

# КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА НА ОСНОВЕ C5a ПЕПТИДАЗЫ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В

Дуплик Н.В., Королева И.В., Суворов А.Н.

Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН», Санкт-Петербург

**Резюме.** Полученный с помощью полимеразной цепной реакции фрагмент гена, кодирующий N-терминальную аминокислотную последовательность C5a пептидазы стрептококка группы В (СГВ), был проклонирован в гетерологичной системе *E. coli*. Рекombинантный полипептид SCPB1 был экспрессирован в *E. coli* и аффинно очищен с помощью Ni-сефарозы. Молекулярная масса SCPB1 оказалась равной  $43,0 \pm 0,5$  kDa. Иммуногенные свойства SCPB1 изучали в опытах по иммунизации лабораторных животных. Максимальный титр специфических антител класса G к SCPB1 в иммунных сыворотках ( $1:5,1 \times 10^4$  и  $1:1,6 \times 10^6$  для мышей и кроликов соответственно) позволяет утверждать, что SCPB1 обладает иммуногенностью. Кроме того, в сыворотках от женщин, перенесших СГВ-инфекцию, также обнаруживались антитела к SCPB1, что свидетельствует о гуморальном иммунном ответе человеческого организма на исследуемую часть C5a пептидазы. Протективные свойства антител к SCPB1 были продемонстрированы *in vitro* (опсонофагоцитарный тест) и *in vivo* (модель генерализованной инфекции у мышей).

**Ключевые слова:** стрептококк группы В, C5a пептидаза, рекombинантный полипептид SCPB1, иммуногенность, антитела.

Duplik N.V., Koroleva I.V., Suvorov A.N.

## CLONING, EXPRESSION AND STUDY OF IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF THE STREPTOCOCCI GROUP B C5a PEPTIDASE RECOMBINANT PROTEIN

**Abstract.** Molecular mass of SCPB1 was estimated to be equal to  $43.0 \pm 0.5$  kDa. Immunization experiments were performed in laboratory animals to investigate the SCPB1 immunogenic properties. Maximum titers of IgG antibodies against SCPB1 ( $1:5,1 \times 10^4$  и  $1:1,6 \times 10^6$  for mice and rabbits, respectively) indicated to SCPB1 immunogenicity. Moreover, the antibodies against SCPB1 were revealed in sera from women infected with GBS thus designating the humoral immune response of human organism to C5a peptidase fragment under study. Protective properties of anti-SCPB1 antibodies against were demonstrated by experiments *in vitro* (opsonophagocytosis), and *in vivo* (a model of GBS infection in mice). (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 1, pp 7-14)

## Введение

*Streptococcus agalactiae* или стрептококк группы В (СГВ) как вид был идентифицирован в конце XIX века в качестве возбудителя коровьего мастита. Однако внимание ученых он привлек лишь в конце 30-х годов XX века, когда было показано,

что этот микроорганизм вызывает ряд болезней у человека [14, 15]. В настоящее время известно, что СГВ является естественным обитателем прямой кишки человека и входит в состав условно патогенной вагинальной флоры женщин. Наряду с этим СГВ может вызывать различную патологию беременности, в том числе выкидыши, внутриутробное поражение плода, преждевременные роды. СГВ приводит к развитию серьезных инфекций у новорожденных, таких как сепсис, пневмония и менингит. Особую опасность стрептококковая инфекция представляет в форме молниеносного сепсиса у детей не старше 10 дней, приводя к высокой смертности младенцев [15].

### 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

В качестве основного фактора патогенности СГВ рассматривают типоспецифический капсулярный полисахарид вследствие его выраженных иммуногенных и антифагоцитарных свойств [16]. Вместе с тем в ходе изучения СГВ были выделены и охарактеризованы многие поверхностные и секреторные белки, также участвующие в формировании вирулентного фенотипа микроба. Одним из таких факторов патогенности является клеточно-связанный белок с молекулярной массой 125 kDa — С5а пептидаза. Свое название белок получил благодаря способности расщеплять С5а компонент комплемента человека, обезьяны и коровы [5]. С5а компонент комплемента обладает свойствами анафилотоксина и стимулирует привлечение в очаг инфекции полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов. Инактивация С5а компонента комплемента С5а пептидазой приводит в конечном итоге к подавлению иммунного ответа со стороны организма хозяина.

Позже учеными была обнаружена способность связывания С5а пептидазой фибронектина — белка, который присутствует на многих эукариотических клетках. Предполагается, что связывание фибронектина С5а пептидазой способствует адгезии и инвазии СГВ в эпителиальные клетки организма хозяина [4]. Также было продемонстрировано, что С5а пептидаза непосредственно способствует инвазии СГВ в эпителиальные клетки организма хозяина [8].

