

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ КОНЬЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЛИГАНДОВ И БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ CRM197

Богомолова Е.Г.¹, Добровольская О.А.¹, Федорова Е.А.¹, Кондрашкина А.М.¹,
Колмаков Н.Н.¹, Ищук С.А.¹, Духовлинов И.В.¹, Симбирцев А.С.^{1,2}

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА
России, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В настоящее время отсутствуют эффективные средства лечения ряда социально значимых бактериальных и грибковых заболеваний. β -(1 \rightarrow 3)-глюканы, то есть полисахариды, состоящие из остатков глюкозы, связанных между собой β -(1 \rightarrow 3)-гликозидными связями, являются принципиальными компонентами клеточной стенки грибов и дрожжей, в том числе таких опасных возбудителей госпитальных инфекций, как *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* и других. В то же время β -(1 \rightarrow 3)-глюканы отсутствуют в организме млекопитающих и человека, что делает их перспективными компонентами конъюгированных углевод-белковых вакцин для профилактики и лечения грибковых инфекций. Белок CRM197 является производным дифтерийного токсина и характеризуется единичной мутацией, а именно заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52, что полностью элиминирует его токсичность. Белок CRM197 нетоксичен, тем не менее сохраняет те же воспалительные и иммуностимулирующие свойства, что и дифтерийный токсин. В настоящее время данный белок широко используется в качестве безопасного носителя в конъюгированных вакцинах. Классическим способом получения CRM197 является выделение их из лизогенных культур *Corynebacterium diphtheriae*. Альтернативой классическому способу получения CRM197 является экспрессия его гена в клетках *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*. Преимущество использования *Escherichia coli* в качестве продуцента состоит в том, что данный метод является более простым и дешевым и позволяет получать рекомбинантный CRM197 в короткие сроки с использованием непатогенного микроорганизма. Целью данного исследования было изучение антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 в реакции конкурентного ИФА. Двукратная иммунизация экспериментальными образцами конъюгированных вакцин на основе олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c вызывает формирование высокого титра специфических антител. Все исследованные образцы конъюгированных вакцин на основе олигоглюкозидов с различным содержанием мономерных звеньев в цепи (пентасахариды, гептасахариды, наносахариды, а также ундекасахариды) при их двукратном введении вызывали формирование у иммунизированных животных титра антител на уровне 1:51200. Высокая авидность формирующихся антител к своим олигосахаридным лигандам была показана в реакции конкурентного ИФА. Полученные данные говорят о целесообразности дальнейших доклинических исследований экспериментальных образцов конъюгированных вакцин против грибов *Candida* и *Aspergillus*, а также выбора наиболее иммуногенного и эффективного варианта вакцины из исследуемых.

Ключевые слова: конъюгированные вакцины, рекомбинантный CRM197, антигенная активность, мыши Balb/c

Адрес для переписки:

Богомолова Елена Григорьевна
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7.
Тел.: 8 (921) 631-17-89.
E-mail: bogomolovaele@inbox.ru

Address for correspondence:

Bogomolova Elena G.
Research Institute of Highly Pure Biopreparations,
Russian Federal Agency for Medicine and Biology
197110 Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7.
Phone: 7 (921) 631-17-89.
E-mail: bogomolovaele@inbox.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская, Е.А. Федорова,
А.М. Кондрашкина, Н.Н. Колмаков, С.А. Ищук,
И.В. Духовлинов, А.С. Симбирцев «Изучение
антигенной активности экспериментальных образцов
конъюгированных вакцин на основе синтетических
олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 157-164.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-157-164

© Богомолова Е.Г. и соавт., 2017

For citation:

E.G. Bogomolova, O.A. Dodrovolskaya, E.A. Fedorova,
A.M. Kondrashkina, N.N. Kolmakov, S.A. Ishchuk,
I.V. Dukhovlinov, A.S. Simbirtsev "Antigenic activity assays of
experimental conjugate vaccines based on synthetic oligosaccharide
ligands and CRM197 carrier protein", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 2,
pp. 157-164.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-157-164

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-157-164

ANTIGENIC ACTIVITY ASSAYS OF EXPERIMENTAL CONJUGATE VACCINES BASED ON SYNTHETIC OLIGOSACCHARIDE LIGANDS AND CRM197 CARRIER PROTEIN

Bogomolova E.G.^a, Dodrovolskaya O.A.^a, Fedorova E.A.^a, Kondrashkina A.M.^a, Kolmakov N.N.^a, Ishchuk S.A.^a, Dukhovlinov I.V.^a, Simbirtsev A.S.^{a,b}

