

# РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ C5a ПЕПТИДАЗЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ВАКЦИН ПРОТИВ СТРЕПТОКОККА ГРУППЫ В

Дуплик Н.В., Королева И.В., Грабовская К.Б.,  
Суворов А.Н.

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт  
экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН, Санкт-Петербург

**Резюме.** Фрагменты гена, кодирующие N-терминальный и центральный участки C5a пептидазы стрептококка группы В (СГВ), были проклонированы с использованием экспрессионных векторов в *E. coli* M15. Соответствующие рекомбинантные полипептиды SCPB1a и SCPB3a с молекулярной массой  $12,0 \pm 0,5$  кДа и  $11,0 \pm 0,5$  кДа были экспрессированы и аффинно очищены. Оба полипептида индуцировали продукцию специфических антител при подкожной иммунизации мышей. Более выраженный иммунный ответ наблюдали на введение SCPB3a. В опытах *in vitro* (опсонофагоцитарный тест) и *in vivo* (модель генерализованной инфекции на мышцах) были исследованы антимикробные свойства анти-SCPB1a и анти-SCPB3a антител. В работе было продемонстрировано, что N-терминальная и центральная части молекулы C5a пептидазы содержат эпитопы, ответственные за формирование гуморального иммунитета с образованием антител класса G, эффективно опсонизирующих СГВ, а полученные рекомбинантные полипептиды SCPB1a и SCPB3a могут быть рекомендованы для дальнейшего использования при создании поликомпонентной вакцины против СГВ.

**Ключевые слова:** стрептококк группы В, C5a пептидаза, рекомбинантные полипептиды, иммуногенность, опсонофагоцитоз

Duplik N.V., Koroleva I.V., Grabovskaya K.B., Suvorov A.N.

## RECOMBINANT POLYPEPTIDES BASED ON C5a PEPTIDASE AS POTENTIAL VACCINE COMPONENTS AGAINST GROUP B STREPTOCOCCI

**Abstract.** Gene fragments encoding N-terminal and central parts of group B streptococci (GBS) C5a peptidase were cloned in *E. coli* M15. The appropriate recombinant SCPB1a and SCPB3a polypeptides with molecular masses of, resp.,  $12.0 \pm 0.5$  kDa and  $11.0 \pm 0.5$  kDa, were subject to expression and affinity purification. Both polypeptides induced specific antibodies production upon subcutaneous immunization of mice. A more pronounced immune response was detected with SCPB3a injection. Antimicrobial properties of anti-SCPB1a and anti-SCPB3a antibodies have been investigated *in vitro* (by opsonophagocytosis test) and *in vivo* (a model of generalized GBS infection in mice). N-terminal and central segments of C5a peptidase molecule have been shown to contain epitopes inducing humoral immune response with production of class G antibodies that efficiently opsonize GBS, whereas recombinant SCPB1a and SCPB3a polypeptides can be recommended for future implications in development of a poly-component vaccine against GBS. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 1, pp 41-48)

### Адрес для переписки:

Дуплик Надежда Владленовна  
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12.  
Тел.: (812) 234-05-42.  
Факс: (812) 234-94-77.  
E-mail: nadezhdaduplik@gmail.com

**Keywords:** group B streptococci, C5a peptidase, recombinant polypeptides, immunogenicity, opsonophagocytosis

## Введение

Стрептококк группы В (СГВ) остается наиболее острой проблемой в области здравоохранения, поскольку вызывает серьезные осложнения в ходе беременности женщин и является основной причиной пневмонии, менингита и сепсиса у новорожденных [11, 16]. Особую озабоченность вызывают случаи стремительного развития стрептококкового сепсиса, которые приводят к высокой смертности новорожденных в первые дни жизни [10, 13]. Также в группу риска развития СГВ инфекции входят лица пожилого возраста и лица с пониженным состоянием иммунной системы [12, 14]. Традиционное применение антибиотикотерапии для лечения заболеваний, вызванных СГВ, оказывается не всегда эффективно, вследствие появления все большего количества устойчивых к антибиотикам штаммов. С другой стороны, использование антибиотиков часто приводит к нежелательным осложнениям и сбоям в иммунной системе человека. В настоящее время предпочтение отдается другим подходам и, прежде всего, мерам профилактики СГВ заболеваний, к которым относится вакцинация населения.

Создание вакцинных препаратов против инфекционных агентов является одним из наиболее результативных способов профилактики инфекционной заболеваемости. Первоначально, при разработке вакцин против стрептококка группы В исследования были направлены на использование капсульного полисахарида СГВ, являющегося важным фактором патогенности и обладающего антифагоцитарными свойствами. Однако невысокая иммуногенность самого полисахарида и существование 10-капсульных серотипов СГВ явились существенным недостатком полисахаридных вакцин. В дальнейшем исследователи для повышения иммуногенности стали конъюгировать полисахариды с белками и другими носителями [5, 18, 20]. Параллельно начали создаваться вакцины с использованием белковых факторов патогенности СГВ в качестве вакцинных компонентов. В настоящее время наиболее перспективными представляются разработки поликомпонентных вакцин, состоящих из нескольких белков либо их частей [15]. Развитие данного направления стало возможным в первую очередь с внедрением новых методов генетической инженерии [4].

