
МЕНИНГОКОККОВЫЕ ВАКЦИНЫ: ОТ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДО ПРОТЕАЗ

А.П. Аллилуев, И.В. Анохина

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

**Л.Д. Румш, Э.Э. Мельников, О.В. Котельникова,
Е.А. Ситникова, Е.Ю. Дрожжина**

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

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

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

Л.В. Козлов

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

А.Э. Аваков

ООО «БИО-Диагностика»
ул. Угрешская, 31, строение А, Москва, Россия, 115088

Микробные капсульные полисахариды на протяжении многих лет обеспечивали практическое здравоохранение высокоэффективными вакцинами для профилактики менингококковых, пневмококковых, гемофильных инфекций и брюшного тифа. А их применение в виде конъюгатов с белковыми носителями ликвидировало пробел при защите от этих инфекций детей в возрасте до одного года. Необычайно перспективным оказалось предложенное нами новое поколение вакцин, где уже синтетические пептиды конъюгировались с полисахаридами менингококков. Таким образом, были открыты подходы к решению проблемы вакцинопрофилактики менингококковой инфекции серогруппы В. В последние годы отечественные исследователи впервые предложили использовать для профилактики менингококковых инфекций всех серогрупп, а также инфекций, обусловленных пневмококками и гемофилами, один из главных факторов вирулентности этих микробов — IgA1 протеазу, практически идентичную для всей указанной группы инфекций. Запатентованные способы получения этой вакцины определяют отечественный приоритет ее производства и применения.

Ключевые слова: вакцины, полисахарид, менингит, IgA1 протеаза.

Внедрение капсульных полисахаридов (КП) осуществило революцию в деле вакцинопрофилактики микробных инфекций. Не токсичные, апирогенные и ареактогенные КП брюшнотифозных микробов (БМ), пневмококков (ПК), менингококков (МК) и гемофилов (ГЕМ) начинают формировать у людей невосприимчивость к указанным инфекциям уже через одну неделю после однократной вакцина-

ции. При этом КП могут быть ассоциированы с целым рядом как вирусных, так и микробных вакцин, что особенно удобно при вакцинации специальных контингентов. Быстрота формирования иммунитета и отсутствие реактогенности позволяют использовать КП и при экстренной вакцинации в очагах инфекции. Приятно напомнить, что впервые КП БМ (ВИ-антиген) начал применяться в качестве вакцины в нашей стране [2] с тем, чтобы впоследствии его использование в вакцинных целях распространилось на весь земной шар. Но, исторически, предшественником Ви-антигена были КП пневмококков, которые интенсивно исследовали с начала двадцатых годов двадцатого века. В результате этих исследований уже в 1945 г. [13] была установлена противоэпидемическая эффективность для 1, 2, 5 и 7 типов КП пневмококков. Однако возможность эффективного лечения пневмоний с помощью появившихся сульфамидов, а затем и антибиотиков, надолго задержала практическое профилактическое применение этих вакцин.

Вакцинопрофилактика менингококкового менингита. В 1969 г. американский исследователь Э. Готшлих с коллегами предложил метод выделения очищенных КП менингококка с помощью обработки микробов цетавлоном и последующей экстракцией ПС хлористым кальцием и фенолом. Изучая на авторах работы иммуногенность полученных ПС, Готшлих прогнозировал их вакцинные потенции и не ошибся [12]. Выделенные КП менингококка серогрупп А и С оказались высоко иммуногенными для людей, и уже через два года подтвердили свою эффективность в эпидиспытаниях [1, 10, 14] и при ликвидации эпидемий менингита серогруппы А в Бразилии и Финляндии. Возникшая сложность, связанная с низкой иммуногенностью этих ПС для детей в возрасте до двух лет, была успешно преодолена путем их конъюгации с белковыми носителями, в качестве которых обычно использовали дифтерийный или столбнячный анатоксины. Современное состояние вакцинопрофилактики менингококковых менингитов в основном хорошо представлено в статье А. Платонова [7]. К сожалению, в статье не сообщается о последних достижениях отечественных исследователей, которые будут рассмотрены ниже.