^a Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

^b Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. So far, there is no effective treatment for a number of socially significant bacterial and fungal diseases. β -(1 \rightarrow 3) glucans are polysaccharides consisting of glucose units linked together with β -(1 \rightarrow 3)-glycoside bonds. They are principal components of the fungal cell wall including such dangerous nosocomial pathogens as *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and others. At the same time, β -(1 \rightarrow 3) glucans are absent in humans and other mammals, thus making them to be promising components of carbohydrate-protein conjugate vaccines for prevention and treatment of fungal infections. The CRM197 protein is a non-toxic derivative of diphtheria toxin, which is widely used as a safe carrier for conjugate vaccines. The CRM197 extraction from lysogenic *C. diphtheriae* cultures is a classic way of its production. An alternative to the classic method is a transgene-driven CRM197 protein expression in *E. coli*, *B. subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. The advantage for using *Escherichia coli* in this case is that this method is more simple and inexpensive, and allows of producing recombinant CRM197 within short terms employing a non-pathogenic microorganism. The purpose of this study was to investigate antigenic activity in the samples of experimental conjugate vaccines based on synthetic oligosaccharide ligands and CRM197 carrier protein, by means of a competitive ELISA. A double immunization of laboratory Balb/c mice with experimental samples of conjugate vaccines based on oligosaccharide ligands and CRM197 protein caused induction of specific antibodies at high titers. All the samples of oligoglucoside-based conjugate vaccines with different contents of monomeric units (pentasaccharides, heptasaccharides, nanosaccharides, and undecasaccharides) caused the formation high antibody titer at the level 1: 51,200, following tandem injections. High avidity of antibodies to their oligosaccharide ligands was shown by competitive ELISA reaction. These data suggest a relevance of further pre-clinical trials of conjugate vaccines against *Candida* and *Aspergillus*, as well as selection of the most immunogenic and effective version of the conjugate vaccine.

Keywords: conjugate vaccines, recombinant CRM197, antigenic activity, Balb/c mice

Исследование выполнено в рамках НИОКР, выполняемых по соглашению № 14.579.21.0022 с Минобрнауки РФ о предоставлении субсидии из федерального бюджета для прикладных научных исследований по лоту шифр 2014-14-579-0001 по теме: «Разработка конъюгированных вакцин на основе синтетических углеводных лигандов против возбудителей госпитальных инфекций». Соглашение о выделении субсидий № 14.579.21.0022 от 05 июня 2014 г. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI57914X0022.

Введение

В настоящее время отсутствуют эффективные средства лечения ряда социально значимых бактериальных и грибковых заболеваний. В случае некоторых бактериальных патогенов, плесневых грибов и дрожжей целесообразность и актуальность разработки вакцин диктуется их возрастающей резистентностью к действию антибиотиков.

Действие имеющихся вакцин против перечисленных типов патогенов во многих случаях основано на индуцировании иммунного ответа против полисахаридных антигенов, представленных на их клеточной стенке. Примерами таких вакцин являются гемофильная (педиатрическая вакцина против *Haemophilus influenzae* типа b) [4], пневмококковая вакцина (олиговалентная вакцина против ряда серотипов *Streptococcus pneumoniae*) [3] и целый ряд других, являющихся ключевыми составляющими вакцинопрофилактики населения в мире. Однако многие вакцинные продукты, критически важные для отечественного здраво-

охранения, в России не производятся и представлены только зарубежными препаратами, которые к тому же не вполне отвечают современным требованиям и нуждаются в модификации. В подавляющем большинстве случаев указанные вакцины имеют в своей основе антигенные полисахариды, выделенные из бактериальных источников. Применение нативных полисахаридов для получения вакцин имеет ряд недостатков, связанных с трудностями культивирования соответствующих микроорганизмов и выделения, очистки и стандартизации полисахаридов. Кроме этого, конъюгация полисахаридов с иммуногенными белками-носителями в данном случае протекает неспецифично.

-(1 \rightarrow 3)-глюканы, то есть полисахариды, состоящие из остатков глюкозы, связанных между собой -(1 \rightarrow 3)-гликозидными связями, являются принципиальными компонентами клеточной стенки грибов и дрожжей, в том числе таких опасных возбудителей госпитальных инфекций, как *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* и дру-

гих. В то же время $-(1\rightarrow3)$ -глюканы отсутствуют в организме млекопитающих и человека. Все это делает $-(1\rightarrow3)$ -глюканы перспективными компонентами конъюгированных углевод-белковых вакцин для профилактики и лечения грибковых инфекций.

$-(1\rightarrow3)$ -глюканы, в особенности выделенные из различных природных источников, могут значительно отличаться друг от друга по своей молекулярной массе, количеству и расположению разветвлений вдоль основной цепи, что существенно влияет на их вторичную и третичную структуру, растворимость в воде и другие свойства. Препараты природных $-(1\rightarrow3)$ -глюканов могут существенно варьироваться по степени чистоты и гомогенности. Это ограничивает применение природных $-(1\rightarrow3)$ -глюканов для разработки конъюгированных противогрибковых вакцин. Решением проблемы является использование синтетических олигосахаридных фрагментов $-(1\rightarrow3)$ -глюканов строго определенного строения, высокой степени чистоты и содержащих в заданном положении спейсерную группу, позволяющую проводить конъюгацию с белками-носителями разных типов специфично, контролируемо и воспроизводимо, как требует производство по стандартам GMP.

