

УДК 615.371

Иммунохимические и протективные свойства конъюгированного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 9N

© 2018 Р.И. НУРИЕВ^{1,2*}, И.А. ГАЛЬВИДИС¹, Н.Е. ЯСТРЕБОВА¹, М.А. БУРКИН¹

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064

²ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991

*e-mail: rinat1nuriev@gmail.com

Поступила 21.03.2018 г.

Принята в печать 13.04.2018 г.

Получены конъюгаты капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 9N со столбнячным анатоксином. Изучено их взаимодействие со специфическими антителами к столбнячному анатоксину и полисахариду 9N при сэндвич-иммуноанализе, в результате чего отобран препарат с оптимальным соотношением полисахарида и белка-носителя (3:4). С помощью количественного ИФА определены параметры эффективной сорбции антигенов на гидроксиде алюминия для проведения экспериментов *in vivo*: в частности, соотношение конъюгата и адъюванта должно быть $\leq 1:1$ (по массе). Двукратная иммунизация выбранным конъюгатом, адсорбированным на гидроксиде алюминия, обеспечивала увеличение титра антител к полисахариду до 70400 ($p < 0,001$), что в 140 раз выше по сравнению с неконъюгированной формой антигена. Исследование протективных свойств антител на модели интраназального заражения аутбредных мышей штаммом *S. pneumoniae* 9N показало, что через 72 ч после контаминации титр бактериальной обсемененности в образцах легочной ткани иммунизированных конъюгатом мышей был в 10 раз меньше, чем у мышей из неиммунизированной группы ($p > 0,05$).

Ключевые слова: гликоконъюгат, пневмококковая вакцина, капсульный полисахарид, *Streptococcus pneumoniae*.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-33-41

Streptococcus pneumoniae – один из основных этиологических факторов развития инвазивных инфекций среди детей, пожилых и иммунокомпрометированных лиц. На сегодняшний день известно более 90 серотипов пневмококка (97, по данным К.А. Geno и др.), большинство из которых могут проявлять вирулентные свойства [1, 2].

Известно, что иммунный ответ на инфекцию *S. pneumoniae* является типоспецифичным и определяется преимущественно продукцией антител

против капсульного полисахарида. Однако полисахариды являются тимус-независимыми антигенами, не формируют иммунологическую память и практически неиммуногенны для детей первых лет жизни. В связи с этим для профилактики пневмококковых инфекций у данных возрастных групп были разработаны и введены в практику конъюгированные вакцины, содержащие капсульные полисахариды наиболее распространенных серотипов пневмококка, ковалентно связанные

Список сокращений: АДГ – дигидразид адипиновой кислоты; БСА – бычий сывороточный альбумин; ГСИ – N-гидрокси-сукцинимид; ДМФА – диметилформамид; ДМСО – диметилсульфоксид; ЖЕЛ – желатина; ИФА – иммуноферментный анализ; КББ – карбонат-бикарбонатный буфер; моноАТ – моноклональные антитела; ОВА – овалбумин; ПС9N – капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 9N; ПСС – противостолбнячная сыворотка; САТ – столбнячный анатоксин; ТМБ – тетраметилбензидин; PBS-T – фосфатно-солевой буфер с твином-20; ЭДК – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; ЭС – эффективность сорбции.

с белком-носителем, обеспечивающим формирование Т-клеточного иммунного ответа. Внедрение данных препаратов в клинику привело к снижению заболеваемости, вызванной таргетными серотипами микроорганизма.

Со временем возникла необходимость в расширении спектра защитного действия вакцины, и были созданы 7-, 10- и 13-валентные препараты, включающие гликоконъюгаты серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F [3]. В последние годы продолжает наблюдаться смена спектра циркулирующих в популяции серотипов *S. pneumoniae*, так что возбудителями инвазивных форм инфекций все чаще становятся «невакцинные» серотипы [4–6]. По данным эпидемиологических исследований, после начала применения 10- и 13-валентных вакцин в европейском регионе 71,9% от зарегистрированных пневмококковых инвазивных серотипов, вызывавших инфекции у детей, принадлежали к «невакцинной» группе [2].

В связи с этим актуальным остается вопрос обновления состава вакцин с учетом данных эпидемиологических исследований. Спектры серотипов пневмококка могут значительно различаться в зависимости от конкретного региона или страны. Одним из вирулентных, но не представленных в конъюгатных вакцинах серотипов *S. pneumoniae* является 9N. Согласно международным данным, он ответственен за 1,3% случаев инвазивных пневмококковых инфекций у детей и входит в число наиболее распространенных вирулентных серотипов, выявляемых после начала применения 10- и 13-валентных вакцин [2].

Роль носителя в лицензированных конъюгатных вакцинах наряду с дифтерийным анатоксином и нетоксичной мутантной формой дифтерийного токсина CRM197 выполняет столбнячный анатоксин. Использование данного белка в качестве носителя обусловлено его высокой иммуногенностью и известным профилем безопасности.