В представленной работе в качестве потенциального вакцинного препарата был выбран известный фактор патогенности СГВ – С5а пептидаза (SCPВ). С5а пептидаза специфически расщепляет С5а фракцию комплемента и, как следствие, препятствует миграции полиморфноядерных лейкоцитов в очаг воспаления [7, 19]. Кроме того,

было продемонстрировано, что эта клеточность-зависимая протеаза обладает свойствами адгезина и инвазина, взаимодействует с фибринектином и непосредственно с эпителиальными клетками человека [6, 8]. Интерес к SCPВ также обусловлен ее высокой консервативностью и распространенностью [9]. В предыдущей работе на основе SCPВ нами был получен рекомбинантный полипептид молекулярной массой 43 кДа с выраженными иммуногенными и антимикробными свойствами [2]. Задачей данного исследования стало создание низкомолекулярных рекомбинантных полипептидов на основе SCPВ, способных стимулировать выработку антимикробных специфических иммуноглобулинов. Необходимость получения высокоэффективных низкомолекулярных рекомбинантных полипептидов в качестве вакцинных препаратов стала особенно востребованной в последние годы при разработках поликомпонентных вакцин.

## Материалы и методы

**Бактериальные штаммы, культуральные среды и условия роста.** В работе были использованы референс штаммы *Streptococcus agalactiae* 090R (Ia), 5/70 (Iac), 60/59 (II), 13/63 (III), 1/92 (IV), 10/84 (V), 2/86 (VI) из коллекции Национального центра ВОЗ (Прага, Чехия); клинический изолят *Streptococcus agalactiae* 5581 (III) из НИИАиГ им. Д.О. Отто РАМН (Санкт-Петербург, Россия); штамм *Escherichia coli* M15 из микробиологической коллекции Национального центра ВОЗ (Санкт-Петербург, Россия). СГВ культивировали на среде ТНВ (Difco, США) при 37 °С в течение 12 ч. Клетки *E. coli* выращивали на среде ВНИ (Gibco, США) с добавлением канамицина до конечной концентрации 25 мкг/мл при 37 °С и интенсивном перемешивании в течение 12 ч. Для получения рекомбинантных полипептидов трансформанты *E. coli* выращивали на среде ВНИ с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и канамицина (25 мкг/мл) при 37 °С и интенсивном перемешивании.

**Генетические методы.** Амплификацию фрагментов гена *scpB* (*scpB1a* и *scpB3a*) на матрице хромосомной ДНК штамма 090R осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и специально сконструированных праймеров Scpb1a1 (5'-AGGATCCTCAAAAGCGACTATTAGGGATTT), Scpb1a2 (5'-TAGTCGACGTAATAAGCAACCTTATCATTG) и Scpb3a1 (5'-AGTATGTCGACSTTTCTGGAACTAGTATGT), Scpb3a2 (5'-CTCCTGCAGCTTGTGGCGAGGAGAAAAAT). ПЦР проводили в амплификаторе с активным регулированием («Терцик», Россия). Смесь инкубировали при 94 °С в течение 2 мин. Далее задавали програм-

му на цикл денатурации 94 °С в течение 15 с, цикл отжига праймеров 57 °С (для *scpB1a*) и 59 °С (для *scpB3a*) в течение 15 с, цикл синтеза ДНК 72 °С в течение 20 с. Последовательность таких циклов повторяли 35 раз. Потом смесь дополнительно инкубировали при 72 °С в течение 1 мин. После разделения в 1,0% агарозном геле ПЦР фрагменты выделяли из агарозы с помощью набора «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen, США). Клонирование осуществляли в плазмидный вектор pQE-30 («The QIAexpress System», Qiagen, США). Трансформацию проводили в *E. coli* M15.

**Методы белковой химии.** Выделение рекомбинантных полипептидов из культур штаммов-продуцентов *E. coli* M15 проводили трехкратным разрушением клеток ультразвуком по 20 с (с перерывом в 40 с) в ультразвуковом дезинтеграторе (УЗДН-1У4.2, Россия). Лизаты клеток центрифугировали при 13400 об/мин в течение 20 мин. Надосадочные жидкости пропускали через 0,2 мкм фильтры (Millipore, США). Очистку рекомбинантных полипептидов осуществляли методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-сефарозой (Amersham, США) согласно протоколу фирмы.

SDS-электрофорез полипептидов проводили в 14% полиакриламидном геле (PAGE) в вертикальном пластинчатом аппарате Mini-PROTEAN II (BioRad, США). Молекулярную массу (М.М.) рекомбинантных полипептидов оценивали в SDS-PAGE, сравнивая их подвижность с подвижностью белков с известными молекулярными массами (М.М. = 10 ÷ 250 кДа, «Precision Plus Protein Standards», Bio-Rad, США) на одной и той же пластинке геля. Количественное определение белка в растворах проводили по методу Лоури [17].