Белок CRM197 является нетоксичным производным дифтерийного токсина, характеризующимся одной мутацией, а именно заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52, что нивелирует его токсичность. Данный белок, являясь нетоксичным, в то же время сохраняет те же воспалительные и иммуностимулирующие свойства, что и дифтерийный токсин, в результате чего CRM197 широко используется в качестве безопасного носителя в конъюгированных вакцинах [2]. Как и дифтерийный токсин дикого типа, CRM197 включает два домена: фрагмент А (каталитический) и фрагмент В, соединенные дисульфидным мостиком. Фрагмент В содержит субдомены, один из них связывает HB-EGF клеточный рецептор, другой участвует в процессе проникновения внутрь клетки.

Классическим способом получения CRM197 и других нетоксичных вариантов дифтерийного токсина является выделение их из лизогенных культур *Corynebacterium diphtheriae*. Альтернативой классическому способу получения CRM197 является экспрессия его гена в клетках *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* [8, 12]. Преимущество использования *Escherichia coli* в качестве продуцента состоит в том, что данный метод является более простым и дешевым и позволяет получать рекомбинантный CRM197 в короткие сроки с использованием непатогенного микроорганизма. Использование высокопродуктивного штамма-продуцента рекомбинантного белка CRM197 на основе клеток *E. coli* позволяет сократить время ферментации и получить белок с высоким выходом. Структура получаемого белка обуславливает увеличение эффективности вакцинации.

Целью данной работы было изучение антигенной активности экспериментальных образцов

конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 в реакции конкурентного ИФА.

Материалы и методы

1. Препараты для иммунизации

В качестве препаратов использовали экспериментальные образцы конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197. Глюкозидные лиганды были синтезированы в ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского» РАН [11], белок получен по ранее разработанной методике в ФГУП «Государственный НИИ ОЧБ» ФМБА России [1].

2. Лабораторные животные

В экспериментах были использованы самки мышей линии BALB/c 9-12-недельного возраста в количестве 25 голов, которые содержались в стандартном виварии. Использовались мыши из питомника РАМН «Рапполово» Ленинградской области.

Животные содержались в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Мыши находились по 10 особей в пластиковых клетках фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки.

Кормление животных — дважды в день. Регламентирующий документ на содержание животных: «Лабораторные животные». — М., 2003. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

3. Иммунизация

Иммунизация животных экспериментальными образцами конъюгированных вакцин, а также контрольным препаратом осуществлялась шприцевым методом, при этом оцениваемые препараты вводились в квадрицепс левой конечности в объеме 500 мкл. После инъекции место введения обрабатывалось раствором диоксида хлора (Clidox-S; Pharmacol, Naugatuck, Conn).

Схема иммунизации предусматривала двукратное введение иммунобиологических препаратов. Повторное введение каждого препарата осуществляли спустя 14 суток после первичной иммунизации. Иммунизационная доза олигосахаридов составляла 10 мкг. В качестве адъюванта использовали гель алюминия гидроксида Alhydrogel '85' 2% (Brenntag Biosector, Дания) в количестве 0,5 мг на одну инъекционную дозу.

4. Наблюдение за животными в процессе исследования

Наблюдение за животными проводилось ежедневно с начала опыта; в день введения препаратов — в течение 2 часов после инъекций. При осмотрах внимание обращали на общее состояние животных. Любые отклонения от нормального состояния фиксировали.

5. Получение материала на исследование

На четырнадцатый день после второй иммунизации осуществляли эвтаназию животных путем

эвтаназии в CO₂-камере с последующим гильотинированием и получением крови. Из цельной крови готовили сыворотки. Полученные сыворотки крови иммунизированных животных были использованы для оценки антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 *in vitro* в реакции конкурентного ИФА.

6. Определение антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 *in vitro* в реакции конкурентного ИФА

Для оценки антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин произведено определение титра антител в сыворотках крови иммунизированных животных. Для оценки рабочего титра антител сывороток иммунизированных животных 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) были покрыты целевым антигеном (антигены для ИФА на основе синтетических олигосахаридных лигандов, конъюгированных с бычьим сывороточным альбумином), выдержаны ночь при температуре +4 °С, отмыты 3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. В лунки планшета добавили по 100 мкл 2-кратных разведений сывороток (начиная с 1:100) в блокирующем буфере (0,01М натрий фосфатном буфере, pH 7,2-7,4, 5% БСА), инкубировали в течение 2 часов при постоянном перемешивании при комнатной температуре и отмыли 3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее в лунки вносили по 100 мкл конъюгата. В качестве конъюгата использовали моноклональные крысиные антимышинные IgG (Invitrogen, США) в разведении 1:1000, меченые пероксидазой хрена. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании, лунки планшета отмывали трижды 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее в лунки вносили по 100 мкл субстрата. В качестве субстрата использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ (BD Bioscience). После инкубации с субстратом и остановки реакции производили учет результатов с использованием планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм. За рабочий титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере в 2 раза большую, чем сыворотка неиммунизированных мышей в том же разведении.