Цель данной работы состояла в получении гликоконъюгата на основе капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 9N и САТ, создании системы оценки его иммунохимических характеристик в ИФА, а также в изучении его иммуногенных и протективных свойств.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы и материалы

В работе использовали овалбумин, бычий сывороточный альбумин, желатину, N-гидроксисукцинимид, 1-этил-3-(3-диметиламинопро-

пил)карбодиимид, диметилформаид, диметилсульфоксид, дигидразид адипиновой кислоты, боргидрид натрия (все реагенты производства Sigma, США), а также однокомпонентный субстратный раствор, содержащий перекись водорода и тетраметилбензидин («БиоТест Системы», Россия), и пероксидазный конъюгат антител кролика к мышиным Ig («ИМТЕК», Россия). Мышиные моноклональные антитела к САТ [7], препарат очищенного капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 9N и кроличьи поликлональные антитела к ПС9N были получены ранее [8]. МоноАТ к легким цепям Ig лошади, меченные пероксидазой хрена, получали, как описано в [9].

Гидроксид алюминия, лошадиная противостолбнячная сыворотка и столбнячный анатоксин были предоставлены ГУП НПО «Иммунопрепарат» (Россия).

Синтез конъюгатов

Для синтеза конъюгатов капсульных полисахаридов с овалбумином, желатиной и САТ применяли метод карбодиимидной конденсации с использованием в качестве линкера АДГ в соответствии со схемой (рис.1). Конъюгаты ОВА-ПС9N и ЖЕЛ-ПС9N использовали в виде твердофазных антигенов в конкурентном ИФА для количественного определения полисахарида.

На первом этапе получали производное полисахарида, модифицированное АДГ. Для этого к 6,0 мг ПС9N в 1,5 мл H₂O/ДМФА (2:1) добавляли ЭДК (19 мг; 100 мкмоль) и ГСИ (11,5 мг; 100 мкмоль) и выдерживали в течение 1 ч при перемешивании на магнитной мешалке при 25 °С. Затем вносили АДГ (5,2 мг; 30 мкмоль) и перемешивали еще 4 ч. Продукт реакции подвергали диализу против 0,9%-ного раствора хлорида натрия в течение 2 сут.

Активацию белка-носителя проводили аналогичным образом. К раствору САТ (5,0 мг) в 0,5 мл H₂O/ДМСО (1:1) добавляли ЭДК (12,5 мг) и перемешивали 30 мин при 25 °С. Далее с помощью карбоната натрия рН раствора модифицированного полисахарида доводили до 9,5 и смесь делили на три равных порции, к которым постепенно добавляли активированный САТ. Массовые соотношения между САТ и полисахаридом составили 3:2, 3:4 и 1:3. Реакционные смеси оставляли на магнитной мешалке при 25 °С на 2 ч и затем проводили исчерпывающий диализ против 0,9%-ного раствора хлорида натрия в течение 1 сут. Полученные диализаты конъюгатов хранили при –20 °С в 50%-ном растворе глицерина в концентрации 1 мг/мл по ПС9N.