Попытки разработок отечественных менингококковых серогруппы В вакцин. Низкая иммуногенность менингококкового В-ПС, показанная еще Готшлихом [12], продолжала удивлять исследователей, потому что В-ПС — та же сиаловая кислота, но в отличие от иммуногенного С-ПС с альфа связью в положении 2—9, у В-ПС связь в положении 2—8. Однако почти у всех здоровых людей, по нашим данным, в сыворотках присутствуют антитела к В-ПС. Кроме того, при интенсивной иммунизации кроликов микробными штаммами серогруппы В в сыворотках этих животных происходит нарастание титров антител к В-ПС. Было легко предположить, что в составе микробной клетки В-ПС присутствует в антигенной форме, но в процессе очистки утрачивает эту способность. Мы решили выяснить, на каком этапе очистки препарат В-ПС все еще обладает иммуногенностью, но уже утрачивает токсичность и пирогенность, обусловленные липоолигосахаридами микробной стенки возбудителя. Были получены препараты В-ПС на определенных

ступенях очистки с разным содержанием липоолигосахарида и других антигенных компонентов клеточной стенки возбудителя менингита серогруппы В [4]. Оказалось, что эти препараты можно было считать кандидатами менингококковой В вакцины, поскольку они обладали иммуногенной активностью, индуцируя у мышей интенсивную продукцию антителообразующих клеток и В-АТ, а также защищая их от заражения различными штаммами живой вирулентной культуры менингококков серогруппы В. Однако к моменту выхода нашей В-вакцины к испытанию на людях появились работы о средстве В-ПС с эмбриональными клетками головного мозга человека, и возникло гипотетическое опасение запуска аутоиммунного процесса в результате введения препарата, содержащего биологически активный В-ПС! Кроме того, изучая рост перевиваемой опухоли человека — рака шейки матки (РМШ) — в опытах на мышах, иммунизированных различными вакцинами, широко применяемыми в практике здравоохранения, мы наблюдали значимое превышение роста опухоли только в группе мышей, привитых В-ПС (рис. 1), что дало веские основания исключить В-ПС из состава планируемых менингококковых В-вакцин.

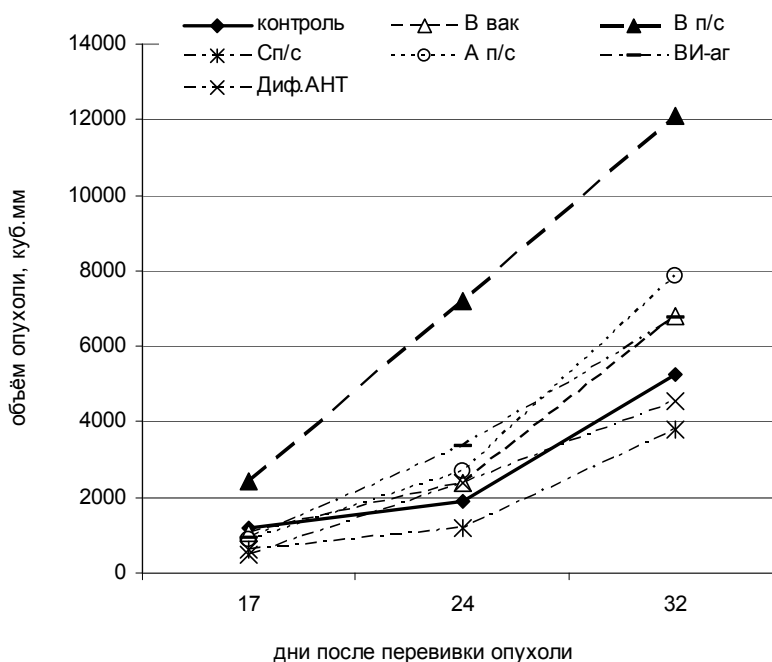


Рис. 1. Рост перевиваемой опухоли у мышей, иммунизированных различными вакцинами за месяц до перевивки опухоли

Разработка вакцины серогруппы В на основе синтезированных фрагментов белков наружной мембраны менингококков. Имеющийся мировой опыт говорит о том, что эффективные для данной территории менингококковые вакцины серогруппы В должны готовиться ex tempore из того возбудителя серогруппы В, чей