**Иммунологические методы.** Гуморальный иммунный ответ к рекомбинантным полипептидам изучали на беспородных белых мышах (самцах массой 16 ÷ 18 г), полученных из питомника «Рапполово», РАМН. Иммунизацию проводили двукратно и подкожно с адьювантом гидроксида алюминия (Pierce, США). В эксперименте использовали 30 мышей, которым вводили по 0,2 мл каждого полипептида с адьювантом в соотношении объемов 1:1 соответственно. Конечная концентрация полипептида (К) при 1-ой инъекции составляла 100 мкг/мл и при второй инъекции – 50 мкг/мл; инъекции проводили на 1-й и 22-й дни соответственно. Наличие сывороточных специфических антител к рекомбинантным полипептидам определяли, используя пул сывороток от 4-х животных, методом иммуноферментного анализа, как описано [3]. Для детекции IgG антител использовали белок *A* стафилококка, ковалентно связанный с перокси-

дазой хрена, в концентрации 10<sup>-7</sup> моль/л. Для визуализации реакции использовали 0,5 мкг/мл о-фенилендиамин в 150 мМ фосфатно-цитратном буфере (рН = 5,0) с добавлением 30% перекиси водорода. Реакцию регистрировали при длине волны 492 нм с помощью прибора Anthos 2010 (Anthos, Австрия).

Опсонизирующую активность антител, полученных к рекомбинантным полипептидам, изучали на суточном монослое мышинных перитонеальных макрофагов, как описано у Грабовской К.Б. с соавторами [1]. Стрептококковую суспензию в концентрации 1,0 × 10<sup>7</sup> КОЕ/мл после предварительной инкубации (при 37 °С, 30 мин, 5% CO<sub>2</sub>) с сыворотками (в разведении 1:50) добавляли к макрофагам (при 37 °С, 30 мин, 5% CO<sub>2</sub>). При микроскопии окрашенного монослоя макрофагов исследовали не менее 100 макрофагов в каждой из трех параллельных проб. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента–Фишера.

Исследование антимикробных свойств антител, полученных к рекомбинантным полипептидам, проводили в опытах с моделированием генерализованной СГВ инфекции у мышей. Мышам предварительно подкожно вводили физиологический раствор, рН = 7,4 (PBS) пополам с адьювантом или рекомбинантный полипептид пополам с адьювантом (контрольная и опытная группы, соответственно) по схеме иммунизации, как описано выше. В эксперименте использовали по 30 мышей (самцов массой 16 ÷ 18 г) в контрольной и опытных группах. Всем группам мышей внутрибрюшинно вводили СГВ штамм 5/70 Iac серотипа в дозе LD<sub>50</sub> = 5,0 × 10<sup>9</sup> КОЕ/мл. Оценку антимикробных свойств мышинных антител, полученных к полипептидам, проводили путем определения количества СГВ в селезенках мышей на разных сроках развития инфекции (по 3 мыши на каждый срок), высевая на чашки с кровавым агаром серию десятикратных разведений каждого гомогената селезенки, как описано у Грабовской К.Б. с соавторами [1]. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента–Фишера.

**Компьютерный анализ.** Нуклеотидная последовательность гена *scpB* была получена в базе данных PubMed и GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Анализ аминокислотной последовательности проводили с помощью программ ExPasy. Конструирование олигонуклеотидных праймеров осуществляли с помощью компьютерных программ Primer 3 и OLIGO 4.0. Средние значения результатов экспериментов обрабатывали с помощью программ Microsoft Excel.

## Результаты

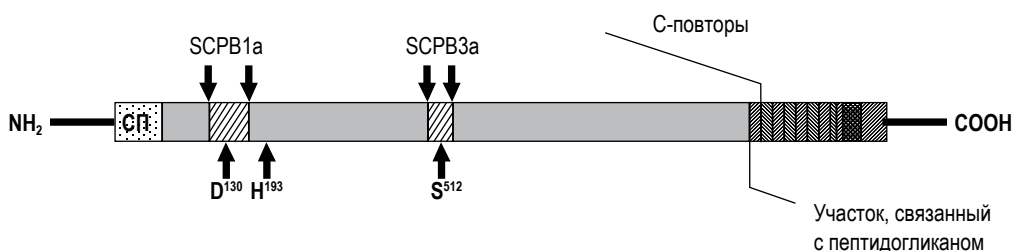
**Получение рекомбинантных полипептидов SCPB1a и SCPB3a.** Начальным этапом создания рекомбинантных полипептидов стал анализ аминокислотной последовательности белка С5а пептидазы СГВ штамма 78-471 II серотипа с использованием данных «PubMed» и программ «ExPASy». При выборе полипептидов были приняты во внимание такие характеристики, как малые размеры, степень спирализованности, положение полипептидов на молекуле С5а пептидазы, отсутствие области, формирующей ферментативный центр белка, участка молекулы, а также и средние значения антигенности. В результате анализа были выделены два фрагмента (обозначенные как SCPB1a и SCPB3a), расположенные в N-терминальной и центральной части С5а пептидазы и содержащие 28% и 41% альфа спиральных структур соответственно (рис. 1). SCPB1a и SCPB3a не обладают протеазной активностью, поскольку оба пептида содержат лишь по одному аминокислотному остатку, из необходимых трех, формирующих ферментативный центр С5а пептидазы (рис. 1). Преимуществом при выборе SCPB1a и SCPB3a являлся тот факт, что эти участки поверхностной С5а пептидазы, по данным компьютерного моделирования, должны находиться за пределами клеточной стенки бактерии. Вследствие этого, участки С5а пептидазы, соответствующие SCPB1a и SCPB3a, доступны для взаимодействий как с клетками, так и с различными медиаторами иммунной системы организма хозяина.