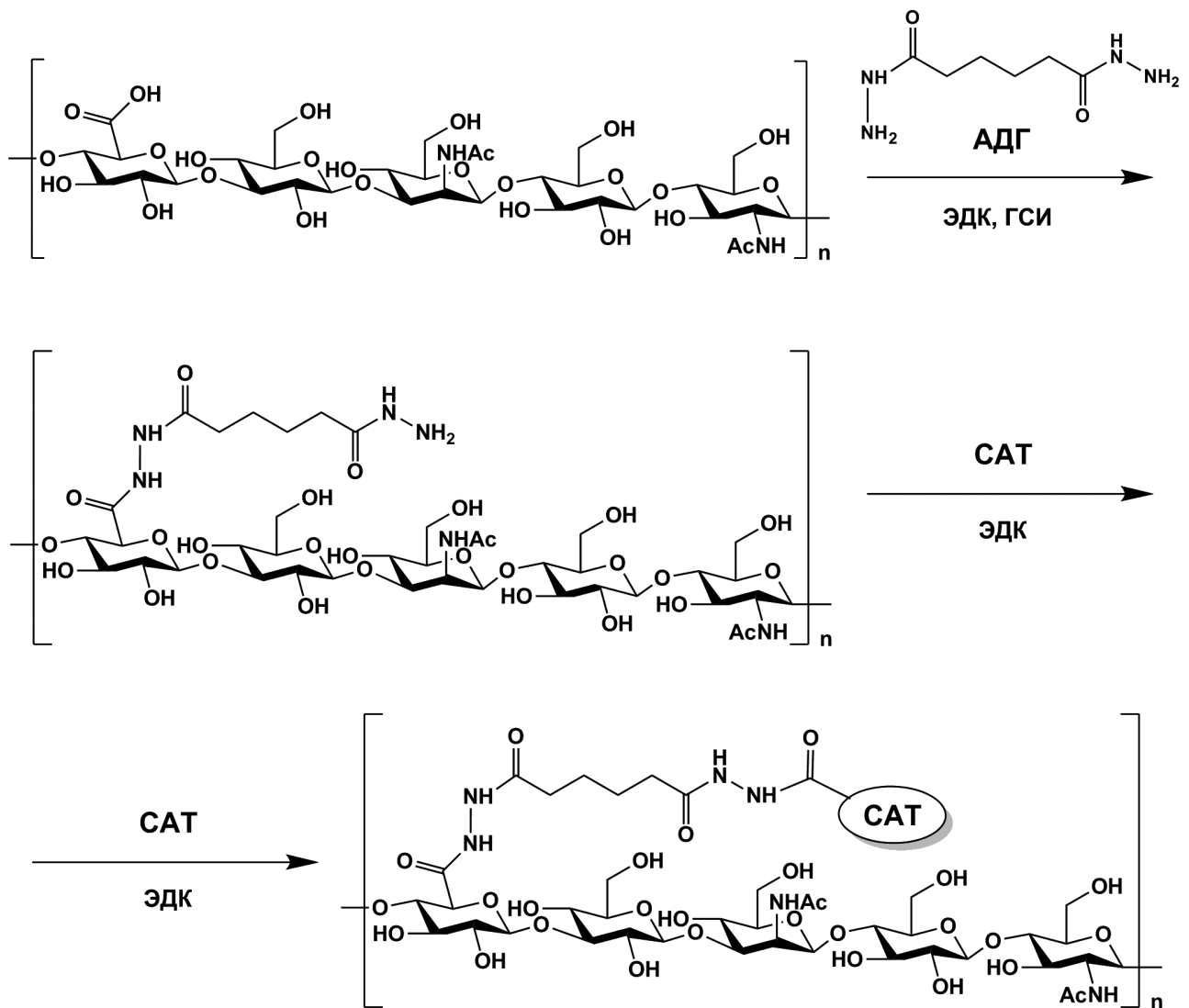


Рис. 1. Схема синтеза конъюгатов САТ с ПС9N. NHAc (AcNH) – N-ацетильная группа, содержащаяся в нативной структуре полисахарида

Fig. 1. Scheme of synthesis of tetanus toxoid and polysaccharide 9N conjugates. NHAc (AcNH) is N-acetyl group in polysaccharide native structure

Иммуноферментный анализ САТ и ПС9N

Количественное определение САТ выполняли в сэндвич-ИФА с использованием моноАТ к САТ и коммерческой лошадиной противостолбнячной сыворотки. Планшеты сенсibilizировали раствором моноАТ в КББ (рН 9,5) в течение ночи (16 ч) при 4 °С. Лунки отмывали PBS-T три раза. В каждую лунку добавляли стандартные растворы САТ и/или исследуемых образцов, разведенных PBS-T, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и проводили отмывку. Затем вносили ПСС в PBS-T, содержащем 1% БСА, и инкубировали так же в течение 1 ч при 37 °С. После от-

мывки добавляли рабочее разведение моноАТ к легким цепям Ig лошади, меченных пероксидазой хрена. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С в планшеты вносили субстратную смесь с ТМБ (100 мкл/лунку), а через 30 мин реакцию останавливали равным объемом 1 М H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре StatFax 2100 (Awareness Technologies, США) при длине волны 450 нм.

Для количественного определения ПС9N использовали конкурентный вариант ИФА, а подбор оптимальных концентраций иммунореагентов осуществляли в непрямом ИФА. Для этого раствор ОВА-ПС9N или ЖЕЛ-ПС9N в КББ

(0,1–3,0 мкг/мл, 100 мкл) вносили в лунки планшетов и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После отмывки планшетов добавляли по 100 мкл PBS-T и 100 мкл серийных разведений кроличьих антиполисахаридных антител (анти-ПС9N) в PBS-T с 1%-ным БСА и инкубировали в течение 1 ч при 25 °С. Связанные антитела выявляли с помощью пероксидазного конъюгата антител к IgG кролика (1 ч при 37 °С) и последующей ферментной реакции в соответствии с процедурой, описанной выше. Концентрации твердофазного антигена и антител, которые обеспечивали оптическую плотность реакционной смеси, близкую к 1,0, использовали в конкурентных взаимодействиях, при которых одновременно с анти-ПС9N в пробу вносили калибровочные растворы ПС9N и/или исследуемых образцов. Инкубацию реагентов проводили в течение 1 ч при 25 °С, а последующие стадии конкурентного анализа не отличались от таковых непрямого ИФА (см. выше).

Связывание анти-ПС9N с иммобилизованным антигеном в присутствии свободного ПС9N изменялось в зависимости от концентрации полисахарида. Уровень связывания при нулевой концентрации ПС9N принимали за 100% (B_0). Для каждой концентрации ПС9N вычисляли процент связывания антител ($B/B_0 \cdot 100\%$) и строили калибровочные кривые с использованием пакета программ OriginPro 2015.

Иммунохимическая оценка конъюгатов САТ-ПС9N

Данная процедура предполагала проведение сэндвич-ИФА, в котором продукты конъюгации САТ-ПС9N связывались адсорбированными на полистироле моноАТ анти-САТ, а детектирующими антителами служили поликлональные антитела к полисахариду. Для сравнения иммунохимических свойств конъюгатов проводили их титрование и анализировали активность серийных разведений препаратов САТ-ПС9N. В качестве контроля использовали смеси с соответствующим содержанием компонентов (САТ+ПС9N). Процедура и условия выполнения анализа были аналогичны используемым в сэндвич-ИФА САТ.