Ряд авторов рассматривают С5а пептидазу в качестве потенциального компонента для создания вакцины против СГВ, так как она обладает такими преимуществами, как консервативность и высокая распространенность среди СГВ. Хорошо известно, что ген (*scpB*), кодирующий этот белок, присутствует у всех штаммов СГВ. Кроме того, экспериментально была показана высокая гомология *scpB* не только внутри своей группы, но и с геном (*scpA*), кодирующим С5а пептидазу стрептококка группы А [10, 11].

Целью данного исследования стало создание рекомбинантного полипептида на основе С5а пептидазы СГВ, обладающего высокой иммуногенностью и протективностью, для возможного использования его в качестве компонента поливалентного вакцинного средства.

## 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), 55/81 (III), 72/93 (III), 2/68 (VI); референс-штамм *Streptococcus pyogenes* NZ131 (M49); штамм *Escherichia coli* M15 из микробиологической коллекции Национального центра ВОЗ по изучению стрептококков (Санкт-Петербург, Россия). СГВ культивировали на сре-

де THB (Difco, США) при 37 °С в течение 12 часов. Клетки *E. coli* выращивали на среде ВН1 (Gibco, США) с добавлением канамицина до конечной концентрации 25 мкг/мл при 37 °С и интенсивном перемешивании в течение 12 часов. Для получения рекомбинантного полипептида трансформанты *E. coli* выращивали на среде ВН1 с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и канамицина (25 мкг/мл) при 37 °С и интенсивном перемешивании.

**Генетические методы.** Амплификацию фрагмента гена *scpB* (*scpB1*) на матрице хромосомной ДНК штамма 090R осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и специально сконструированных праймеров Scpb61 (5'-TC CTGGATCCGAACAAACCGTAGAACTCCAC) и Scpb62 (5'-TCTTGGAGCTCGGCTGTTTGTGAC CСТАACAGT). ПЦР проводили в амплификаторе с активным регулированием («Терцик», Россия). Смесь инкубировали при 94 °С в течение 2 минут. Далее задавали программу на цикл денатурации 94 °С в течение 15 секунд, цикл отжига праймеров 68 °С в течение 15 секунд, цикл синтеза ДНК 72 °С в течение 20 секунд. Последовательность таких циклов повторяли 35 раз. Потом смесь дополнительно инкубировали при 72 °С в течение 1 минуты. После разделения в 1,0% агарозном геле *scpB1* 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 рекомбинантного полипептида из культуры штамма-продуцента *E. coli* M15-C1 проводили трехкратным разрушением клеток ультразвуком по 20 секунд (с перерывом в 40 секунд) в ультразвуковом дезинтеграторе (УЗДН-1У4.2, Россия). Лизат клеток центрифугировали при 13400 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость пропускали через 0,2 мкм фильтры (Millipore, США). Очистку рекомбинантного полипептида осуществляли методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-сефарозой (Amersham, США) согласно протоколу фирмы.

SDS-электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле (PAGE) в вертикальном пластинчатом аппарате Mini-PROTEAN II (BioRad, США). Молекулярную массу (ММ) рекомбинантного полипептида оценивали в SDS-PAGE, сравнивая его подвижность с подвижностью белков с известными молекулярными массами (ММ = 10-250 kDa, «Precision Plus Protein Standards», Bio-Rad, США) на одной и той же пластинке геля. Количественное определение белка в растворах проводили по методу Лоури [13].

**Иммунологические методы.** Иммунный ответ к SCPB1 изучали на беспородных белых мышах (самцах массой 16–18 г) и кроликах (самках массой 2,5 кг), полученных из питомника «Рапполово», РАМН. Иммунизацию проводили двукратно и подкожно с адъювантом гидроокиси алюминия (Pierce, США). В эксперименте использовали 30 мышей и 4 кролика, которым вводили по 0,2 мл и 0,5 мл SCPB1 с адъювантом в соотношении объемов 1:1 соответственно. Для мышей конечная концентрация SCPB1 ( $K_{SCPB1}$ ) при 1-й инъекции составляла 100 мкг/мл и при второй инъекции 50 мкг/мл; инъекции проводили на 1-й и 22-й дни соответственно. Для кроликов при 1-й инъекции конечная концентрация SCPB1 была 240 мкг/мл и при второй инъекции 120 мкг/мл, которые проводили на 1-й и 28-й дни соответственно.

Наличие сывороточных специфических антител к SCPB1 определяли, используя пул сывороток от 4-х животных методом иммуноферментного анализа, как описано [2]. Для детекции IgG-антител использовали белок А стафилококка, ковалентно связанный с пероксидазой хрена, в концентрации  $10^{-7}$  моль/л. Для визуализации реакции использовали 0,5 мкг/мл о-фенилендиамин в 150 мМ фосфатно-цитратном буфере (pH = 5,0) с добавлением 30% перекиси водорода. Реакцию регистрировали при длине волны 492 нм с помощью прибора Anthos 2010 (Anthos, Австрия).