После определения рабочего титра сывороток иммунизированных животных, проводили конкурентный ИФА для определения антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин. Для этого 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) покрывали целевым антигеном (антигены для ИФА на основе синтетических олигосахаридных лигандов, конъюгированных с бычьим сывороточным альбумином), выдерживали ночь при температуре +4 °С, отмывали

3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее во все лунки вносили рабочее разведение сыворотки в 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20 в объеме 90 мкл в расчете на лунку. В первые два ряда к сыворотке прибавляли 10 мкл фосфатно-солевого буфера, а в остальные опытные лунки – соответствующие исследуемые ингибиторные олигосахариды – конкурирующие антигены в концентрации 0,1, 1 или 10 мкг в расчете на лунку в фосфатно-солевом буфере. После инкубации в течение 1 ч при 37° планшеты трижды отмывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее в лунки вносили по 100 мкл конъюгата. В качестве конъюгата использовали моноклональные крысиные антимышинные IgG (Invitrogen, США) в разведении 1:1000, меченые пероксидазой хрена. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании, лунки планшета трижды отмывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее в лунки вносили по 100 мкл субстрата. В качестве субстрата использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ (BD Bioscience). После инкубации с субстратом и остановки реакции производили учет результатов с использованием планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм. Торможение (то есть ингибирование) рассчитывали по формуле: 100% – x, где 100% – оптическая плотность сыворотки (ОП450) до внесения антигена, x – активность сыворотки (%) после прибавления антигена. Чем больше уровень ингибирования, тем выше антигенная активность экспериментальных образцов конъюгированных вакцин.

Результаты

Для изучения антигенной активности экспериментального образца конъюгированной вакцины против грибов *Candida* и *Aspergillus* на основе пентасахаридного лиганда и белка-носителя CRM197 животных иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом в две недели. В качестве адьюванта был использован гидроксид алюминия.

При двукратной внутримышечной иммунизации конъюгатом пентасахаридов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c наблюдается формирование высокого титра антител, а именно 1:51200 (рис. 1).

В реакции конкурентного ИФА с использованием пентасахаридов в качестве ингибиторов показан уровень торможения, который составил 68% при добавлении ингибитора в концентрации 10 мкг/лунку, что говорит о высокой антигенной активности исследуемого образца конъюгированной вакцины (рис. 2).

При двукратной внутримышечной иммунизации конъюгатом гептасахаридов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c наблюдается формирование высокого титра антител, а именно 1:51200 (рис. 3)

В реакции конкурентного ИФА с использованием гептасахаридов в качестве ингибиторов показан уровень торможения, который составил

89% при добавлении конкурента в концентрации 10 мкг/лунку, что говорит о высокой антигенной активности исследуемого образца конъюгированной вакцины (рис. 4).

Для изучения антигенной активности экспериментального образца конъюгированной вакцины против грибов *Candida* и *Aspergillus* на основе наносахаридного лиганда и белка-носителя CRM197 животных иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом в две недели. В качестве адьюванта был использован гидроксид алюминия.

При двукратной внутримышечной иммунизации конъюгатом наносахаридов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c наблюдается формирование высокого титра антител, а именно 1:51200 (рис. 5).

В реакции конкурентного ИФА с использованием наносахаридов в качестве ингибиторов показан уровень торможения, который 81% при добавлении его в концентрации 10 мкг/лунку, что говорит о высокой антигенной активности исследуемого образца конъюгированной вакцины (рис. 6).

При двукратной внутримышечной иммунизации конъюгатом ундекасахарида и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c наблюдается формирование высокого титра антител, а именно 1:51200 (рис. 7).

В реакции конкурентного ИФА с использованием ундекасахаридов в качестве ингибиторов показан уровень торможения, который составил 73% при добавлении ингибитора в концентрации 10 мкг/лунку, что говорит о высокой антигенной активности исследуемого образца конъюгированной вакцины (рис. 8).

Обсуждение

C. albicans является комменсалом человека, взаимодействие данного микроорганизма с иммунной системой хозяина играет важную роль как в развитии комменсализма, так и патологических состояний – инфекций. Системные кандидозы, являющиеся госпитальными инфекциями, возникают в основном вследствие таких медицинских процедур, как переливание крови, иммуносупрессивной терапии, хирургических вмешательств и использования широкого спектра антибиотиков. В последние годы проводится все больше и больше исследований, подтверждающих иммуногенность и эффективность различных разрабатываемых противокандидозных вакцин. В качестве кандидатных вакцин используют полисахариды клеточной стенки гриба, белки, а также живые аттенуированные штаммы *Candida* [10].