Для клонирования фрагментов *scpB1a* и *scpB3a*, кодирующих SCPB1a и SCPB3a, использовали систему экспрессионных векторов pQE, позволяющую быстро и эффективно очистить рекомбинантные полипептиды с помощью аффинной хроматографии. В результате применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) были получены ДНК фрагменты *scpB1a* и *scpB3a* размером 250 пн и 196 пн соответственно (рис. 2А). Фраг-

менты *scpB1a* и *scpB3a* были проклонированы в вектор pQE-30 с последующей трансформацией в *E. coli* M15. Клоны-трансформанты, выращенные на селективной твердой среде и содержащие рекомбинантные плазмиды, были идентифицированы с помощью ПЦР и исходных праймеров с дальнейшим электрофоретическим анализом полученных фрагментов ДНК в 1% агарозном геле. Были отобраны клоны-трансформанты, содержащие плазмидный вектор pQE-30 со вставками *scpB1a* или *scpB3a*. При клонировании *scpB1a* и *scpB3a* встраивались в вектор pQE-30 с заданным направлением и с сохранением рамки считывания структурного полипептида вследствие конструкции исходных праймеров. Этот прием значительно сокращал весь процесс получения рекомбинантных клонов. Штаммы-продуценты рекомбинантных полипептидов SCPB1a и SCPB3a получили название *E. coli* M15-C1a и *E. coli* M15-C3a.

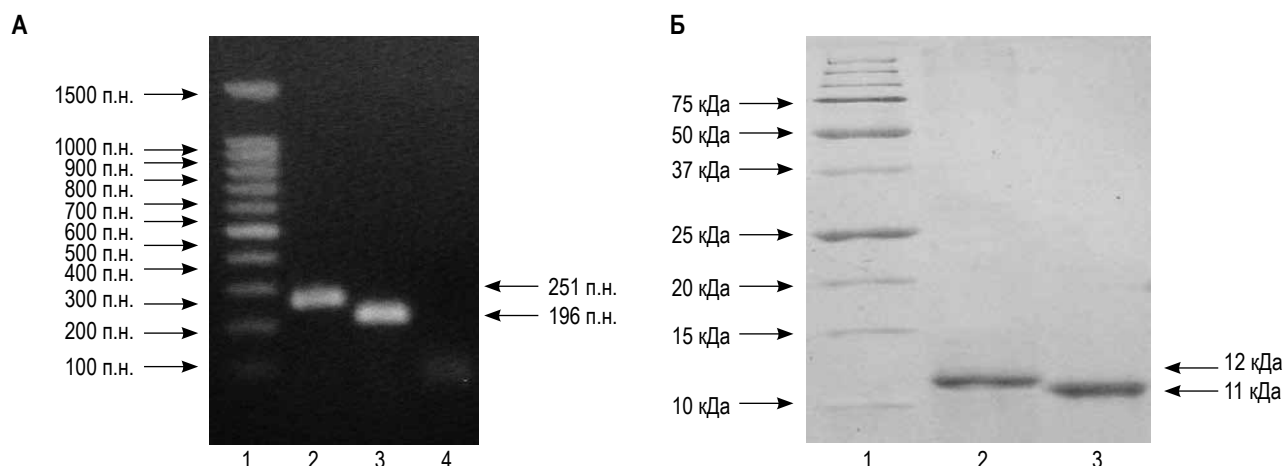
Рекомбинантные полипептиды SCPB1a и SCPB3a были выделены и очищены с помощью аффинной хроматографии на Ni-сефарозе и последующим диализом против 20 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,8. Молекулярные массы SCPB1a и SCPB3a были определены равными 12,0±0,5 кДа и 11,0±0,5 кДа соответственно (рис. 2Б).

**Изучение гуморального иммунного ответа на введение рекомбинантных полипептидов SCPB1a и SCPB3a.** Гуморальный иммунный ответ изучали по способности рекомбинантных полипептидов вызывать выработку специфических антител класса G. SCPB1a и SCPB3a подкожно вводили лабораторным мышам в присутствии адьюванта гидроокиси алюминия по схеме, описанной в материалах и методах. Нарастание титра специфических антител в крови у лабораторных мышей на введение SCPB1a и SCPB3a графически представлено на рисунке 3. Результаты иммунизации показали, что гуморальный иммунный ответ был более выраженным к SCPB3a как на начальных сроках иммунизации, так и в ходе всего



**Рисунок 1.** Схема аминокислотной последовательности С5а пептидазы СГВ

**Примечание.** СП – сигнальный пептид; D<sup>130</sup>, H<sup>193</sup>, S<sup>512</sup> – аминокислотные остатки, формирующие центр ферментативной активности.