Опсонизирующую активность антител к SCPB1 изучали на суточном монослое мышинных перитонеальных макрофагов, как описано у Грабовской К.Б. с соавторами [1]. Стрептококковую суспензию в концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл после предварительной инкубации (при 37 °С, 30 мин, 5%  $CO_2$ ) с сыворотками (в разведении 1:50) добавляли к макрофагам (при 37 °С, 30 мин, 5%  $CO_2$ ). При микроскопии окрашенного монослоя макрофагов исследовали не менее 100 макрофагов в каждой из трех параллельных пробах. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента–Фишера.

Исследование протективных свойств антител к SCPB1 проводили в опытах генерализованной СГВ инфекции мышей. Мышам предварительно подкожно вводили забуференный физиологический раствор, pH = 7,4 (PBS) или SCPB1 (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 опытной группах. Обеим группам мышей внутрибрюшинно вводили СГВ штамм 5/70 1ас серотипа в дозе  $LD_{50} = 2,7 \times 10^7$  КОЕ/мл. Оценку протективности мышинных антител к SCPB1 проводили путем определения количества СГВ в селезенке на разных сроках развития инфекции (по 3 мыши на каждый срок), высеивая на чашки с кровяным агаром серию десятикратных разведений каж-

дого 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 программы 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.

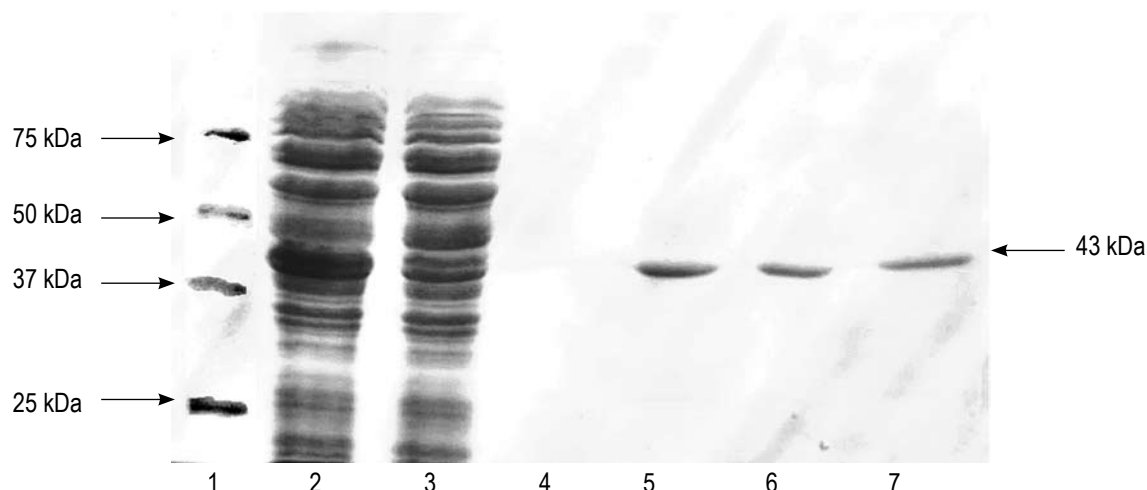
## Результаты

**Клонирование *scpB1* и получение рекомбинантного полипептида SCPB1.** Для клонирования фрагмента гена *scpB* (*scpB1*), кодирующего N-терминальную часть C5a пептидазы СГВ, была выделена хромосомная ДНК референс-штамма 090R 1а серотипа. Фрагмент *scpB1* размером 936 п.н. был получен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специально сконструированных праймеров (раздел «Материалы и методы»). При подготовке к клонированию была проведена двойная рестрикция выделенного из агарозы *scpB1* и ДНК-вектора ферментами BamHI и SacI с образованием липких концов.

Фрагмент *scpB1* был успешно проклонирован в экспрессионном плазмидном векторе pQE-30. Полученную рекомбинантную плазмидную ДНК, обозначенную как pQE-30-1, трансформировали в гетерологичную систему *E. coli* M15. Трансформанты были выращены на твердой среде с добавлением антибиотиков. В качестве отрицательного контроля высевали чистую культуру клеток *E. coli* M15. Из клонов-трансформантов были отобраны клоны, содержащие рекомбинантную плазмиду pQE-30-1. pQE-30-1 идентифицировали с помощью ПЦР с использованием исходных праймеров и последующим электрофоретическим анализом полученных фрагментов ДНК в 1,5% агарозном геле. Штамм-продуцент рекомбинантного полипептида SCPB1 получил название *E. coli* M15-C1.

