

4. Зуева Л.П., Яфаев Р.Х. Эпидемиология. СПб, Фолиант, 2005.
5. Истомина А.В. Региональный мониторинг природно-очаговых инфекций. Псковский региональный журнал. 2006, 1: 122-135.
6. Коломинов С.И. Эпизоотологические и экологические аспекты распространения и прогнозирования заболеваемости в природных очагах геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Автореф. дис. канд. мед. наук. Нижний Новгород, 2012.
7. Малхазова С.М., Семенов В.Ю., Шартова Н.В. и др. Здоровье населения Московской области: медико-географические аспекты. М., ГЕОС, 2010.
8. Медико-географический атлас Смоленской области. Евдокимов С.П., Каманин Е.И., Малхазова С. М. (ред.). Смоленск, 2012.
9. Медико-экологический атлас Воронежской области. Куролап С.А. и др. (ред.). Воронеж, Истоки, 2010.
10. Природноочаговые болезни: медико-географический атлас России. Ватлина Т.В., Котова Т.В., Малхазова С.М. и др. (ред.). М., Географический фак. МГУ им. М.В. Ломоносова, 2017.
11. Трифонова Т.А., Марцев А.А. Оценка и прогнозирование эпидемиологической обстановки по иксодовому клещевому боррелиозу во Владимирской области. Журн. микробиол. 2016, 1: 58-62.

Поступила 01.03.18

Контактная информация: Марцев Антон Андреевич, к.б.н.,
600000, Владимир, ул. Горького, 87

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*И.В.Яковлева¹, Е.А.Курбатова¹, Э.А.Ахматова², Е.В.Сухова², Д.В.Ящунский²,
Ю.Е.Цветков², Н.Э.Нифантьев², В.В.Свиридов¹*

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ТЕТРАСАХАРИДУ — СИНТЕТИЧЕСКОМУ АНАЛОГУ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE СЕРОТИПА 14 И ИХ ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Институт биоорганической химии им. Н.Д.Зелинского, Москва

Цель. Получение моноклональных антител (МкАт) к синтетическому тетрасахариду — повторяющемуся звену капсульного полисахарида (КП) *Streptococcus pneumoniae* серотипа 14 и их иммунохимическая характеристика. *Материалы и методы.* Для получения гибридомы, продуцирующей МкАт, мышей иммунизировали синтетическим тетрасахаридом, конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином (БСА) с последующей гибридизацией В-лимфоцитов с клетками мышинной миеломы. Антитела получали *in vitro* и *in vivo*. Иммунохимическую характеристику МкАт к тетрасахариду проводили в реакции иммунопреципитации и с помощью различных вариантов постановки ИФА. *Результаты.* Впервые получена мышьяная гибридома, продуцирующая IgM к тетрасахариду. Титр IgM к тетрасахариду в супернатантах клонов и в асцитической жидкости мышей в ИФА, выявленных с помощью биотинилированного тетрасахарида и синтетического КП, адсорбированных на твердой фазе, был выше по сравнению с использованием твердофазного бактериального КП. В реакции ингибирования ИФА МкАт распознавали соответствующие углеводные эпитопы растворенного в жидкой фазе бактериального КП *S. pneumoniae* серотипа 14 лучше, чем лиганд тетрасахарида и синтетический КП. *Заключение.* Для выявления МкАт к тетрасахариду в ИФА в качестве твердофазных антигенов предпочтительно использовать синтетические аналоги КП. Полученные МкАт к тетрасахариду могут быть использованы для определения представленности протективного тетрасахаридного эпитопа в КП при разработке пневмококковых вакцин.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 26—31

Ключевые слова: моноклональные антитела, изотип, синтетический тетрасахарид, *Streptococcus pneumoniae* серотипа 14, капсульный полисахарид

I.V.Yakovleva¹, E.A.Kurbatova¹, E.A.Akhmatova², E.V.Sukhova², D.V.Yashunsky²,
Yu.E.Tsvetkov², N.E.Nifantiev², V.V.Sviridov¹

THE PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO TETRASACCHARIDE — SYNTHETIC ANALOGUE OF THE CAPSULAR POLYSACCHARIDE OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* OF SEROTYPE 14 AND THEIR IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia

Aim. Production of monoclonal antibodies (mAb) to synthetic tetrasaccharide — repeating unit of the capsular polysaccharide (CP) of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 and their immunochemical characterization. *Materials and methods.* In order to generate the hybridoma producing mAb, mice were immunized with synthetic tetrasaccharide conjugated with bovine serum albumin (BSA) with following hybridization of B lymphocytes with mouse myeloma cells. Antibodies were obtained *in vitro* and *in vivo*. Immunochemical characterization of mAb to tetrasaccharide was carried out using a variety of ELISA options. *Results.* For the first time obtained mouse hybridoma, producing IgM to tetrasaccharide. The IgM titer of anti-tetrasaccharide antibodies in supernatants of clones and in the ascitic fluid of mice in ELISA detected by biotinylated tetrasaccharide and synthetic CP adsorbed on the solid phase was higher compared to the use of bacterial CP as well cover antigen. In the reaction of inhibition of the ELISA, the mAb recognized the corresponding carbohydrate epitopes of the bacterial CP of *S. pneumoniae* serotype 14 dissolved in the liquid phase better than tetrasaccharide ligand and synthetic CP. *Conclusion.* To detect mAb to tetrasaccharide in ELISA preferably to use synthetic analogues of the CP as solid phase antigens. The obtained mAb to tetrasaccharide can be used to determine the representation of the protective tetrasaccharide epitope of CP in the development of pneumococcal vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 26—31

Key words: monoclonal antibody, isotype, synthetic tetrasaccharide, *Streptococcus pneumoniae* serotype 14, capsular polysaccharide

ВВЕДЕНИЕ

Пневмококки являются причиной тяжелых инвазивных и неинвазивных заболеваний у детей и взрослых. Бактериальная клетка пневмококка окружена полисахаридной капсулой. Капсула пневмококка содержит уникальные углеводные повторяющиеся структуры, определяющие серотиповую принадлежность *S. pneumoniae*. По химической структуре капсульного полисахарида (КП) насчитывают более 90 серотипов *S. pneumoniae*, примерно 20 из которых имеют наибольшее клиническое значение [5]. Антитела к КП распознают углеводные структуры капсулы пневмококка, что приводит к опсонизации бактерий и защите от пневмококковой инфекции [15]. Получение специфичных и высокоаффинных антител к КП *S. pneumoniae*, предназначенных для серотиповой идентификации пневмококка и серологических методов исследований в лабораторных условиях, осложняется трудностью выделения и очистки КП от тейхоевых кислот, липопротеинов, белков наружной мембраны, нуклеиновых кислот и других антигенов микробной клетки и не позволяет охарактеризовать распознаваемые антителами отдельные углеводные эпитопы. Перечисленные недостатки устранимы при использовании синтетических олигосахаридов с известной химической структурой [2]. Современные методы химического синтеза позволяют получить олигосахариды различной длины и пространственной ориентации, обладающие способностью индуцировать образование антител, способных распознавать единичные антигенные детерминанты, и точно идентифицировать соответствующие углеводные эпитопы микроорганизма [13]. Синтетические олигосахариды могут быть использованы для получения МкАт [9], направленных к строго определенным углеводным макромолекулам капсулы пневмококка.

S. pneumoniae серотипа 14 относится к немногочисленным серотипам пневмококка, наиболее часто вызывающим заболевания у детей [5, 10]. КП *S. pneumoniae* серотипа 14 состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев [2]. В ранее проведенных исследованиях показано, что синтетический тетрасахарид *S. pneumoniae* серотипа 14, конъюгированный с белком-носителем, индуцировал образование опсонизирующих антител, обладающих протективными свойствами, и обладал преимуществом по сравнению с олигосахаридами другой химической структуры [2, 12, 14].

В настоящем исследовании для получения МкАт мы использовали конъюгированный с БСА тетрасахарид — синтетический аналог повторяющегося звена КП *S. pneumoniae* серотипа 14.

Цель работы — получение МкАт к синтетическому тетрасахариду — повторяющемуся звену капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 14 и их иммунохимическая характеристика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован спейсированный синтетический тетрасахарид (β -D-Gal-(1→4)- β -D-Glc-(1→6)-[β -D-Gal-(1→4)]- β -D-GlcNAc); а также биомолекулярные системы [7, 8] на его основе — конъюгаты с биотином и с БСА [4]. В соответствии с данными MALDI-TOF анализа БСА-гликоконъюгат содержал в среднем 11 тетрасахаридных лигандов, соединенных с БСА цепью, что было эквивалентно 10% углевода.

Синтетический КП *S. pneumoniae* серотипа 14, полученный с помощью реакции поликонденсации, представлял собой полимер, состоящий примерно из 10 повторяющихся тетрасахаридных звеньев [11].