серотиповой и субтиповой набор там доминирует [7]. Так, впервые эпидэффективность такой вакцины была достигнута на Кубе за счет использования доминирующего там штамма В:15:P1.19,15:FS-1 [11]. Аналогичный результат был достигнут в Новой Зеландии, когда фирма NOVARTIS изготовила для этой страны вакцину также из местного штамма В:P1.7ком.St-41/44 [15]. Однако изготовление для каждой страны или области новой В-вакцины убыточно. Кроме того, время на изготовление и апробацию фактически новой вакцины исчисляется годами. Естественно, что поиски новых вариантов вакцины против этой серогруппы продолжались. Разработчикам вакцин было понятно, что поливалентную вакцину серогруппы В можно получить только на основе антигенов, общих для всех циркулирующих штаммов этого возбудителя. Огромный полиморфизм основных белков наружной мембраны менингококков группы В (т.е. их серотиповой и серосубтиповой набор) мешал исследователям выбрать какой-либо общий для менингококков серогруппы В белок. Полученные к этому моменту сведения о структуре основных белков наружной мембраны менингококков указывали на наличие в их аминокислотной последовательности общих (консервативных) участков. Оказалось технически не сложно синтезировать эти пептиды и изучить их антигенные и протективные свойства. Такими свойствами, в частности, обладают синтезированные пептидные фрагменты белков PоgА, NspА и ОраВ [8]. Однако для вакцинных целей эти низкомолекулярные пептиды следовало использовать или с применением адьювантов, или, что более удобно, их следует конъюгировать с капсульными полисахаридами менингококков серогрупп А и С, широко используемыми на практике в виде самостоятельных вакцин. Идея получила развитие. Таким способом нами впервые были созданы и запатентованы конъюгированные менингококковые АВ- и СВ-дивакцины [6]. Оставалось только масштабировать процесс их изготовления или продолжать поиски более удобных вариантов менингококковых вакцин. Вскоре нашелся и такой вариант.

Протеолитический фермент менингококков IgA1 протеаза — новая поливакцина для профилактики менингококковой инфекции. Среди огромного количества антигенных компонентов менингококков оставался малоизученный фермент — секретлируемая микробной клеткой IgA1 протеаза. Этот фермент уже долгие годы привлекает внимание исследователей, поскольку интенсивно разрушает как сывороточные, так и секреторные IgA1 антитела, и, по данным литературы, является одним из основных факторов вирулентности и патогенности этого микроба [5]. Примерная схема инфицирования начинается с эпителия слизистых человека, куда разными путями попадает возбудитель менингококковой инфекции, и посредством экстрагируемой IgA1 протеазы, разрушая направленные против него секреторные антитела, менингококк прикрепляется к клеткам эпителия. Размножаясь, он формирует колонию, закрывается пленкой и готовится к проходу в циркулирующие жидкости организма, где он также размножается (септицемия) и вовлекает в процесс воспаления менингеальные оболочки. Естественно, что, блокируя возможность возбудителя прикрепиться к эпителию слизистой носоглотки, мы

останавливаем процесс инфицирования в самом начале. Поэтому мы предположили, что, используя для иммунизации человека (а вначале — животных), вакцинный препарат, содержащий IgA1 протеазу, мы получим протективный эффект, свидетельствующий о формировании поствакцинального противоменингококкового иммунитета. Дальнейший ход исследования был традиционен для кандидатов вакцин. Препарат протеазы был получен путем выделения из культуры менингококков серогруппы А штамма А-208 [9]. Последнее обстоятельство весьма существенно, поскольку мы предполагали получить и получили снижение уровня бактериемии у мышей и защиту от смертельного заражения живой вирулентной культурой менингококков не только серогруппы А, но и серогруппы В по сравнению с не иммунизированными животными (рис. 2).