Для получения очищенного препарата рекомбинантного полипептида клетки *E. coli* M15-C1 культивировали на бульоне ВНИ с добавлением антибиотиков до поздней логарифмической фазы роста ( $OD_{600} = 0,7-0,9$ ). Экспрессию рекомбинантного полипептида индуцировали добавлением изопропил-бета-D-тиогалактопиранозиды (IPTG), и клетки культивировали дополнительно от 2 до 6 часов. Максимальную экспрессию SCPB1 наблюдали при 4 часах инкубации после добавления IPTG.

Полученный после аффинной хроматографии на Ni-сефарозе SCPB1 был диализован против



**Рисунок 1. SDS-PAGE рекомбинантного полипептида SCPB1 на разных стадиях очистки с помощью Ni-сефарозы**

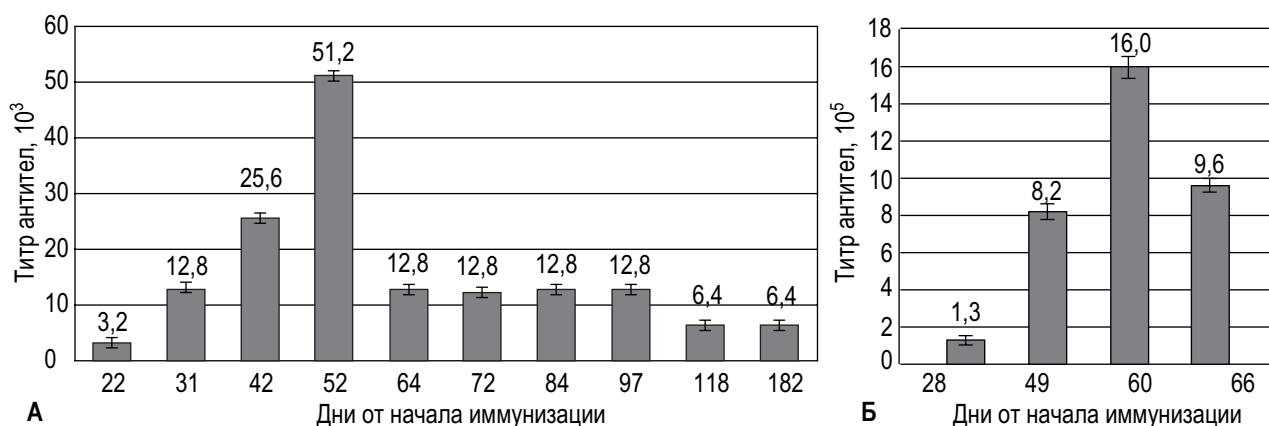
**Примечания.** 1 – маркеры М.М.; 2 – супернатант белков после ультразвукового вскрытия клеток *E. coli* M15–C1; 3 – препарат белков, не связавшихся с Ni-сефарозой; 4 – фракция буфера после отмывки Ni-сефарозы 30-кратным объемом буфера; 5, 6, 7 – фракции препарата чистого белка ( $K = 0,5$  мг/мл) при элюции в градиенте имидазола от 20 мМ до 500 мМ.

20 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7,8 с добавлением 500 мМ NaCl. Рисунок 1 представляет разные стадии очистки SCPB1.

Молекулярную массу рекомбинантного полипептида SCPB1 определили равной  $43,0 \pm 0,5$  kDa.

**Динамика изменения титра антител к рекомбинантному полипептиду SCPB1 после иммунизации лабораторных животных.** Для оценки иммуногенности полипептида SCPB1 были проведены эксперименты по подкожной иммунизации мышей и кроликов по схеме, описанной в материалах и методах. Титр антител к SCPB1 (анти-SCPB1-антител) определяли в сыворотках на разных сроках от начала иммунизации. Через три недели от первой инъекции было отмечено появление в крови животных специфических IgG-антител к SCPB1 (рис. 2). Значения титров антител ( $1:3,2 \times 10^3$  и  $1:1,3 \times 10^5$  у мышей и кроликов соот-

ветственно) перед бустированием уже свидетельствовали об иммуногенности SCPB1. Повторная инъекция резко усилила выработку анти-SCPB1-антител. Следует отметить, что в организме кроликов регистрировали образование анти-SCPB1-антител на два порядка выше по сравнению с мышинными антителами. Максимальные значения титров специфических антител к рекомбинантному полипептиду наблюдали на 52 день у мышей ( $1:5,1 \times 10^4$ ) и на 64 день у кроликов ( $1:1,6 \times 10^6$ ) от начала иммунизации. Кроме того, на мышинной модели было продемонстрировано медленное снижение титра специфических антител: с максимального значения до значения  $1:1,3 \times 10^4$  на 64 день, которое сохранялось в течение следующих двух месяцев. Только на 118 день от начала иммунизации было отмечено дальнейшее снижение титра до значения  $1:0,6 \times 10^4$ .