Оптимизация адсорбции на гидроксиде алюминия

Полноту сорбции антигенного материала на носителе оценивали следующим образом. Раствор антигена САТ или ПС9N (0,5–2,5 мг) смешивали с суспензией 1 мг $Al(OH)_3$ в 1 мл физиологического раствора и инкубировали при постоянном

перемешивании на медленно вращающемся роторе при 4 °С. Спустя 2 сут образцы центрифугировали при 2300 g в течение 15 мин. Концентрацию неадсорбированных САТ и ПС9N в супернатанте ($C_{несорб}$) определяли посредством ИФА. Эффективность сорбции (ЭС) вычисляли как долю адсорбированного антигена ($C_{исх} - C_{несорб}$) по отношению к его исходному количеству ($C_{исх}$) в соответствии с формулой:

$$ЭС = C_{исх} - C_{несорб} / C_{исх}$$

Исследование иммуногенности конъюгата

Иммунизацию аутбредных мышей (6–7-недельные самцы массой 20–24 г, полученные из питомника НИЦ биомедицинских технологий, филиал «Андреевка») конъюгатом САТ-ПС9N проводили двукратно. Группами сравнения служили животные ($n=4$), которым вводили эквивалентную смесь индивидуальных антигенных компонентов (САТ+ПС9N) или полисахарид (ПС9N), а в качестве контроля – животные после инъекции физиологического раствора. Антигенный материал, адсорбированный на гидроксиде алюминия, инъецировали в брюшную полость мышей в объеме 0,5 мл из расчета 10 мкг ПС9N на животное. Интервал между инъекциями составлял две недели; отбор крови проводили на 28-й день, через две недели после повторной иммунизации. Сыворотку крови отделяли центрифугированием и хранили при –20 °С до проведения исследований. Для сравнения титра антител у разных групп животных использовали однофакторный дисперсионный анализ.

Исследование протективных свойств конъюгатов

Для изучения протективных свойств САТ-ПС9N мышей на 28-й день после двукратной иммунизации адсорбированным гликоконъюгатом заражали интраназально культурой штамма 96420 пневмококка *S. pneumoniae* серотипа 9N (коллекция НИИВС им. И.И. Мечникова) в дозе 10^7 клеток на мыш. Спустя 3 ч, 24, 48 и 72 ч животных умерщвляли согласно правилам GLP, вскрывали и стерильно отобранный материал (ткань легкого) гомогенизировали, титровали и мерно высевали на чашки Петри. Выросшие колонии пневмококка подсчитывали и определяли титр бактерий. Для сравнения бактериальной обсемененности в разных группах использовали однофакторный дисперсионный анализ.