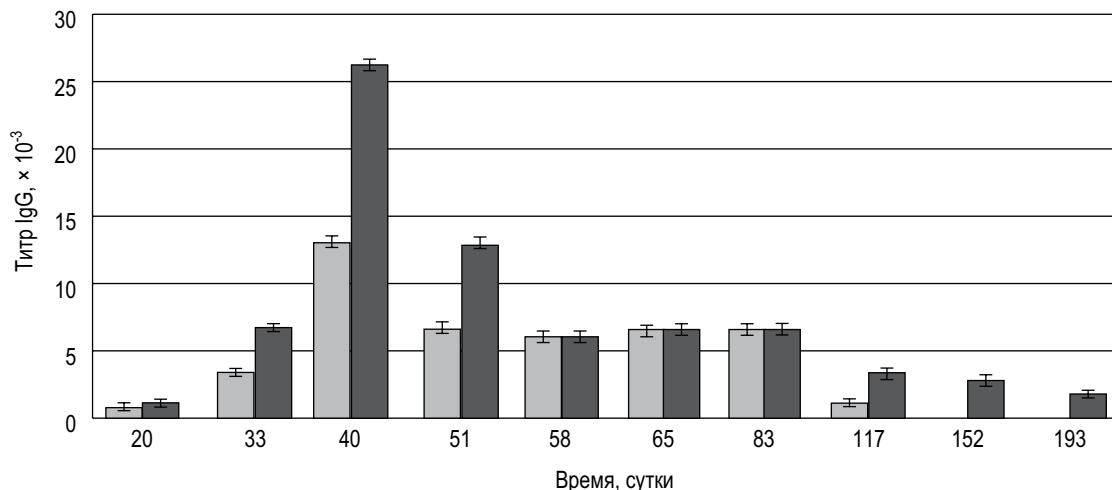
**Рисунок 2.** ДНК и SDS-PAGE электрофорезы

**Примечание.** А – ДНК электрофорез фрагментов *scpB1a* и *scpB3a*; 1 – ДНК маркер, 2 – фрагмент *scpB1a*, 3 – фрагмент *scpB3a*, 4 – отрицательный контроль. Б – 14% SDS-PAGE рекомбинантных полипептидов SCPB1a и SCPB3a после очистки с помощью Ni-сефарозы; 1 – маркеры М.М., 2 – SCPB1a, 3 – SCPB3a.

эксперимента, с максимальным значением титра антител  $1:2,56 \times 10^4$ . Максимальное значение титра антител к SCPB1a было определено равным  $1:1,28 \times 10^4$ . Анти-SCPB3a антитела определяли в титре  $1:3,2 \times 10^3$  в организме мышей даже спустя пять месяцев от начала иммунизации. Учитывая практически одинаковую молекулярную массу обоих полипептидов, можно предположить, что различия в иммуногенности полипептидов обусловлены как первичной, так и вторичной структурой их молекул. Более выраженная иммуногенность полипептида SCPB3a приводила к пролонгированной циркуляции специфических антител в организме, что является очевидным преимуществом в перспективе дальнейшего применения SCPB3a в качестве вакцинного препарата.

**Изучение безопасности рекомбинантных полипептидов.** Исследование безопасности полученных полипептидов проводили на примере SCPB3a с использованием мышшиной модели. В эксперименте группе из 5 мышей вводили внутривенно десятикратную дозу SCPB3a. Контрольной группе из 4 мышей вводили PBS. Массу тела, а также ряд показателей, характеризующих жизненную активность мышей, определяли в течение 10 дней. Через 10 дней после введения полипептидов наблюдали увеличение веса опытных мышей. Кроме того, не отмечали каких-либо отклонений по показателям жизненной активности между опытными и контрольными мышами (табл. 1). Выборочное вскрытие опытных мышей на 15-й день также не выявило каких-либо патологий основных внутренних органов по сравнению с контрольной группой. Таким образом, эксперименты подтвердили полную безопасность SCPB3a для организма мышей.