**Рисунок 2. Динамика изменения титра антител к SCPB1**

**Примечания.** А – иммунизация мышей SCPB1 пополам с адьювантом, KSCPB1 = 100 мкг/мл и KSCPB1 = 50 мкг/мл на 1-й и 22-й дни соответственно; Б – иммунизация кроликов SCPB1 пополам с адьювантом, KSCPB1 = 240 мкг/мл и KSCPB1 = 120 мкг/мл на 1-й и 28-й дни соответственно.

**Определение титра антител (IgG) в сыворотках от больных СГВ к рекомбинантному полипептиду SCPB1.** Для получения дополнительных доказательств об иммуногенности SCPB1 были протестированы сыворотки от женщин, колонизированных СГВ (получены из НИИАиГ им. Д.О. Отто, РАМН). Данные, представленные в таблице 1, показывают, что сыворотки от всех 13 обследованных женщин содержали анти-SCPB1-антитела класса G. Более того, в сыворотках 9 женщин были обнаружены анти-SCPB1 IgG в высоком титре. Для сравнения результатов была использована нормальная сыворотка, полученная от 3 здоровых женщин. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в сыворотках от больных среди антител, образовавшихся к интактной стрептококковой клетке в ходе гуморального иммунного ответа, также вырабатывались специфические антитела на исследуемую часть C5a пептидазы.

**Изучение опсонизирующей эффективности кроличьих анти-SCPB1-антител *in vitro*.** Опсонизирующую активность антител, стимулированных введением рекомбинантного полипептида SCPB1, изучали на монослое мышинных перитонеальных макрофагов методом микроскопии. Макрофаги были проинкубированы в присутствии суспензии стрептококков, заранее обработанных нормальной и иммунной (значение титра:  $1:9,6 \times 10^5$ ) кроличьими сыворотками. Степень опсонизации оценивали по фагоцитарному индексу (ФИ), который представляет собой произведение процентной доли макрофагов, захвативших стрептококки, и среднего числа кокков на одну клетку.

С использованием нормальной и иммунной кроличьих сывороток исследовали шесть штаммов стрептококка группы В разных серотипов (Ia, Iac, II, III, VI) и один штамм стрептококка

группы А (СГА) серотипа М49 (табл. 2). Кратность увеличения фагоцитарного индекса при обработке стрептококков иммунной и нормальной кроличьими сыворотками свидетельствует об опсонизирующей активности антител, полученных к SCPB1, и, как следствие, об их протективных свойствах. Представленные в таблице 2 результаты указывают также на то, что кроличья иммунная сыворотка обладает опсонизирующей активностью не только в отношении СГВ разных серотипов, но и в отношении СГА.

**Изучение протективных свойств мышинных анти-SCPB1-антител на мышах, инфицированных СГВ.** Протективная эффективность антител, полученных к рекомбинантному полипептиду SCPB1, была дополнительно изучена *in vivo* на мышинной модели генерализованной инфекции.

В экспериментах *in vivo* лабораторным мышам сначала вводили подкожно SCPB1 или физиологический раствор (в качестве контроля) по схеме иммунизации, описанной в материалах и методах. Затем обеим группам мышей внутрибрюшинно вводили суспензию СГВ в сублетальной дозе на сроках с максимальной выработкой IgG-антител к белку SCPB1 (52-й день от начала иммунизации). Контроль развития инфекции осуществляли высевом стрептококков из гомогената селезенки мышей на разных сроках после введения СГВ на среду с кровавым агаром. Как видно из данных рисунка 3, через 1 час после заражения мышей количество высеваемых колоний в опытной и контрольной группах было приблизительно одинаковым. Однако на более поздних сроках в опытной группе мышей происходила интенсивная элиминация стрептококков из селезенки. В контрольной группе мышей наблюдали совершенно противоположную картину: на первых часах шло накопление чис-

ТАБЛИЦА 1. ТИТРЫ АНТИТЕЛ (IgG) К SCPB1 В СЫВОРОТКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ СГВ

Порядковый номер	Номер сыворотки	Титр антител (IgG) к SCPB1
1	Нормальная сыворотка*	$1:0,4 \times 10^3$
2	4849gl	$1:0,6 \times 10^3$
3	3598gl	$1:1,6 \times 10^3$
4	2607gl	$1:1,6 \times 10^3$
5	5218gl	$1:1,6 \times 10^3$
6	2207gl	$1:3,2 \times 10^3$
7	3693gl	$1:3,2 \times 10^3$
8	6558gl	$1:3,2 \times 10^3$
9	2359gl	$1:3,2 \times 10^3$
10	3252gl	$1:3,2 \times 10^3$
11	2971a	$1:3,2 \times 10^3$
12	2655gl	$1:1,3 \times 10^4$
13	5150gl	$1:1,3 \times 10^4$
14	5358gl	$1:2,7 \times 10^4$