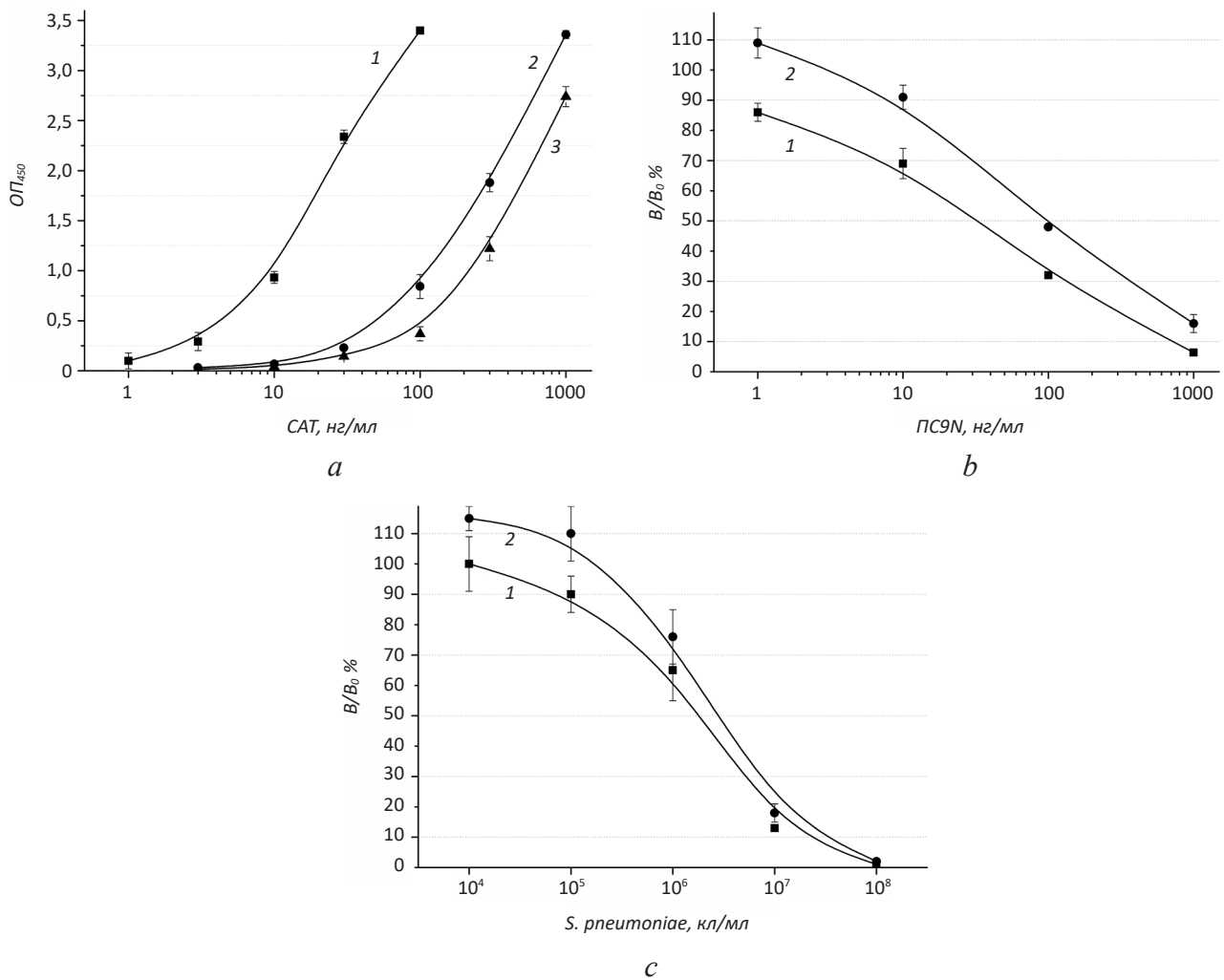


Рис. 2. Калибровочные кривые для количественного определения антигенов с помощью ИФА: *a* – сэндвич-ИФА для анализа САТ (иммобилизованные моноАТ: 1 – ТТ-1, 2 – ТТ-2А, 3 – ТТ-2В); *b* – конкурентный ИФА для анализа ПС9N (иммобилизованные антигены: 1 – ОВА-ПС9N; 2 – ЖЕЛ-ПС9N); *c* – конкурентный ИФА для определения *S. pneumoniae* серотипа 9N (иммобилизованные антигены: 1 – ОВА-ПС9N; 2 – ЖЕЛ-ПС9N)

Fig. 2. Calibration curves for quantification of various antigens by ELISA: (a), sandwich-ELISA of CAT (immobilized MAB: (1), TT-1; (2), TT-2A; (3), TT-2B); (b), competitive ELISA of PS9N (immobilized antigens: (1), OVA-PS9N; (2), GEL-PS9N); and (c), competitive ELISA of *S. pneumoniae* 9N serotype (immobilized antigens: (1), OVA-PS9N; (2), GEL-PS9N)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИФА для количественного определения САТ и ПС9N

Процедуры получения и характеристики антител для количественного определения САТ и ПС9N подробно описаны нами ранее [7–9]. В настоящем исследовании полученные иммунореагенты использовали для создания системы количественного анализа антигенов с оптимизированным соотношением антигенного материала и адьюванта и для исследования иммунохимических характеристик гликоконъюгатов.

На основе иммобилизации специфичных к САТ моноАТ в лунках планшета и использования коммерческого препарата ПСС в качестве проявляющих антител был разработан сэндвич-ИФА для количественного определения анатоксина. Сравнительное тестирование разных моноАТ в данной системе позволило выбрать наиболее чувствительный вариант анализа, который дал возможность проводить детекцию САТ в диапазоне концентраций от 1 до 100 нг/мл (кривая 1, рис. 2а). Отобранные моноАТ IgG1-изотипа распознавали САТ и нативный токсин, а также обладали протективными свойствами [7].

Для определения ПС9N был разработан конкурентный ИФА на основе конъюгатов полисахарида с ОВА или ЖЕЛ. Конъюгированные с белковым носителем формы ПС9N в сравнении с немодифицированным полисахаридом обладали более выраженной адсорбцией на полистироле, что позволило значительно (10–30 раз) сократить расход антигенного материала и таким образом снизить уровень возможных неспецифических взаимодействий. При одинаковых параметрах связывания чувствительность определения ПС9N оказалась несколько выше при использовании в качестве твердофазного антигена конъюгата ОВА-ПС9N (см. рис. 2b), который был выбран для дальнейших экспериментов. Полисахарид мог детектироваться в диапазоне от 1000 до 1 нг/мл. Исследование специфичности разработанного теста не выявило перекрестных взаимодействий с полисахаридными капсульными антигенами пневмококков серотипов 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19F, 23F. Дополнительное подтверждение высокой специфичности анализа в отношении ПС9N было получено в результате изучения конкурентных взаимодействий с суспензиями микробных клеток *S. pneumoniae* указанных выше серотипов. Избирательность анализа по отношению к серотипу 9N обусловила его пригодность также и для серотипирования *S. pneumoniae*. Предел определения составил 10^5 бактериальных клеток в 1 мл (см. рис. 2c) [10].

Синтез конъюгатов и оценка их иммунохимических характеристик

Как известно, повышение иммуногенности полисахарида после его конъюгации с белком происходит вследствие активации CD4⁺ Т-клеток белковыми детерминантами. Эти клетки способствуют усилению активности В-клеток, которые интернализируют и подвергают процессингу конъюгат и презентуют антигены на своей поверхности [11]. Однако, несмотря на очевидную зависимость иммуногенности конъюгата от его химического строения, не существует универсальной формулы для создания подобных гибридных структур. В связи с этим для эмпирического подбора оптимальной пропорции полисахарида и белка-носителя нами были приготовлены конъюгаты САТ с ПС9N с разным соотношением указанных компонентов: 3:2 (№ 1), 3:4 (№ 2) и 1:3 (№ 3).