Бактериальный КП получен из среды культивирования штамма *S. pneumoniae* серотипа 14 [1]. Присутствие КП в препарате подтверждено методом ЯМР-спектроскопии. Препараты высокоочищенных КП были предоставлены д.м.н. проф. Н.Е. Ястребовой (НИИВС им И.И.Мечникова).

Гибридома получена в результате слияния спленоцитов мыши BALB/c, 2-кратно иммунизированной неогликоконъюгатом дозой 10 мкг по углеводу, с клетками мышиной миеломы. Процедуру гибридизации проводили на 3 день после второй иммунизации. Выделение иммунных спленоцитов, слияние, культивирование культур, клонирование и селекцию технологичных клонов проводили по принятому протоколу. В результате проведенных экспериментов отобрана и клонирована гибридома 3G12. Дальнейшие эксперименты проводились с участием трех клонов-продуцентов этой культуры: 3G12/B10, 3G12/D4 и 3G12/G11. Нарботку антител проводили *in vitro* и *in vivo*. Гамма-глобулиновую фракцию белков, содержащих МкАт заданной специфичности, получали из среды культивирования клонов-продуцентов при 50% насыщении раствором сульфата аммония [3].

Изотип МкАт определяли методом встречной радиальной иммунодиффузии с антиизотипическими сыворотками (IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgGb, IgG3) в геле по Оухтерлони с использованием препаратов γ -глобулиновых фракций среды культивирования клонов-продуцентов.

Определение титра антител в супернатанте клонов и в асцитической жидкости мышей проводили с помощью ИФА при использовании в качестве твердофазных антигенов биотинилированного тетрасахарида, адсорбированного на покрытых стрептавидином планшетах Pierce (Thermo Scientific, США), а также синтетического и бактериального КП, адсорбированных на планшетах (Biomedicals, Россия) [6]. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой анти-мышинные IgM (Thermo Fisher Scientific, США). Оптическую плотность (ОП) продуктов реакции определяли на ИФА-ридере (iMark, Япония) при длине волны 450 нм. Точкой отсечения отрицательных результатов считали ОП₄₅₀ < 0,2.

Блокирование связывания МкАт с КП, адсорбированным на твердой фазе, проводили в реакции ингибирования ИФА при использовании в качестве ингибиторов спейсированного тетрасахарида, синтетического и бактериального КП.

Статистическую обработку данных проводили методом Манна-Уитни для независимых выборок при использовании программного обеспечения STATISTICA 10. Данные представлены средним значением \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изотип антител к тетрасахариду определяли методом встречной радиальной иммунодиффузии в геле по Оухтерлони. Для этого использовали выделенные из среды культивирования препараты γ -глобулиновых фракций, содержащие МкАт, и антиизотипические сыворотки мыши: IgG и IgM, а также IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 мыши. Все три клона продуцировали антитела М класса.

Таким образом, в результате эксперимента получено три клон-продуцента IgM-МкАт к тетрасахариду.

В супернатантах клонов биотинилированный тетрасахарид и синтетический КП выявляли IgM к тетрасахариду (рис. 1А). Различий между уровнем МкАт, продуцируемых всеми тремя клонами, не выявлено. При использовании бактериального КП в качестве твердофазного антигена уровень IgM был ниже, чем при использовании синтетических аналогов КП ($p < 0,05$).

Аналогичные результаты получены при исследовании асцитической жидкости мышей (рис. 1Б). Различий между уровнем IgM к синтетическим аналогам КП не выявлено, тогда как уровень антител к бактериальными КП был существенно ниже ($p < 0,05$).

Исследование конкурентного взаимодействия полученных МкАт с иммобилизованным на твердой фазе синтетическим КП и находящимися в растворе тетрасахаридом и синтетическим и бактериальным КП показало, что наиболее активно МкАт связывали бактериальный КП, $IC_{50} = 0,1$ мкг/лунка (рис. 2).

В результате исследования получены IgM-МкАт к тетрасахариду — синтетическому аналогу повторяющегося звена КП *S. pneumoniae* серотипа 14, способные распознавать соответствующие углеводные эпитопы не только синтетических аналогов КП, но и бактериального КП *S. pneumoniae* серотипа 14.

В настоящем исследовании впервые получены МкАт к синтетическому тетрасахариду — повторяющемуся звену КП *S. pneumoniae* серотипа 14, относящиеся к IgM изотипу. В ранее проведенных исследованиях показано, что тетрасахарид указанной структуры, конъюгированный с БСА, адсорбированный на гидроксиде алюминия, обладает наиболее высокой способностью стимулировать выработку опсонизирующих антител и высокой протективной активностью в опытах на животных [12, 14].