**Изучение антимикробных свойств специфических антител, вырабатываемых к SCPB1a и SCPB3a.** Для использования полипептидов в качестве компонентов вакцин существенным фактором является выработка специфических антител, обладающих антимикробными свойствами. В представленной работе изучение специфических антител, вырабатываемых к SCPB1a и SCPB3a, проводили в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*. В основе обеих моделей использовали опсонофагоцитоз, опосредованный мышшиными макрофагами. В экспериментах *in vitro* изучалась опсонизирующая способность мышшиных анти-SCPB1a и анти-SCPB3a антител в опытах с перитонеальными макрофагами от нормальных мышей. Перитонеальные макрофаги инкубировались с суспензией стрептококков, предварительно обработанных нормальной и иммунной (с максимальным титром специфических антител) сыворотками. Степень опсонизации оценивали по фагоцитарному индексу (ФИ), который представляет собой произведение процентной доли макрофагов с захваченными стрептококками, и среднего числа кокков на одну клетку макрофага. Отношение фагоцитарных индексов при обработке стрептококков иммунной и нормальной мышшиными сыворотками давало кратность увеличения ФИ, что позволяло количественно оценить опсонизирующую активность специфических антител в иммунных сыворотках. На рисунке 4 представлены результаты опсонофагоцитарного опыта с анти-SCPB1a сыворотками и шестью штаммами СГВ разных серотипов (5/70 (Iac), 60/59 (II), 5581 (III), 13/63 (III), 1/92 (IV), 10/84 (V)), а также с анти-SCPB3a сыворотками и пятью штаммами СГВ (60/59 (II), 13/63 (III), 1/92 (IV), 10/84 (V),



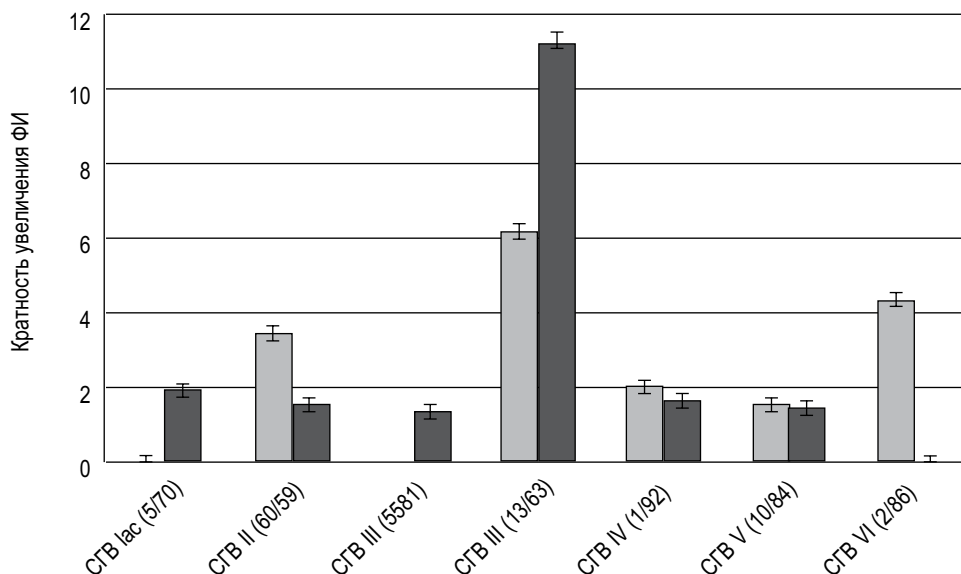
**Рисунок 3. Динамика изменения титра антител к SCPB1a и SCPB3a после иммунизации мышей подкожно**

**Примечание.** Иммунизация мышей SCPB1a (□) или SCPB3a (■) с адьювантом в соотношении 1:1, K = 100 мкг/мл и K = 50 мкг/мл на 1-й и 22-й дни соответственно.

2/86 (VI)). Кратность увеличения ФИ изменялась от 1,5 до 6,1 для анти-SCPB1a антител и от 1,3 до 11,2 для анти-SCPB3a антител. В обоих случаях существенное изменение ФИ указывало на положительную опсонизирующую активность антител, полученных к полипептидам SCPB1a и SCPB3a (рис. 4). Разные значения кратности увеличения ФИ зависели не только от серотипа СГВ, но также и от конкретного штамма внутри одного серотипа, как на примере СГВ штаммов 13/63 и 5581 III серотипа. Кратность увеличения ФИ как для анти-SCPB3a антител в 8,6 раз превышала этот показатель для штамма 13/63