В данной работе для подтверждения формирования конъюгированных молекул и выбора условий, обеспечивающих наилучшую сохранность нативных антигенных структур, мы предложили

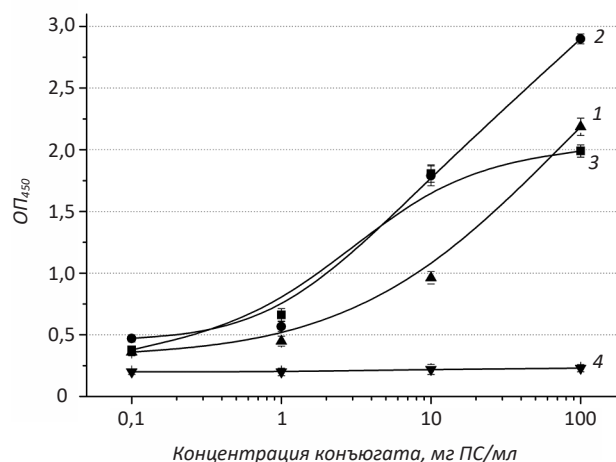


Рис. 3. Иммунохимическая оценка гликоконъюгатов с различным соотношением компонентов САТ и ПС9N: 1 – 3:2; 2 – 3:4; 3 – 1:3; 4 – препарат сравнения (смесь САТ (0,75 мг/мл) и ПС9N (1 мг/мл) в соотношении 3:4)

Fig. 3. Immunochemical assessment of glycoconjugates at various ratios of components, tetanus toxoid and PS9N: (1), 3:2; (2), 3:4; (3), 1:3; (4), reference preparation (mixture of tetanus toxoid (0.75 mg/mL) and PS9N (1 mg/mL); ratio of 3:4)

метод иммунохимической оценки структуры конъюгата с использованием в сэндвич-ИФА антител с определенными эффекторными свойствами. Имобилизованные на полистироле анти-САТ-моноАТ могли взаимодействовать с протективными эпитопами САТ, доступными на молекуле конъюгата, что служило бы свидетельством их сохранности, необходимой для формирования защиты против столбняка, а также Т-зависимого анти-ПС ответа [12]. На втором этапе анализа анти-ПС9N связывались только с конъюгатами, в структуре молекулы которых фрагменты полисахарида оставались интактными. Таким образом, оптимальное соотношение доступных эпитопов, принадлежащих как САТ, так и ПС9N, способствовало бы лучшей детекции препарата в сэндвич-анализе. Показано (рис. 3), что соотношение компонентов 3:4 (№ 2) обеспечивало более выраженную иммунохимическую активность конъюгатов.

Используемая для сравнения смесь САТ и ПС9N с соотношением компонентов, эквивалентным их соотношению в составе конъюгата № 2 (3:4), не могла обеспечить формирование иммунного комплекса типа «сэндвич». Таким образом, предложенный тест позволил подтвердить образование в эксперименте соответствующего гликоконъюгата и выбрать вариант с оптимальным соотношением компонентов.

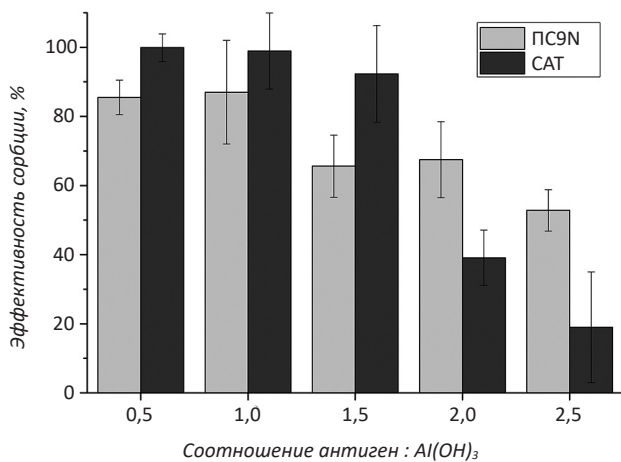


Рис. 4. Эффективность сорбции САТ и РС9N на гидроксиде алюминия. Ошибка определения рассчитана для $n=3$

Fig. 4. Efficacy of adsorption of tetanus toxoid and PS9N on aluminum hydroxide. Error was calculated for $n = 3$

Наибольшую иммунохимическую активность конъюгатов капсульных полисахаридов большинства серотипов *S. pneumoniae* другие авторы [12, 13] наблюдали при массовом соотношении компонентов, близком к 1:1. Тем не менее, в указанных публикациях постулируется, что для каждого отдельного полисахарида и метода конъюгации необходимо заново подбирать его оптимальное соотношение с белком-носителем.

Оптимизация соотношения антигена и адьюванта

Предварительные исследования выявили довольно низкую иммуногенность конъюгата и полисахарида, что обусловило необходимость использования адьюванта для повышения их иммуногенности.

Нами были исследованы параметры сорбции САТ и РС9N на гидроксиде алюминия для подбора оптимального соотношения конъюгата с адьювантом. Было установлено, что максимальная адсорбционная емкость наблюдалась при эквивалентных массовых соотношениях антигена и Al(OH)₃: эффективность сорбции РС9N и САТ в этих условиях достигала наиболее высоких значений – 87% и 99%, соответственно (рис. 4). В то же время, параллельно с ростом нагрузки сорбента РС9N и САТ отмечалось постепенное увеличение доли неадсорбированных антигенов; так при 2,5-кратном избытке антигенов эффективность сорбции снижалась до 52,8% для РС9N и до 20% для САТ. Таким образом, оптималь-

ной сорбции антигенного материала, а, следовательно, и максимального адьювантного эффекта, можно было ожидать при соблюдении условия: антиген \leq Al(OH)₃.