Исследуемая кандидатная конъюгированная углевод-белковая вакцина, описанная в данной работе, имеет ряд преимуществ по сравнению с вакцинами на основе полисахаридов. Вакцины на основе полисахаридов эффективны для формирования защиты взрослых от бактериальных инфекций, однако они не столь эффективны в случае группы риска, к которой относятся младенцы, дети раннего возраста, пожилые и люди с ослабленным иммунитетом [5]. Конъюгирование полисахаридных компонентов вакцин

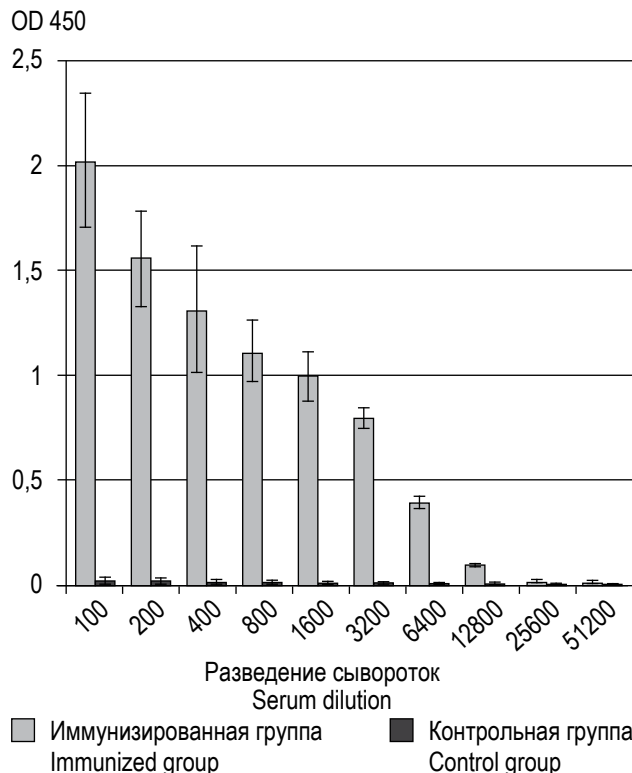


Рисунок 1. Диаграмма титра антител сывороток животных, иммунизированных конъюгатом пентасахаридного лиганда и белка-носителя CRM197

Figure 1. Diagram of serum antibody titers in the animals immunized with a conjugate of pentasaccharide ligand and CRM197 carrier protein

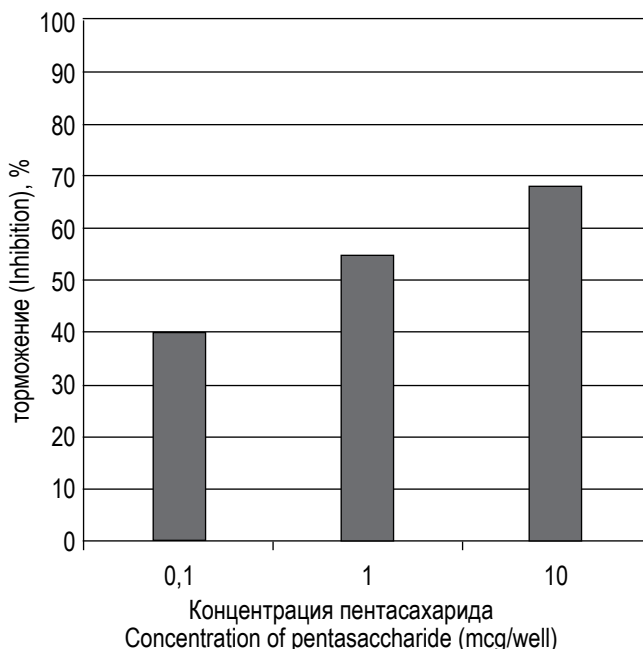


Рисунок 2. Диаграмма торможения конкурентного ИФА при добавлении различных концентраций пентасахаридов

Figure 2. Diagram of competitive ELISA inhibition at different pentasaccharide concentrations

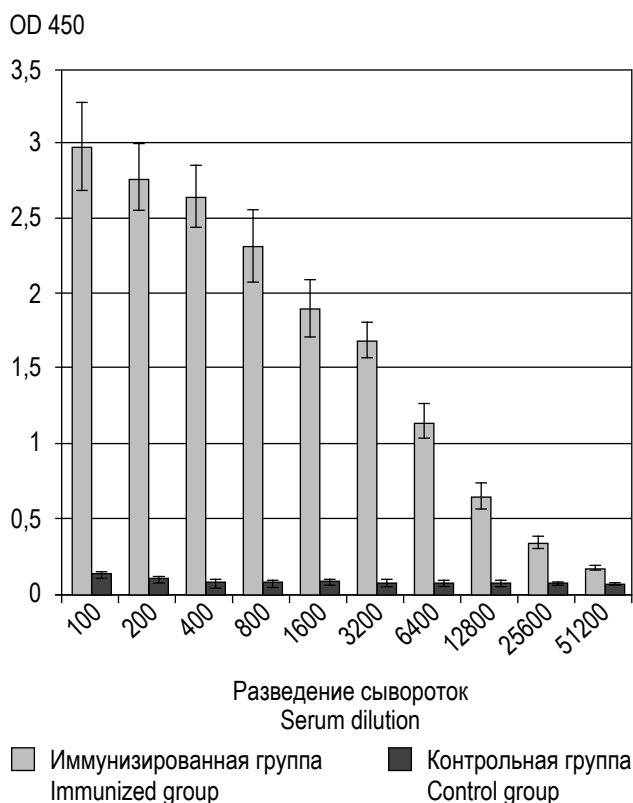


Рисунок 3. Диаграмма титра антител сывороток животных, иммунизированных конъюгатом гептасакхаридного лиганда и белка-носителя CRM197

Figure 3. Diagram of serum antibody titers in the animals immunized with a conjugate of heptasaccharide ligand and CRM197 carrier protein.