Примечание. \* – сыворотка, полученная от здоровых женщин.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПСОНОФАГОЦИТАРНОГО ТЕСТА НА МОНОСЛОЕ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МЫШИНЫХ МАКРОФАГОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОРМАЛЬНОЙ И ИММУННОЙ КРОЛИЧЬИХ СЫВОРОТОК

Штамм	Сыворотка	Показатели опсонофагоцитоза			
		Макрофаги, захватившие кокки (%)	Среднее число кокков на клетку; $\pm 0,5$	ФИ	Кратность увеличения ФИ
СГВ Ia (090R)	нормальная	23	1,5	35	
	анти-SCPВ1	47	4,0	188	5,4
СГВ Iac (5/70)	нормальная	50	2,5	125	
	анти-SCPВ1	89	8,0	712	5,7
СГВ II (60/59)	нормальная	36	1,6	58	
	анти-SCPВ1	69	5,4	373	6,4
СГВ III (55/81)	нормальная	38	2,2	84	
	анти-SCPВ1	51	3,5	179	2,1
СГВ III (72/93)	нормальная	71	10,0	710	
	анти-SCPВ1	92	15,4	1417	2,0
СГВ VI (2/68)	нормальная	23	1,0	23	
	анти-SCPВ1	40	2,5	90	3,9
СГА М49 (NZ131)	нормальная	40	5,8	232	
	анти-SCPВ1	82	16,3	1337	5,8

ла СГВ в селезенке мышей, достигая значения  $2,5 \times 10^7$  КОЕ/мл на 5 час и максимального значения  $5,6 \times 10^7$  КОЕ/мл на 24 час после заражения. Этот процесс сопровождался падежом мышей в контрольной группе. Только через 24 часа в контрольной группе начиналась естественная

элиминация стрептококков из селезенки. Тем не менее даже через 48 часов в контрольной группе мышей высевалось до  $2,1 \times 10^7$  КОЕ/мл.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно утверждать, что иммунизация рекомбинантным полипептидом SCPВ1 повышает устойчивость организма мышей при развитии генерализованной инфекции СГВ.

## Обсуждение

Создание рекомбинантного полипептида SCPВ1 представляет как теоретический, так и практический интерес благодаря особенностям С5а пептидазы СГВ. Полученный SCPВ1 несет 309 аминокислотных остатков, входящих в N-терминальную часть аминокислотной последовательности С5а пептидазы (рис. 4). Компьютерный анализ полной аминокислотной последовательности С5а пептидазы СГВ (1271 аминокислотных остатков) показал существование нескольких антигенных детерминант. При создании SCPВ1 учитывали, что его аминокислотная последовательность должна была содержать две активные антигенные детерминанты.

В представленной работе был получен фрагмент С5а пептидазы, который выступает за пределы клеточной стенки бактерии. Предполагалось, что антитела к SCPВ1, выработанные в ходе иммунного ответа, будут в случае инфицирования организма *Streptococcus agalactiae* блокировать прежде всего эту наиболее доступную часть С5а пептидазы. Также нами принималось во вни-

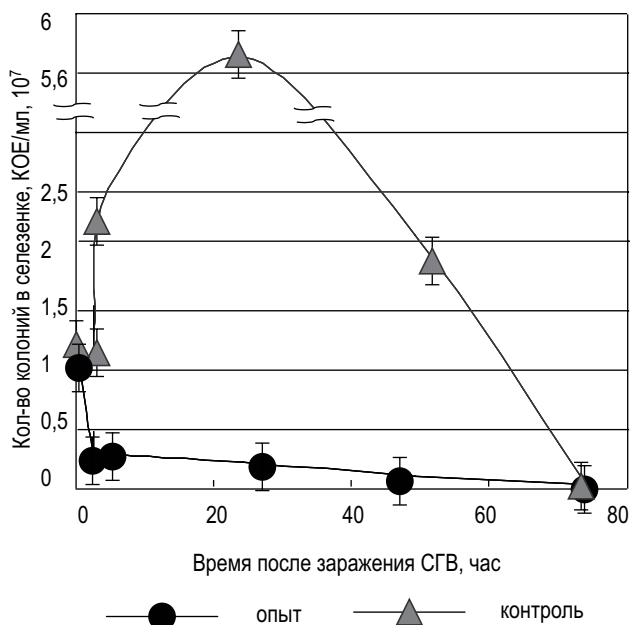


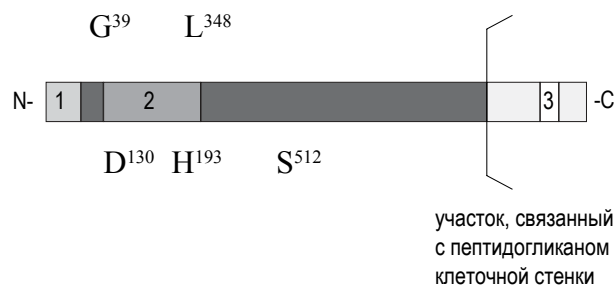
Рисунок 3. Динамика стрептококкового очага в селезенке мыши

**Примечание.** Мышам предварительно подкожно вводили: PBS (контроль) или SCPВ1 (опыт) по схеме иммунизации; затем внутрибрюшинно вводили СГВ штамм 5/70 Iac серотипа в дозе  $LD_{50} = 2,7 \times 10^7$  КОЕ/мл.