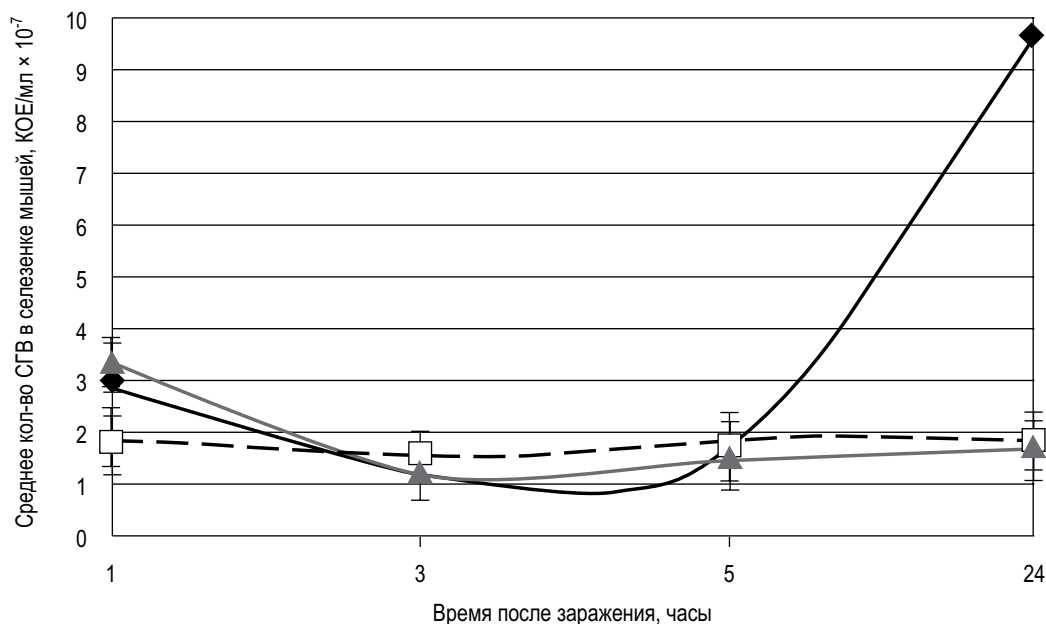
по сравнению со штаммом 5581 (рис. 4). Наиболее вероятным объяснением этого феномена являются различия, связанные со строением капсулы: мощная капсула стрептококковой клетки препятствует взаимодействиям специфических антител с поверхностной С5а пептидазой.

Анти-SCPB1a и анти-SCPB3a антитела также исследовали в экспериментах по активной защите *in vivo*. Трём группам лабораторных мышей подкожно были введены SCPB1a и SCPB3a и PBS (в качестве контроля) по схеме иммунизации, описанной в материалах и методах. На сроке с максимальной выработкой специ-



**Рисунок 4. Кратность увеличения фагоцитарных индексов (ФИ) перитонеальных мышечных макрофагов с использованием мышечных анти-SCPB1a и анти-SCPB3a сывороток**

**Примечание.** Кратность увеличения ФИ после инкубирования перитонеальных макрофагов от нормальных мышей со СГВ разных серотипов, обработанными анти-SCPB1a (□) или анти-SCPB3a (■) сыворотками.



**Рисунок 5. Динамика стрептококкового очага в селезенке мыши**

**Примечание.** Мышам предварительно подкожно вводили: PBS (◆ – контроль) или SCPB1a (□ – опыт), или SCPB3a (▲ – опыт) по схеме иммунизации; затем внутривбрюшинно вводили СГВ штамм 5/70 Iac серотипа в дозе LD<sub>50</sub> = 7,1 × 10<sup>7</sup> КОЕ/мл.

фических антител мышам внутривбрюшинно вводили СГВ штамма 5/70 Iac серотипа в дозе LD<sub>50</sub> = 5,0 × 10<sup>9</sup> КОЕ/мл для индукции генерализованной инфекции. Оценку развития инфекции проводили количественным подсчетом стрептококков после высева гомогенатов селезенок мышей на среду с кровавым агаром. В течение первых 5 ч наблюдали элиминацию стрептококков из селезенок как иммунных, так и контрольных мышей (рис. 5). Через 5 ч после заражения мышей в селезенках контрольной группы происходило интенсивное накопление СГВ (достигая через 24 ч значения 9,7 × 10<sup>7</sup> КОЕ/мл). На этих же сроках наблюдали дальнейшую элиминацию стрептококков из селезенок мышей, проиммунизированных SCPB1a и SCPB3a. Полученные данные убедительно демонстрируют антимикробные свойства специфических антител, полученных к обоим полипептидам.

## Обсуждение

Проведенные исследования по активной защите животных от стрептококковой инфекции в опытах *in vivo*, свидетельствуют о том, что циркулирующие в организме мыши анти-SCPB1a и анти-SCPB3a антитела были эффективно вовлечены в процесс элиминации стрептококков из организма. Эти эксперименты подтвердили полученные ранее результаты опсонофагоцитарного теста, в котором активность анти-SCPB1a

и анти-SCPB3a антител проявлялась усилением фагоцитирующей способности макрофагов.

C5a пептидаза давно привлекает внимание ученых и достаточно хорошо исследована [6-9, 19]. В представленной здесь работе впервые были изучены небольшие фрагменты C5a пептидазы, расположенные в N-терминальной и центральной части молекулы. Полученные результаты указывают на то, что эти части молекулы содержат эпитопы, ответственные индукцию антител класса G, способствующих опсонизации СГВ. Очевидный интерес представляет дальнейшая локализация предполагаемых эпитопов, несомненно, станет предметом будущих исследований.

Использование поверхностных белков стрептококковой клетки в качестве вакцинных препаратов для защиты человека от инфекционного процесса интенсивно развивается на протяжении последнего времени. Однако до сих пор по ряду причин еще не было получено эффективных вакцин против СГВ. Это обстоятельство привело к поиску других подходов для создания новых рекомбинантных вакцин. В представленной работе сделан первый, но существенный шаг в развитии этих технологий: было убедительно продемонстрировано, что рекомбинантные полипептиды SCPB1a и SCPB3a с малой молекулярной массой могут индуцировать активную выработку специфических антител с антимикробными свойствами. Предполагается дальнейшее использование

SCPВ1а и SCPВ3а в составе препаратов поликомпонентных вакцин, а также при создании вакцин на основе гибридных рекомбинантных полипептидов.