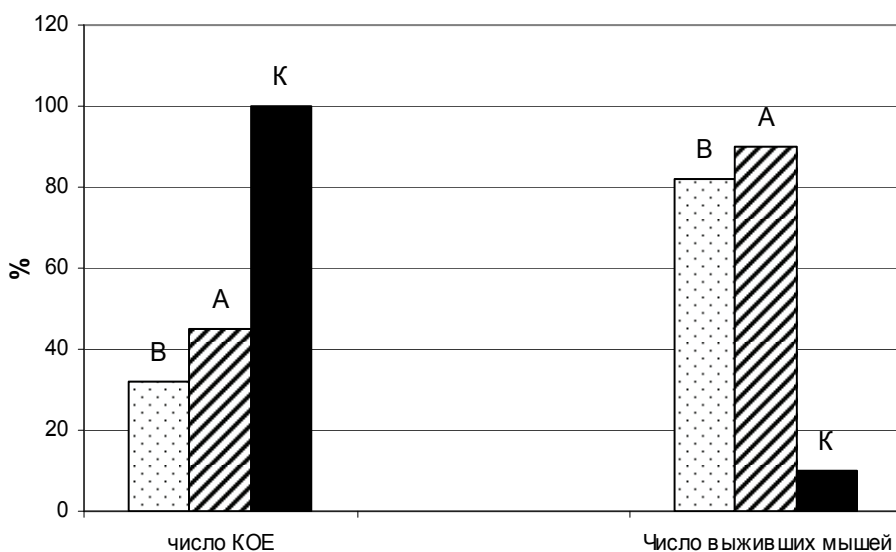


Рис. 2. Уровень бактериемии (число КОЕ) и число выживших мышей, иммунизированных IgA1 протеазой из культуры менингококка серогруппы А (А) и рекомбинантной серогруппы В (В) после заражения животных менингококком серогруппы В по сравнению с не иммунизированными мышами (К)

Полученные результаты подтверждают данные литературы о том, что секретируемая IgA1 протеаза практически идентична для целого ряда возбудителей, патогенность которых обусловлена этим ферментом, таких как менингококки, гонококки, гемофилы, пневмококки и некоторые другие микробы [5]. Отсюда ее вакцинная полипотенция для различных серогрупп менингококков и указанных выше возбудителей. Поскольку для вакцинных целей IgA1 протеазу необходимо получать в значительных количествах — мы сочли целесообразным это осуществлять с помощью метода генной инженерии [8]. Этим способом был получен препарат рекомбинантной IgA1 протеазы на основе генома менингококка серогруппы В, идентичный по своим функциям выделенному из культуры менингококков штамма А-208 [8]. Он также значительно снижал уровень бактериемии и защищал