мание, что антитела к SCPB1 будут эффективными в отношении большинства штаммов СГВ, поскольку N-терминальная часть С5а пептидазы высоко консервативна и присутствует у всех штаммов СГВ.

В ранее опубликованных работах было продемонстрировано, что С5а пептидаза СГВ вызывает выраженный гуморальный иммунный ответ в организме лабораторных животных (мышей и кроликов) при использовании различных схем иммунизации и разных адъювантов [7, 9]. Следует отметить, что эксперименты проводились с полноразмерным белком, который сохранял свою ферментативную активность. Известно, что С5а пептидаза не расщепляет С5а компонент комплемента мыши и кролика. До сих пор не обсуждался негативный побочный эффект при возможном использовании в качестве вакцинного препарата С5а пептидазы, способной расщеплять С5а компонент комплемента человека. Нашей целью было исключить любой, даже незначительный риск, связанный с этой особенностью С5а пептидазы. Cleary с соавторами ранее показали, что при формировании третичной структуры белка каталитический центр С5а пептидазы образуют три аминокислотных остатка: аспарагиновая аминокислота ( $D^{130}$ ), гистидин ( $H^{193}$ ) и серин ( $S^{512}$ ) [11]. В представленной работе был создан рекомбинантный полипептид лишь с двумя аминокислотными остатками ( $D^{130}$  и  $H^{193}$ ), что гарантирует отсутствие ферментативной активности SCPB1 (рис. 4).

Иммуногенные свойства SCPB1 изучали на мышах и кроликах, применяя известную схему иммунизации подкожного введения полипептида. Сравнение максимальных значений титров специфических антител класса G ( $1:5,1 \times 10^4$  и  $1:1,6 \times 10^6$  для мышей и кроликов соответственно) позволяет сделать вывод об очевидной иммуногенности полипептида SCPB1. Кроме того, на мышинной модели была продемонстрирована длительная циркуляция анти-SCPB1-антител в течение шести месяцев от начала эксперимента с сохранением высокого значения титра. Пролонгированное действие специфических антител в организме имеет существенное значение при создании вакцинного препарата, поскольку повышает эффективность применения вакцины в профилактических целях, что особенно важно при использовании вакцины для беременных женщин. Хорошо известно, что материнские антитела класса G проходят через плацентарный барьер и защищают плод. В литературе также описано, что беременные женщины с высоким уровнем опсонизирующих антител к СГВ рожали детей с высокой степенью защиты против СГВ. В сыворотках от женщин, колонизированных СГВ (НИИ акушерства и гинекологии имени Д.О. Отто) нами были обнаружены анти-SCPB1-антитела класса G в высоком титре более чем



**Рисунок 4. Схема аминокислотной последовательности С5а пептидазы СГВ**

**Примечание.** 1 – сигнальный пептид; 2 – аминокислотная последовательность SCPB1, G39 и L348 – концевые аминокислотные остатки SCPB1; 3 – LPXTN-мотив; D130, H193, S512 – аминокислотные остатки, формирующие центр ферментативной активности.

у половины женщин, что свидетельствует о выраженном гуморальном ответе человеческого организма на исследуемую часть С5а пептидазы.

В представленной работе были продемонстрированы протективные свойства как кроличьих анти-SCPB1-антител *in vitro* в опсонофагоцитарном тесте, так и мышинных анти-SCPB1-антител *in vivo* на модели развития генерализованной инфекции. Основой опсонофагоцитарного теста является процесс фагоцитоза, опосредованного специфическими антителами (опсонофагоцитоз), что представляет собой основной защитный механизм макроорганизма от бактериальной инфекции. Связывание бактерий с поверхностью макрофага в процессе опсонофагоцитоза происходит за счет взаимодействия Fc-рецепторов макрофага с Fc-частью антител, опсонизирующих микробные клетки.