В реакции иммунодиффузии с антиизотипическими сыворотками подтверждена принадлежность полученных МкАт к IgM изотипу. При использовании в качестве

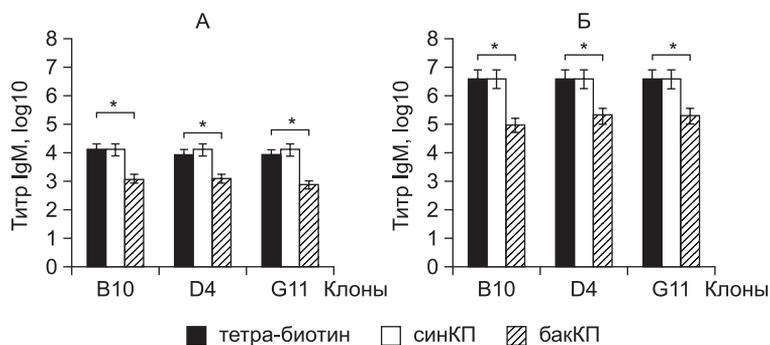


Рис. 1. Титр антител в супернатантах гибридных клонов в асцитической жидкости мышей в ИФА. А — супернатант; Б — асцитическая жидкость; * $p < 0,05$.

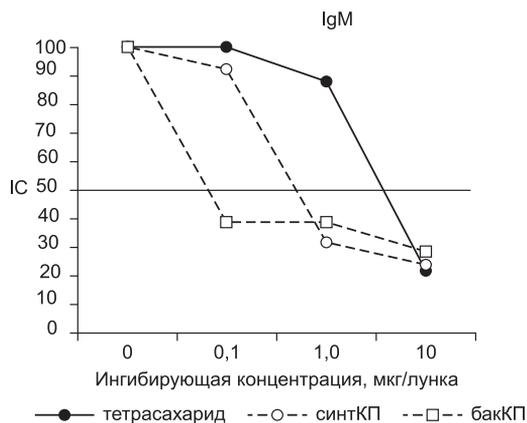


Рис. 2. Способность МкАт к тетрасахариду связывать лиганд тетрасахарида, синтетический и бактериальный КР в реакции ингибирования ИФА.

В качестве твердофазного антигена использован синтетический КР. ИС50 — 50% ингибирующая концентрация.

представленности протективного тетрасахаридного эпитопа в КР этого серотипа пневмококка при разработке пневмококковых вакцин.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 14-50-00126.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е. Специфический иммунный ответ к отдельным капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae* у здоровых доноров и лиц, вакцинированных пневмококковыми вакцинами. Журн. микробиол. 2015, 5: 20-26.
2. Генинг М.Л., Курбатова Е.А., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. Разработка подходов к созданию углеводной конъюгированной вакцины третьего поколения против *Streptococcus pneumoniae*: поиск оптимальных олигосахаридных лигандов. Усп. хим. 2015, 84: 1100-1113.
3. Методические рекомендации по получению гибридом-продуцентов моноклональных антител к бактериальным антигенам. Утверждены 29.11. 85 г. МЗ СССР.
4. Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е. и др. Синтез олигосахаридных фрагментов капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* тип 14 и их неогликоконъюгатов с бычьим сывороточным альбумином. Известия АН. Серия химическая. 2014, 2: 511-521.
5. Харит С.М. Пневмококковые вакцины. В кн.: Вакцины и вакцинация: национальное руководство. Под ред. В.В.Зверева, Б.Ф.Семенова, Р.М.Хайтова. М., ГОЭТАР-Медиа, 2011.
6. Akhmatova N.K., Kurbatova E.A., Akhmatov E.A. et al. The effect of a BSA conjugate of a synthetic hexasaccharide related to the fragment of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14 on the activation of innate and adaptive immune responses. Front. Immunol. 2016, 7: 1-11.
7. Ananikov V.P., Eremin D.B., Yakukhnov S.A. et al. Organic and hybrid systems: from science to practice. Mendeleev Commun. 2017, 27: 425-438.
8. Ananikov V.P., Galkin K.I., Egorov M.P. et al. Challenges in the development of organic and hybrid molecular systems. Mendeleev Commun. 2016, 26: 365-374.
9. Broecker F., Anish C., Seeberger P.H. Generation of monoclonal antibodies against defined oligosaccharide antigens. Methods Mol. Biol. 2015, 1331: 57-80.
10. Jansen W.T., Snippe H. Short-chain oligosaccharide protein conjugates as experimental pneumococcal vaccines. Indian J. Med. Res. 2004, 119 (Suppl): 7-12.