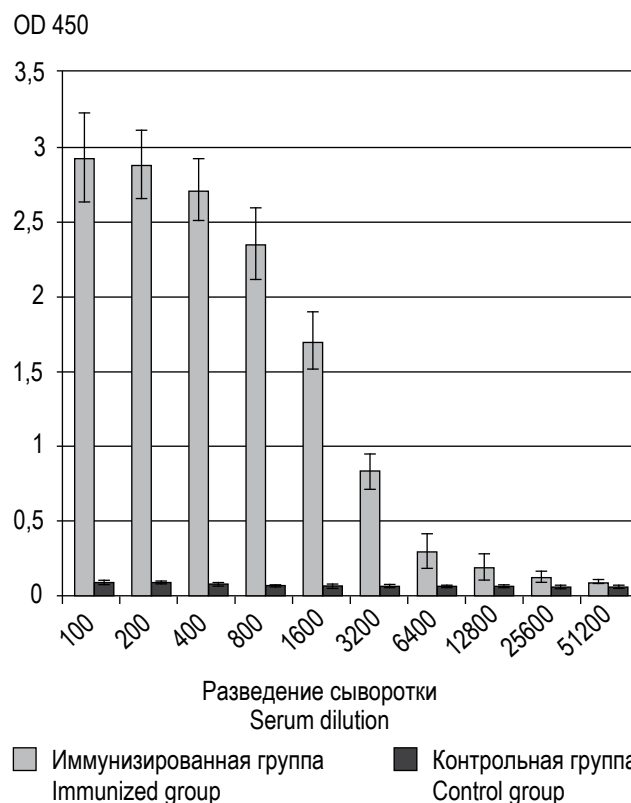


Рисунок 5. Диаграмма титра антител сывороток животных, иммунизированных конъюгатом наносакхаридного лиганда и белка-носителя CRM197

Figure 5. Diagram of serum antibody titers in the animals immunized with the conjugate of nanosaccharide ligand and CRM197 carrier protein.

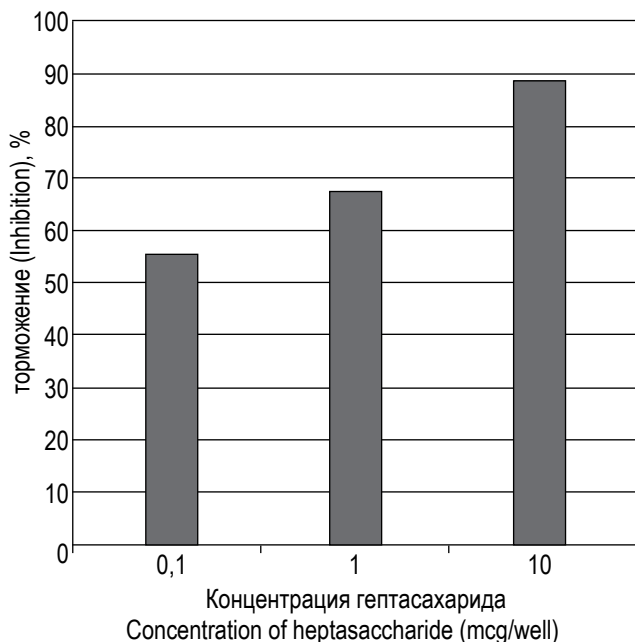


Рисунок 4. Диаграмма торможения конкурентного ИФА при добавлении различных концентраций гептасакхарид

Figure 4. Diagram of competitive ELISA inhibition at different heptasaccharide concentrations

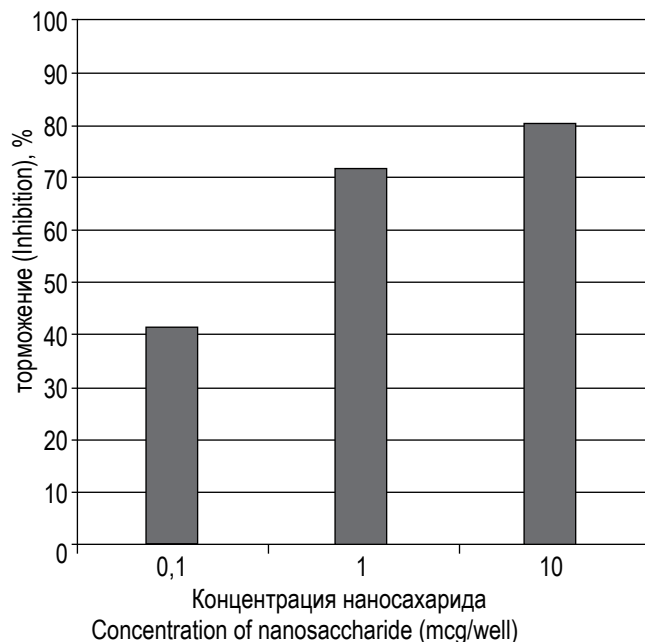


Рисунок 6. Диаграмма торможения конкурентного ИФА при добавлении различных концентраций наносакхарид

