том, что в полученных нами препаратах содержится IgA1 протеаза с молекулярной массой ~120 кДа. В табл. 1 приведены данные о выходе препарата фермента и некоторых его свойствах. Можно наблюдать, как распределяется содержание IgA1-протеазы между его естественным максимумом в культуральной жидкости (КЖ) и содержанием в полученных после добавления цетавлона осадке (ЦО) и надосадке (ЦН) или супернатанте (ЦС).

Принятый за 100% выход активного вещества фермента, выделенного из КЖ (в пересчете на 36 литров КЖ — одно выращивание), составлял 1200 мкг. Исходя из его удельной активности, равной 959 ед./мг, общий выход «активности» соответствует 1150,8 условных единиц, а выходы фермента из цетавлонового осадка и супернатанта соответствовали 513 и 172 мкг. Следовательно, их суммарная «активность» соответствует 275 и 110,5 условных единиц. Процент выхода указанных образцов в весовых единицах соответствует 43 и 14,4%, а в единицах активности — 23,9 и 9,5% в сравнении с выходом фермента из КЖ, принятым за 100%.

Таблица 1

Выход и некоторые свойства препаратов IgA1 протеазы

Источник фермента	Объем исходного продукта	Выход активной фракции			Специфическая ферментативная активность		
		фактический мкг	в пересчете на 36 л		удельная тыс. ед./мг	общая	
			мкг	%		тыс. ед./мг	%
Культуральная жидкость (КЖ)	3,0 л	100	1200	100	959,6	1 150,8	100
Цетавлоновый осадок (ЦО)	103 г	513	513	43	536,0	275,0	23,9
Цетавлоновый супернатант (ЦС)	2,5 л	12	172	14,3	638,9	109,9	9,5

С учетом потерь при выделении фермента из малых объемов КЖ и цетавлонового надосадка полученные величины вызывают оптимистическую оценку, поскольку цетавлоновый надосадок является бросовым отходом и выливается в канализацию, а цетавлоновый осадок (после экстрагирования из него IgA1 протеазы) можно использовать для дальнейшего извлечения менингококкового А-полисахарида. Общее же количество IgA1 протеазы, приходящееся на указанные источники, составляет соответственно по весу 57,3% и 33,4% — по условной активности.

Препарат IgA1 протеазы вводили мышам линии BALB/c внутривенно дважды в дозе 10 мкг белка, с интервалом 41 день. Кровь для определения антител брали с интервалом в 7 дней, начиная с 6 дня после первой иммунизации. Наличие специфических антител в сыворотках оценивали методом твердофазного ИФА при длине волны 492 нм. Исследованию подлежали пулы из сывороток четырнадцатиднейных животных.

цати мышей на каждый срок. Протективную активность IgA1 протеазы оценивали по уровню бактериемии у иммунизированных мышей через 4 ч после инфицирования их живой вирулентной культурой менингококка серогруппы В штамм Н44/76 (В:15:P1.7,16), а также по числу выживших животных на 5-й день после заражения [4]. Контролем служили не иммунизированные мыши.

Результаты исследования. Иммунизация мышей препаратом IgA1 протеазы вызывала выраженное нарастание специфических антител (рис. 1).

Антитела к IgA1 протеазе выявлялись на 20-й день и достигали после однократной иммунизации максимального уровня на 35-й и 41-й дни. Титр их составлял 1 : 320. На 12-й день после повторной иммунизации (41 + 12) титр антител возрастал до 1 : 2560, что свидетельствует о формировании иммунологической памяти.

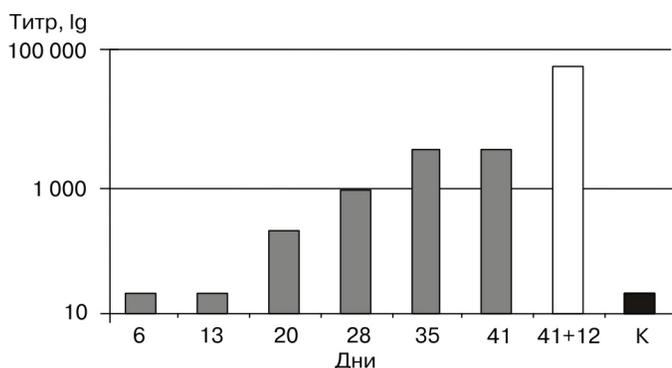


Рис. 1. Динамика образования специфических антител к IgA1 протеазе в сыворотках иммунизированных мышей

При заражении мышей менингококком серогруппы В (штамм Н44/76) на 15-й день после повторной иммунизации IgA1 протеазой уровень бактериемии в группе иммунизированных мышей снижался до $4,5 \pm 0,5$ КОЕ по сравнению с $10,2 \pm \pm 0,9$ КОЕ у контрольных, не иммунизированных мышей (рис. 2 А).

Число выживших после заражения животных в этой в группе равнялось 27 из 30 (90%), тогда как в контрольной группе выжили лишь 3 мыши (10%) (рис. 2Б).