Результаты опсонофагоцитарного теста показали, что кроличьи анти-SCPB1-антитела усиливали фагоцитоз перитонеальными мышинными макрофагами в отношении всех исследованных в эксперименте серотипов стрептококков группы B (Ia, Iac, II, III, VI) с изменением фагоцитарного индекса от 2,0 до 6,4. Кроме этого, анти-SCPB1-антитела оказывали опсонизирующее действие и в отношении стрептококков группы A (штамм M49 серотипа). Этот опыт подтвердил ранее высказанное предположение о перекрестных свойствах специфических антител к С5а пептидазе СГВ, основанных на высокой гомологии С5а пептидаз СГА и СГВ. На мышинной модели генерализованной инфекции было показано, что анти-SCPB1-антитела эффективно защищают мышей от гибели при внутрибрюшинном заражении СГВ. Также нами на мышинной модели были получены данные, свидетельствующие об отсутствии токсичности рекомбинантного полипептида SCPB1 (сведения не представлены).

При первых попытках создания вакцин против СГВ ученые использовали антигены капсулярного полисахарида [3]. Эти вакцины оказались весьма продуктивными, однако только против стреп-

тококов тех серотипов, полисахариды которых входили в состав вакцины. Это привело к продолжению поиска в данном направлении и созданию вакцин с применением белковых компонентов СГВ. В настоящее время ученые считают, что оптимальной будет комбинация нескольких белковых компонентов и, в частности, комбинация нескольких белковых компонентов с капсулярным полисахаридом [12]. Важными доводами в пользу этого являются следующие аргументы: бактериальный антиген должен экспрессироваться всеми штаммами СГВ, и стрептококковая клетка представляет собой сложную систему, где на различных стадиях инфекционного процесса разные компоненты клетки играют доминирующую роль.

Подводя итог проделанной работе, можно заключить, что полученный рекомбинантный полипептид SCPV1 по своим свойствам (таким как консервативность структуры, иммуногенность, протективность и отсутствие токсичности) может быть использован в качестве одного из компонентов при создании вакцины против СГВ.

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 06-04-48949, РФФИ офи № 06-04-08026 и грантом от Правительства Санкт-Петербурга в 2008 году для молодых ученых и молодых кандидатов наук вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

## Благодарность

За помощь в изучении протективных свойств антител к SCPV1 выражаем благодарность сотрудникам Отдела молекулярной микробиологии ГУ НИИЭМ РАМН Грабовской К.Б. и Леонтьевой Г.Ф., Дуплик Н.В., Королевой И.В., Суворову А.Н.

## 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. 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.
3. Baker C.J., Rensch M.A., Edwards M.S. Immunization of pregnant woman with a polysaccharide vaccine of Group B streptococci // N. Engl. J. Med. — 1988. — Vol. 319, N 18. — P. 1180-1185.
4. Beckmann C., Waggoner J.D., Harris T.O., Tamura G.S., 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, N 6. — P. 2869-2876.
5. Bohnsack J.F., Chang J.K., Hill H.R. Restricted ability of Group B Streptococcal C5a-ase to inactivate C5a prepared from different animal species // Infect. Immun. — 1993. — Vol. 61. — N 4. — P. 1421-1426.
6. Chen C.C., Cleary P.P. Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes* // J. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 265, N 6. — P. 3161-3167.
7. Cheng Q., Debol S., Lam H., Eby R., Edwards L., Matsuka Y., Olmsted S., Cleary P. Immunization with C5a Peptidase or Peptidase-Type III Polysaccharide Conjugate Vaccines Enhances Clearance of Group B Streptococci from Lungs of Infected Mice // Infect. Immun. — 2002. — Vol. 70, N 11. — P. 6409-6415.
8. Cheng Q., Stafslie 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, N 5. — P. 2408-2413.
9. Cheng Q., Carlson B., Pillai S., Eby R., Edwards L., Olmsted S.B., Cleary P. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci // Infect. Immun. — 2001. — Vol. 69, N 4. — P. 2302-2308.
10. 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, N 7. — P. 2387-2390.
11. Cleary P.P., Handley J., Suvorov A.N., Podbielski A., Ferrieri P. Similarity between the group B and A streptococcal C5a peptidase genes // Infect. Immun. — 1992. — Vol. 60, N 10. — P. 4239-4244.
12. Heath P.T., Feldman R.G. Vaccination against Group B streptococcus // Expert Rev. Vaccines. — 2005. — Vol. 4, N 2. — P. 207-218.
13. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Mol. Biol. — 1957. — Vol. 193. — P. 265-273.
14. Mitchell T.J. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis // Nat. Rev. Microbiol. — 2003. — Vol. 1. — P. 219-230.
15. Moore M.R., Schrag S.J., Schuchat A. Effects of intrapartum antimicrobial prophylaxis for prevention of group B streptococcal diseases on the incidence and ecology of early-onset neonatal sepsis // Lancet. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 3. — P. 201-213.
16. Rubens C.E., Wessels M.R., Heggen L.M., Kasper D.L. Transposon mutagenesis of type III group B streptococcus: correlation of capsule expression with virulence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 7208-7212.

поступила в редакцию 24.07.2008  
отправлена на доработку 15.08.2008  
принята к печати 10.10.2008