Figure 6. Diagram of competitive ELISA inhibition at different nanosaccharide concentrations

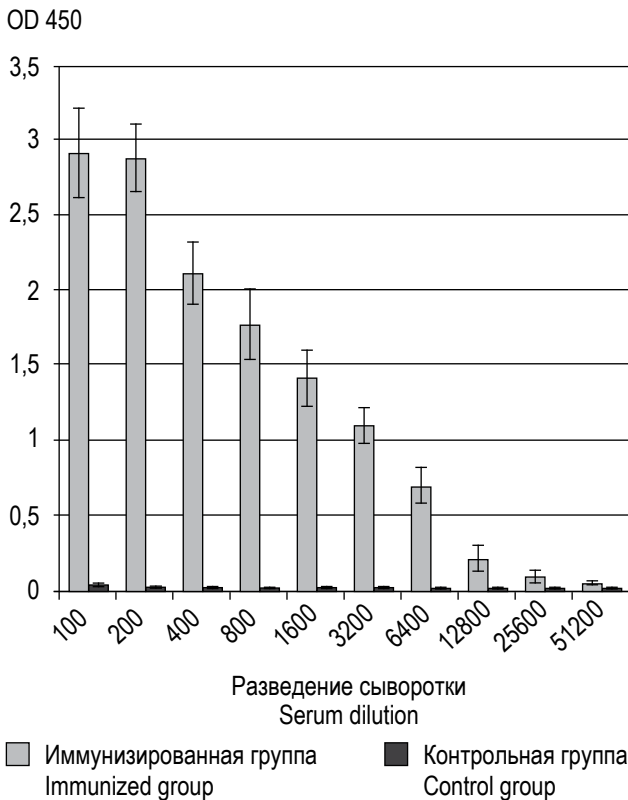


Рисунок 7. Диаграмма титра антител сывороток животных, иммунизированных конъюгатом ундекасахаридного лиганда и белка-носителя CRM197

Figure 7. Diagram of serum antibody titers in the animals immunized with the conjugate of undecasaccharide ligand and CRM197 carrier protein

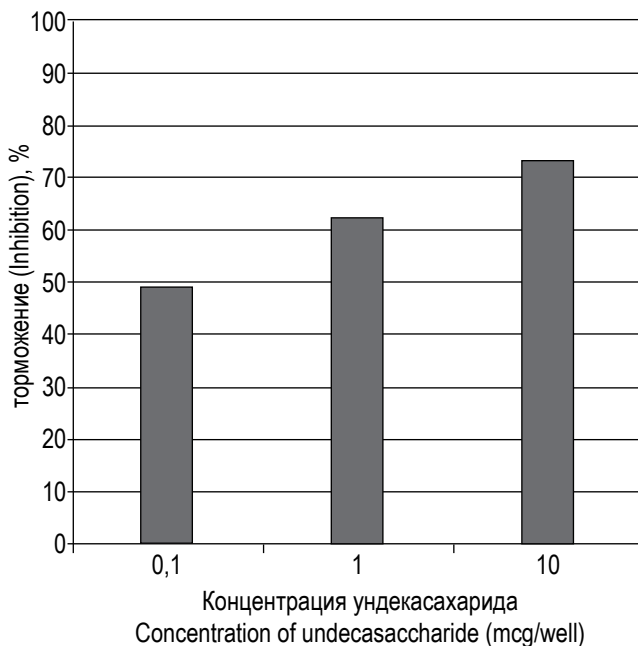


Рисунок 8. Диаграмма торможения конкурентного ИФА при добавлении различных концентраций ундекасахарида

Figure 8. Diagram of competitive ELISA inhibition at different undecasaccharide concentrations

с белком-носителем приводит к активации Т-зависимого иммунного ответа и, таким образом, в значительной степени повышает иммуногенность препарата. Экспериментальные исследования показали, что при использовании в качестве белка-носителя CRM197 наблюдаются повышенные уровни IgG на целевой полисахаридный антиген. Также происходит увеличение синтеза таких цитокинов, как IL-4 и IL-5, являющихся маркерами индукции Т-хелперов 2 типа. Следует отметить, что показана безопасность вакцинации полисахаридными вакцинами, конъюгированными с CRM197, младенцев из группы риска [9].

Другим примером госпитальной инфекции является инвазивный аспергиллез, вызываемый в подавляющем большинстве случаев грибами *Aspergillus fumigatus* и некоторыми другими представителями данного рода. Заболевание тяжело поддается лечению и в большинстве случаев имеет летальный исход. В литературе имеются данные о разработке кандидатных противоаспергиллезных вакцин на основе культуральных фильтратов аспергиллуса, а также его белковых компонентов [6].