Исследование иммуногенности гликоконъюгатов

После выбора конъюгата с наиболее близким к оптимальному соотношением компонентов (САТ:РС9N = 3:4) и определения параметров полноценной сорбции на гидроксиде алюминия мы исследовали иммуногенность конъюгированного препарата (рис. 5). Титр антител к РС9N определяли после двукратного введения мышам иммуногенов, адсорбированных на гидроксиде алюминия. В группе животных, иммунизированных гликоконъюгатом, средний титр антител составил 70400 (95%-ный доверительный интервал от 9300 до 130000, $p < 0,001$). В группах сравнения введение смеси антигенов САТ+РС9N или РС9N не приводило к достоверному увеличению титра анти-РС9N-антител.

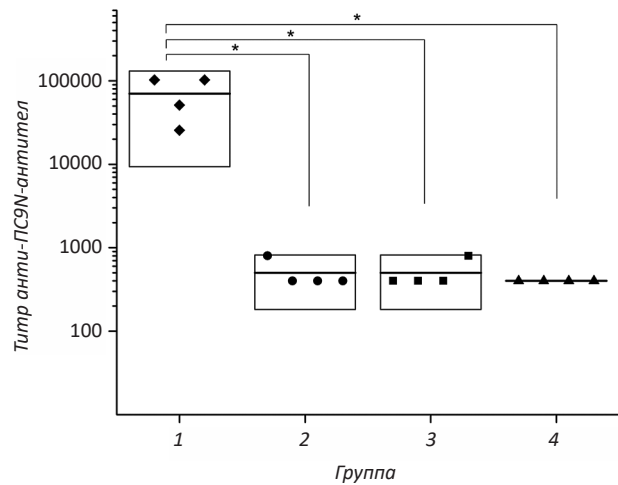


Рис. 5. Сравнительное исследование иммуногенности РС9N в группах мышей, иммунизированных: 1 – конъюгатом САТ-РС9N (3:4); 2 – смесью САТ+РС9N (с соотношением 3:4); 3 – РС9N; 4 – физраствором. Каждая точка показывает титр антител в сыворотке индивидуального животного, горизонтальная полоса – средний титр в группе, бокс – область 95%-ного доверительного интервала, * $p < 0,001$

Fig. 5. Comparative study of immunogenicity of PS9N in groups of mice immunized by: (1), tetanus toxoid-PS9N conjugate (3:4); (2), mixture of tetanus toxoid and PS9N (3:4); (3), PS9N; and (4), saline. Each point shows antibody titer in serum of individual test animal; horizontal line indicates mean titer in group, and box demonstrates area of 95% confidence interval, * $p < 0,001$

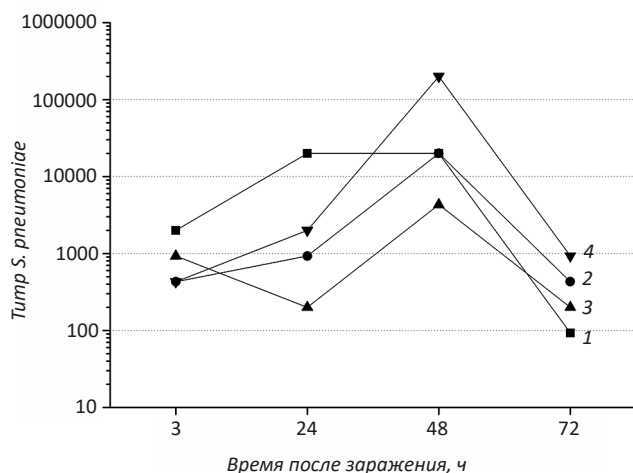


Рис. 6. Титр клеток *S. pneumoniae* 9N в легочной ткани мышей, иммунизированных: 1 – конъюгатом САТ-ПС9N (3:4); 2 – смесью САТ+ПС9N (в соотношении 3:4); 3 – ПС9N; 4 – физиологическим раствором. Каждая точка на графике представляет среднее геометрическое значение при $n=3$

Fig. 6. Cell titer of *S. pneumoniae* 9N in lung tissue of mice immunized by: (1), tetanus toxoid-PS9N (3:4); (2), mixture of tetanus toxoid + PS9N (3:4); (3), PS9N; and (4), saline. Each point on curves represents geometric mean at $n=3$

Исследование протективных свойств вырабатываемых антител

Интраназальное заражение лабораторных животных *S. pneumoniae* с последующим определением титра бактериальной обсемененности легочной ткани является одним из подходов к исследованию поствакцинальной резистентности [14]. Как видно из рис. 6, количество бактериальных клеток во всех группах инфицированных животных возрастает в первые двое суток после заражения и начинает снижаться через 48 ч, что соответствует классической картине развития инфекционной патологии [15]. Несмотря на изначально более высокие значения бактериальной обсемененности в группе № 1 (САТ-ПС9N), заслуживает внимания прекращение дальнейшего роста микроорганизмов в этой группе животных уже после 24 ч, а через 72 ч элиминация возбудителя была выражена в этой группе наиболее резко ($p>0,05$) по сравнению с другими группами. Это наблюдение служит свидетельством более эффективной защитной реакции, формируемой в ответ на введение конъюгированного полисахаридного антигена.