мышей при заражении летальной дозой менингококков серогрупп А, В и С. Полученные данные говорят о том, что мы располагаем прототипом менингококковой поливакцины, и целесообразно продолжать ее изучение в качестве вакцины также от пневмококковых и гемофильных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Аваков А.Э., Аллилуев А.П. Способ выделения очищенных полисахаридов менингококков серогруппы А и С // Патент RU № 2283135.
- [2] Аллилуев А.П. Способ получения Ви-антигена // Патент RU №2135208.
- [3] Аллилуев А.П., Анохина И.В., Руми Л.Д., Котельникова О.В. и др. Менингококковая поливакцина на основе очищенной IgA1 протеазы // Вестник РУДН. Серия «Медицина». — 2010. — № 1. — С. 7—11.
- [4] Баснакьян И.А., Артемьева Т.А., Алексахина Н.Н., Карабак В.И. и др. Способ получения полисахаридно-белковой вакцины против серогруппы В // Патент RU № 1750689.
- [5] Казеева Т.Н., Шевелев А.Б. Структура и функции IgA1-специфических протеаз патогенных микроорганизмов // Биохимия. — 2007. — № 72. — С. 485—494.
- [6] Несмеянов В.А., Котельникова О.В., Вольпина О.М., Феоктистов К.М. и др. Способ приготовления бивалентной вакцины против менингококковой инфекции серогрупп В/А или В/С на основе синтетических пептидов и капсульных полисахаридов без использования адъюванта // Патент RU № 2250113.
- [7] Платонов А.Е., Харит С.М., Платонова О.В. Вакцинопрофилактика менингококковой инфекции в мире и России // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2009. — Т. 48. — № 5. — С. 32—46.
- [8] Руми Л.Д., Мельников Э.Э., Аллилуев А.П., Козлов Л.В., Котельникова О.В. и др. Нуклеиновая кислота, кодирующая функционально активную рекомбинантную IgA1 протеазу *Neisseria meningitidis* серогруппы В // Патент RU № 2453599.
- [9] Ягудаева Е.Ю., Жигис Л.С., Зуева В.С., Мельников Э.Э., Зубов В.П., Козлов В.В., Бичучер А.М., Котельникова О.В., Аллилуев А.П., Руми Л.Д. Выделение и определение активности IgA1-протеазы из культуры *Neisseria meningitidis* // Биоорганическая химия. — 2010. — Т. 36. — № 1. — С. 96—105.
- [10] Artenstein M.S., Gold R., Zimmerly J.G., Wyle F.A., Schneider H., Harkins C. Prevention of meningococcal disease by group C polysaccharide vaccine // N Engl J Med. — 1970. — 19. — 282(8). — С. 417—420.
- [11] Fredriksen J.H., Rosenqvist E., Wedege E., Bryn K., Bjune G., Frøholm L.O., Lindbak A.K., Møgster B., Namork E., Rye U. et al. Production, characterization and control of MenB-vaccine “Folkehelse”: an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease // NIPH Ann. — 1991. — 14(2). — С. 67—79; discussion — С. 79—80.
- [12] Gotschlich E.C., Goldschneider I., Artenstein M.S. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers // J Exp Med. — 1969. — 1. — 129(6). — С. 1367—1384.
- [13] MacLeod C.M., Hodges R.G. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides // J Exp Med. — 1945. — 82. — С. 445—465.
- [14] Mäkelä P.H., Käyhty H., Weckström P., Sivonen A., Renkonen O.V. Effect of group-A meningococcal vaccine in army recruits in Finland // Lancet. — 1975. — 8. — С. 883—886.
- [15] Wedege E., Bolstad K., Aase A., Herstad T.K., McCallum L., Rosenqvist E., Oster P., Martin D. Functional and specific antibody responses in adult volunteers in New Zealand who were given one of two different meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccines // Clin Vaccine Immunol. — 2007. — 14(7). — С. 830—838.

**MENINGOCOCCAL VACCINE.
FROM CAPSULAR POLYSACCHARIDES
OF MICROBES TO PROTEASES**

A.P. Alliluyev, I.V. Anokhina

Faculty of Medicine
People's Friendship University
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

**L.D. Rumsh, E.E. Melnikov, O.V. Kotelnikova,
E.A. Sitnikova, E.J. Drozzina, L.S. Zhigis,
E.J. Yagudayeva, O.A. Razgulyaeva, V.S. Zueva**

Institute of bioorganic chemistry n. a. M.M. Shemyakin
and Yu. A. Ovchinnikov of the Russian Academy of Sciences
Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, GSP-7, Russia, 117997

L.V. Kozlov

Federal budgetary institution of science Moscow Research Institute
of Epidemiology and Microbiology n. a. G.N. Gabrichevskiy
Admiral Makarov str., 10, Moscow, Russia, 125212

A.E. Avakov

Ltd. "Bio-Diagnostics"
Ugreshskaya str., 31, block a, Moscow, Russia, 115088

Microbial capsular polysaccharides for many years provided a highly practical public health vaccines for preventing meningococcal, pneumococcal and Haemophilus influenza infection, and typhoid fever. Their application in the form of conjugates with protein carriers eliminate the gap in protection against these infections in children under one year. Extremely promising turned out offered us a new generation of vaccines, which have synthetic peptides conjugated to a meningococcal polysaccharide. Thus, new approaches to the solution of the problem of meningococcal disease vaccination serogroup B were open. In recent years, Russian researchers first suggested to use IgA1 protease (one of the major virulence factors of microbes and almost identical for mentioned below infections) for prevention of such diseases as meningococcal of all serogroups, pneumococcus and hemophilia infections. Patented processes for producing of the vaccine define domestic priority of its production and use.

Key words: meningitis, polysaccharide, vaccine, IgA1 protease.