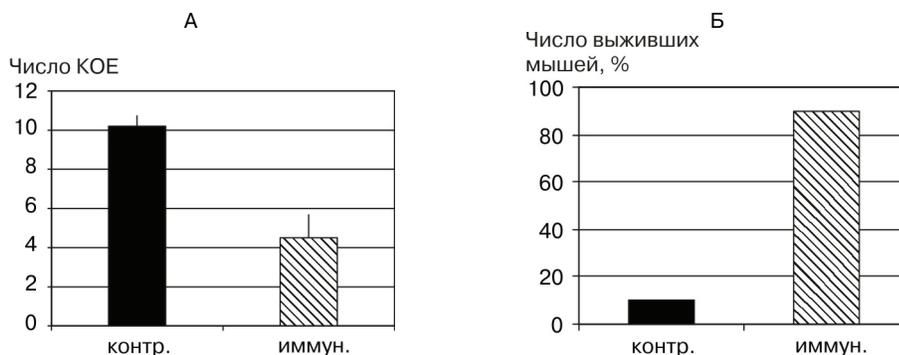


Рис. 2. Защищенность мышей, иммунизированных IgA1 протеазой, от заражения менингококком серогруппы В:

А — уровень бактериемии; Б — число выживших мышей

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что полученный препарат IgA1 протеазы способен эффективно защищать животных при инфицировании живой менингококковой культурой гетерологичного штамма. Известно, что лабораторная модель защиты иммунных мышей от смертельного заражения вирулентными штаммами менингококков адекватна создаваемой невосприимчивости у людей эффективными менингококковыми вакцинами, поэтому изучаемый препарат IgA1 протеазы может рассматриваться как препарат для создания поливалентной вакцины для защиты от менингококковой инфекции различной этиологии. Предстоит дальнейшее изучение препаратов IgA1 протеазы, получаемых путем ее экстракции из продуктов культуральной среды менингококков различных штаммов и серогрупп, а также путем генной инженерии, на длинном пути продвижения вакцинного препарата в практику здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Gotschlich E.C., Liu T.Y., Artenstein M.S. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides // *J. Exp. Med.* — 1969. — V. 129. — P. 1349—1365.
- [2] Jordan Report. — 2007. — Appendix A. — P. 135.
- [3] Баснакьян И.А., Артемьева Т.А., Алексахина Н.Н. и др. Способ получения полисахаридно-белковой вакцины против *Neisseria meningitidis* серогруппы В // Патент РФ № 1750689 от 25.10.1993 г.
- [4] Котельникова О.В., Чибискова О.В., Несмеянов В.А. и др. Протективные свойства синтетических пептидов наружной мембраны менингококков // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.* — 2005. — № 5. — С. 553—556.
- [5] Несмеянов В.А., Котельникова О.В., Вольпина О.М. и др. Способ приготовления бивалентной вакцины против менингококковой инфекции серогрупп В/А или В/С на основе синтетических пептидов и капсульных полисахаридов без использования адьюванта // Патент РФ № 2250113 от 20.04.2003 г.
- [6] Аваков А.Э., Аллилуев А.П. Способ выделения очищенных полисахаридов менингококков серогрупп А и С // Патент РФ № 2283135 от 09.10.2006г.
- [7] Ягудаева Е.Ю., Жигис Л.С., Разгуляева О.А. и др. Выделение и определение активности IgA1 протеиназы из культуры *Neisseria meningitidis* // *Биоорганическая химия.* — 2009. — В печати.
- [8] Казеева Т.Н., Шевелев А.Б. IgA-специфические белки патогенных бактерий // *Биохимия.* — 2009. — Т. 74. — Вып. 1. — С. 17—29.
- [9] Суровцев В.И., Таймуразов М.Г., Козлов Л.В. и др. Получение IgA1-протеиназы, секретлируемой клетками *Neisseria meningitidis* // *Биотехнология.* — 2006. — Т. 3. — С. 62—67.
- [10] Козлов Л.В., Романов С.В., Дьяков В.Л. и др. Способ и набор для иммуноферментного определения активности и ингибирования IgA1-протеиназы. Патент РФ № 2310853. — *Бюлл.* № 32. 20.11.2007.
- [11] Mulks M.H., Plaut A.G., Feldman H.A. IgA proteases of two distinct specificities are released by *Neisseria meningitidis* // *J. Exp. Med.* — 1980. — Nov. 1. — 152(5). — С. 1442—1447.
- [12] Аллилуев А.П., Котельникова О.В., Кувакина В.И. и др. Иммунологические свойства очищенных и комплексных В-полисахаридов // *ЖМЭИ.* — 1986. — № 10. — С. 7—11.

MENINGOCOCCAL POLYVACCINE ON THE BASIS OF CLEARED IGA1 PROTEASE

A.P. Alliluev, I.V. Anohina

Microbiology Chair
Medical faculty
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

L.D. Rumsh, O.V. Kotelnikova, E.Yu. Drozzina

Chemistry laboratory proteolitics enzymes
M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, Russia, 117997

L.S. Zhigis, E.Yu. Yagudaeva, O.A. Razgulyaeva, V.S. Zueva

Laboratory of polymers for biology
M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, Russia, 117997

L.V. Kozlov, A.M. Bichucher

G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute
of Epidemiology and Microbiology of Russia
Ad. Makarova str., 10, Moscow, Russia, 125212

A.E. Avakov

The branch of the federal state unitary enterprise
Research-and-production association «Microgene» G.N. Gabrichevsky
The enterprise for manufacture bacterial preparations
Uspenski lane, 10, Moscow, Russia, 127006

IgA1-protease allocated from the culture *N. meningitidis* serogroup A. As original materials were used three different intermediate products of vaccine production: cultural fluid, cetavlon supernatant and cetavlon precipitate. IgA1-protease was used to evaluate their protectivity and immunogenicity. It was shown, that isolated IgA1 protease from the meningococcus serogroup A is able to protect mice, infected by meningococcus serogroup B.

Key words: IgA1 protease, meningococcus, immunogenicity, protection, polyvaccina.