твердофазных антигенов синтетических аналогов КР МкАт хорошо распознавали представленные в них тетрасахаридные структуры. Меньшая способность МкАт связывать бактериальный КР, адсорбированный на твердой фазе, вероятно, обусловлена конформационными изменениями молекулы КР *S. pneumoniae* серотипа 14 при его иммобилизации на твердой фазе, что частично ограничивает доступ к его эпитопам для МкАт. Важно, что в растворе, как это показано нами в реакции ингибирования ИФА, МкАт лучше распознавали соответствующие эпитопы бактериального КР, чем его синтетических аналогов.

Таким образом, для выявления МкАт к тетрасахариду в ИФА в качестве твердофазных антигенов предпочтительно использовать синтетические аналоги КР. Полученные МкАт к тетрасахариду могут быть использованы для определения пред-

11. Kochetkov N.K., Nifant'ev N.E., Backinowsky L.V. Synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14. *Tetrahedron*. 1987, 43 (13): 3109-3121.
12. Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Akhmatova E.A. et al. Neoglycoconjugate of tetrasaccharide representing one repeating unit of the *Streptococcus pneumoniae* type 14 capsular polysaccharide induces the production of opsonizing IgG1 antibodies and possesses the highest protective activity as compared to hexa- and octasaccharide conjugates. *Front. Immunol.* 2017, 8: 1-13.
13. Reimer K.B., Gidney M.A., Bundle D.R., Pinto B.M. Immunochemical characterization of polyclonal and monoclonal *Streptococcus* group A antibodies by chemically defined glycoconjugates and synthetic oligosaccharides. *Carbohydr Res.* 1992, 232(1): 131-142.
14. Safari D., Dekker H.A., Joosten A.F. Identification of the smallest structure capable of evoking opsonophagocytic antibodies against *S. pneumoniae* type 14. *Infect. Immun.* 2008, 76 : 4615-4623.
15. Song J.Y., Moseley M.A., Burton R.L., Nahm M.H. Pneumococcal vaccine and opsonic pneumococcal antibody. *J. Infect. Chemother.* 2013, 3: 412-425.

Поступила 25.02.18

Контактная информация: Курбатова Екатерина Алексеевна, д.м.н., 105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-57-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*И.В.Фельдблюм*¹, *К.А.Субботина*¹, *С.Д.Новгородова*¹, *Г.М.Игнатьев*^{2,6}, *М.Х.Альева*¹,
*М.К.Ерофеева*³, *В.Г.Орловский*⁴, *И.А.Ленева*⁵, *С.Я.Мельников*², *Е.В.Казакова*²,
*Е.П.Начарова*², *В.П.Трухин*²

РЕАКТОГЕННОСТЬ, БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ РАСЩЕПЛЕННОЙ ВАКЦИНЫ ФЛЮ-М ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВЗРОСЛЫХ 18-60 ЛЕТ

¹Пермский государственный медицинский университет им. Е.А.Вагнера; ²С.-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов; ³НИИ гриппа, С.-Петербург; ⁴ООО «Инфекционный центр», Новосибирск; ⁵НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ⁶Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова, Москва

Цель. Оценка реактогенности, безопасности и иммуногенности вакцины гриппозной инактивированной расщепленной Флю-М. *Материалы и методы.* Реактогенность, безопасность и иммуногенность препарата исследованы в многоцентровом двойном слепом сравнительном рандомизированном клиническом исследовании при иммунизации добровольцев 18-60 лет (препарат сравнения — инактивированная сплит-вакцина для профилактики гриппа Ваксигрип). *Результаты.* Отечественная расщепленная гриппозная вакцина Флю-М производства СПбНИИВС характеризуется хорошей переносимостью, высоким профилем безопасности и достаточной иммуногенностью, сопоставимой с гриппозной вакциной Ваксигрип. *Заключение.* Вакцина гриппозная инактивированная расщепленная Флю-М производства СПбНИИВС может быть рекомендована для регистрации на территории Российской Федерации для специфической профилактики гриппа у взрослых в возрасте от 18 до 60 лет.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 31—37

Ключевые слова: вакцина против гриппа Флю-М, взрослое население 18-60 лет, безопасность, реактогенность, иммуногенность, рандомизированное клиническое исследование