Таким образом, в данной работе показана возможность усиления иммуногенности ПС-антигена *S. pneumoniae* серотипа 9N посредством его конъюгации с САТ. Разработанные лабораторные методы иммунохимической оценки позволили выбрать оптимальное соотношение компонентов в составе конъюгата, обеспечивающее сохранность и экспозицию протективных эпитопов нативных антигенов. Тем не менее, отсутствие статистически значимых различий между группами в экспериментах *in vivo* по изучению поствакцинального протективного иммунитета выявило необходимость дополнительных масштабных исследований на животных или применения альтернативных методов оценки эффекторных свойств антител. Полученные результаты могут служить основой для совершенствования противопневмококковых препаратов и коррекции состава действующих конъюгатных вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

- Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3), 871–899. doi: 10.1128/CMR.00024-15
- Balsells E., Guillot L., Nair H., and Kyaw M.H. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2017, 12(5), e0177113. doi: 10.1371/journal.pone.0177113
- Bryant K.A., Block S.L., Baker S.A., et al. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*, 2010, 125(5), 866–875. doi: 10.1542/peds.2009-1405
- Devine V.T., Cleary D.W., Jefferies J.M., et al. The rise and fall of pneumococcal serotypes carried in the PCV era. *Vaccine*, 2017, 35(9), 1293–1298. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.01.035
- Протасова И.Н., Бахарева Н.В., Перьянова О.В. и др. Смена серотипов *Streptococcus pneumoniae* у детей, вакцинированных 7-валентной конъюгированной вакциной. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, 2014, 5(78), 67–71
- Давыдов А.В., Титов Л.П., Ключко Н.Л., Гуринович В.В. Серотиповая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей с острыми средними отитами и синуситами. *Здравоохранение*, 2016, 3, 12–20
- Буркин М.А., Свиридов В.В., Перельгина Е.В. Иммуноферментное определение столбнячного токсина и анатоксина с использованием моноклональных антител. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2004, 40(4), 478–484. doi: 10.1023/B:ABIM.0000033920.73522.75

8. Елкина С.И., Токарская М.М., Ястребова Н.Е., Апарин П.Г. Способ получения пневмококковых гипериммунных сывороток. Патент России, 2624871, А 61 К 39/40. 2016.
9. Буркин М.А., Гальвидис И.А., Яковлева И.В., Свиридов В.В. Использование моноклональных антител к иммуноглобулину лошади в иммуноферментном анализе бактериальных токсинов и анатоксинов. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2007, 43(1), 109–113. doi: 10.1134/S0003683807010176.
10. Нуриев Р.И., Гальвидис И.А., Буркин М.А. Серотип-специфичное определение полисахаридных антигенов *Streptococcus pneumoniae* в биологических жидкостях в иммуноферментном анализе. Материалы международной конференции «Дни иммунологии», Санкт-Петербург. *Медицинская иммунология*. 2017, 19, 368
11. Siber, G.R. Pneumococcal disease: prospects for a new generation of vaccines. *Science*, 1994, 265, 1385–1387. doi: 10.1126/science.8073278
12. Peeters C.C., Lagerman P.R., de Weers O., et al. Preparation of polysaccharide-conjugate vaccines. *Methods Mol. Med.*, 2003, 87, 153–174. doi: 10.1385/1-59259-399-2:153
13. Chang X., Yu W., Ji S., et al. Conjugation of PEG-hexadecane markedly increases the immunogenicity of pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine. *Vaccine*, 2017, 35(13), 1698–1704. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.02.027
14. Hoover J.L., Lewandowski T.F., Mininger C.L., et al. Robust pneumonia model in immunocompetent rodents to evaluate antibacterial efficacy against *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* or *A. baumannii*. *J. Vis. Exp.*, 2017, 119, e55068. doi: 10.3791/55068
15. Jeong D.G., Jeong E.S., Seo J.H., et al. Difference in resistance to streptococcus pneumoniae infection in mice. *Laboratory Animal Research*, 2011, 27(2), 91–98. doi: 10.5625/lar.2011.27.2.91

Immunochemical and Protective Properties of Conjugated Capsular Polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 9N

R.I. NURIEV^{1,2,*}, I.A. GALVIDIS¹, N.E. YASTREBOVA¹, and M.A. BURKIN¹

¹*Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow Russia*

²*Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow Russia*

*e-mail: rinat1nuriev@gmail.com

Received March 21, 2018

Accepted April 13, 2018

Abstract—Conjugates of *Streptococcus pneumoniae* type 9N capsular polysaccharide with tetanus toxoid have been prepared. Their interactions with specific antibodies to tetanus toxoid and polysaccharide 9N were assessed, which permitted to select a conjugate with the optimal ratio of the polysaccharide and carrier protein (3:4). The parameters of the efficient adsorption of tetanus toxoid and polysaccharide on aluminum hydroxide for the following in vivo experiments were determined using the quantitative ELISA; in particular, the optimum ratio of the conjugate and adjuvant was proved be $\leq 1:1$ (w/w). The repetitive immunization with the selected conjugate adsorbed on aluminum hydroxide increased the anti-PS antibody titers up to 70400 ($p < 0,001$) which is 140-fold higher as compared to the antigen unconjugated form. The investigation of the antibody protection from *Streptococcus pneumoniae* 9N after the intranasal challenge of wild-type mice revealed that the titer of the bacterial contamination in the immunized mouse lung tissue was 10-fold lower than that in non-immune mice 72 h after the contamination ($p > 0,05$).

Key words: glycoconjugate, pneumococcal vaccine, capsular polysaccharide, *Streptococcus pneumoniae*.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-33-41