Работа выполнена при поддержке гранта 10-04-00750а.

## Список литературы

1. Грабовская К.Б., Леонтьева Г.Ф., Мерингова Л.Ф., Воробьева Е.И., Суворов А.Н., Тотолян А.А. Протективные свойства некоторых поверхностных рекомбинантных полипептидов стрептококков группы В // ЖМЭИ. – 2007. – № 5. – С. 44-51.
2. Дуплик Н.В., Королева И.В., Суворов А.Н. Клонирование, экспрессия и изучение иммунологических свойств рекомбинантного полипептида на основе С5а пептидазы стрептококков группы В // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. – С. 7-14.
3. Мерингова Л.Ф., Войцеховский Б.Л., Духин А.И., Крамская Т.А., Поляк Р.Я. Применение методов химической кинетики для оценки аффинитета циркулирующих свободных и связанных с антигеном антител (модель экспериментальный грипп) // Иммунология. – 1986. – № 6. – С. 48-51.
4. Суворов А.Н., Грабовская К.Б., Леонтьева Г.Ф., Мерингова Л.Ф., Королева И.В., Дуплик Н.В., Тотолян А.А. Рекомбинантные фрагменты консервативных белков стрептококков группы В как основа специфической вакцины // ЖМЕИ. – 2010. – № 2. – С. 44-50.
5. Baker C.J., Edwards M.S. Group B streptococcal conjugate vaccines // Arch. Dis. Child. – 2003. – Vol. 88. – P. 375-378.
6. Beckmann C., Waggoner J.D., Harris T.O., Tamura G.S. and Rubens C.E. Identification of Novel Adhesins from Group B Streptococci by Use of Phage Display Reveals that C5a Peptidase Mediates Fibronectin Binding // Infect. Immun. – 2002. – Vol. 70. – P. 2869-2876.
7. Bohnsack J.F., Chang J.K. and Hill H.R. Restricted ability of Group B Streptococcal C5a-ase to inactivate C5a prepared from different animal species // Immun. – 1993. – Vol. 61. – P. 1421-1426.
8. Cheng Q., Staflieni D., Purushothaman S.S., Cleary P. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasion // Infect. Immun. – 2002. – Vol. 70. – P. 2408-2413.
9. Chmouirgina I.I., Suvorov A.N., Ferrieri P., Cleary P.P. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 67. – P. 2387-2390.
10. Doran K.S., Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy // Mol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54. – P. 23-31.
11. Edwards M. S. and Baker C.J. Group B streptococcal infections // Infectious diseases of the fetus and the newborn infant / Ed. Remington J.S. and J.O. Klein. – The W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa. – 2001. – P. 1091-1156.
12. Edwards M.S., Baker C.J. Group B streptococcal infections in elderly adults // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41. – P. 839-847.
13. Heath P.T., Balfour G.F., Tighe H., Verlander N.Q., Lamagni T.L., Efstratiou A.; HPA GBS Working Group. Group B streptococcal disease in infants: a case control study. // Arch. Dis. – Child. – 2009. – Vol. 94. – P. 674-680.
14. Jackson L.A., Hilsdon R., Farley M.M., Harrison L.H., Reingold A.L., Plikaytis B.D., Wenger J.D., Schuchat A. Risk factors for group B streptococcal disease in adults // Ann. Intern. Med. – 1995. – Vol. 123. – P. 415-420.
15. Larsson C., Stalhammar-Carlemalm M. and Lindahl G. Protection against experimental infection with group B streptococcus by immunization with a bivalent protein vaccine // Vaccine. – 1999. – Vol. 17. – P. 454-458.
16. Levent F., Baker C.J., Rench M.A., Edwards M.S. Early outcomes of group B streptococcal meningitis in the 21st century // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2010.
17. Lowry O.H., Rosenbraugh N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Mol. Biol. – 1957. – Vol. 193. – P. 265-273.
18. Paoletti L.C., Wessels M.R., Rodewald A.K., Shroff A.A., Jennings H.J. and Kasper D.L. Neonatal mouse protection against infection with multiple group B streptococcal (GBS) serotypes by maternal immunization with a tetravalent GBS polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine // Infect. Immun. – 1994. – Vol. 62. – P. 3236-3243.
19. Takahashi S., Nagano Y., Nagano N., Hayashi O., Taguchi F., Okuwaki Y. Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing // Infect. Immun. – 1995. – Vol. 63. – P. 4764-4769.
20. Yang H.H., Samantha J., Mascuch, Lawrence C. Madoff and Lawrence C. Paoletti. Recombinant Group B *Streptococcus* Alpha-Like Protein 3 Is an Effective Immunogen and Carrier Protein // Clin. Vaccine Immunol. – 2008. – Vol. 15. – P. 1035-1041.

поступила в редакцию 21.10.2010

отправлена на доработку 30.11.2010

принята к печати 09.12.2010