Ранее было установлено, что иммунизация лабораторных мышей конъюгатом (1→3)-глюкозидного лиганда с бычьим сывороточным альбумином вызывает выработку специфических антител, которые распознают поверхностные олигосахариды *Aspergillus fumigatus* [7]. Результаты, полученные в нашей работе, согласуются с указанными данными. Двукратная иммунизация экспериментальными образцами конъюгированных вакцин на основе олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c вызывает формирование высокого титра специфических антител. Все исследованные образцы конъюгированных вакцин на основе олигоглюкозидов с различным содержанием мономерных звеньев в цепи (пентасахариды, гептасахариды, наносахариды, а также ундекасахариды) при их двукратном введении вызвали формирование у иммунизированных животных титра антител на уровне 1:51200. Высокая avidность формирующихся антител к своим олигосахаридным лигандам была показана в реакции конкурентного ИФА. При этом следует заметить, что наибольший процент торможения иммуноферментной реакции был получен в группах, иммунизированных гептасахаридным и наносахаридным конъюгатом с белком-носителем, 89 и 81% соответственно, при использовании конкурентных олигоглюкозидов в концентрации 10 мкг на лунку, что говорит о высокой иммуногенности оцениваемых кандидатных вакцин.

Полученные данные говорят о целесообразности дальнейших доклинических исследований экспериментальных образцов конъюгированных вакцин против грибов *Candida* и *Aspergillus*, а также выбора наиболее иммуногенного и эффективного варианта вакцины из исследуемых.

Список литературы / References

1. Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев А.С. Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli*. Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 37-44. [Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S. [Production of recombinant protein CRM197 in *Escherichia coli*. *Infektsiya i immunitet* = *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, Vol. 5, no. 1, pp. 37-44. (in Russ.)]. <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2015-1-37-44>
2. Blanchard-Rohner G. The B-cell response to a primary and booster course of MenACWY-CRM197 vaccine administered at 2, 4 and 12 months of age. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, no. 20, pp. 2441-2448.
3. CDC. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee: prevention of pneumococcal disease. *MMWR*, 1997, no. 46, p. 8.
4. Clements D.A., Gilbert G.L. Immunization for the prevention of *Haemophilus influenzae* type b infections: a review. *Aust. N. Z. J. Med.* 1990, no. 20, pp. 828-834.
5. Dagan R., Poolman J., Siegrist C.-A. Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review. *Vaccine*. 2010, Vol. 28, no. 34, pp. 5513-5523.
6. Ito J.I. T cell immunity and vaccines against invasive fungal diseases. *Immunological Investigations*. 2011, Vol. 40, pp. 825-838.
7. Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Beau R., Aimaniana V., Latgé J.P., Nifantiev N.E. Synthesis of a pentasaccharide and neoglycoconjugates related to fungal α -(1 \rightarrow 3)-glucan and their use in the generation of antibodies to trace *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Chemistry*. 2015, Vol. 21, no. 3, pp. 1029-1035.
8. Retallack D.M. Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expr. Purif.* 2012, Vol. 81, no. 2, pp. 157-165.
9. Van den Biggelaar A.H.J. et al. Pneumococcal conjugate vaccination at birth in a high-risk setting: no evidence for neonatal T-cell tolerance. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, no. 33, pp. 5414-5420.
10. Wang X.J., Sui X., Yan L., Wang Y., Cao Y.B., Jiang Y.V. Vaccines in the treatment of invasive candidiasis. *Virulence*, 2015, Vol. 6, no. 4, pp. 309-315.
11. Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Grachev A.A., Chizhov A.O., Nifantiev N.E. Synthesis of 3-aminopropyl glycosides of linear β -(1 \rightarrow 3)-D-glucosooligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 2016, Vol. 419, no. 8, p. 17.
12. Zhou J. Secretory expression of recombinant diphtheria toxin mutants in *B. Subtilis*. *J. Tongji Med. Univ. Tong Ji Yi Ke Xue Xue Bao*, 1999, Vol. 19, no. 4, pp. 253-256.

Авторы:

Богомолова Е.Г. — младший научный сотрудник, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Добровольская О.А. — младший научный сотрудник, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Федорова Е.А. — научный сотрудник, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Кондрашкина А.М. — старший лаборант, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Колмаков Н.Н. — старший научный сотрудник, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Ищук С.А. — инженер первой категории, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Духовлинов И.В. — к.б.н., начальник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, директор ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Bogomolova E.G., Junior Research Associate, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Dobrovolskaya O.A., Junior Research Associate, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Fedorova E.A., Research Associate, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Kondrashkina A.M., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Kolmakov N.N., Senior Research Associate, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Ishchuk S.A., First Rank Engineer, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Chief, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 05.10.2016

Принята к печати 20.10.2016

Received 05.10.2016

Accepted 20.10.2016