

На правах рукописи

ЗАЙЦЕВ Антон Евгеньевич

**«ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ
КОНЬЮГИРОВАННЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ – СИНТЕТИЧЕСКИХ
АНАЛОГОВ ФРАГМЕНТОВ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА
Streptococcus pneumoniae серотипа 3»**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискании ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Курбатова Екатерина Алексеевна

Официальные оппоненты:

Калюжин Олег Витальевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, профессор;

Шубина Ирина Жановна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория клеточного иммунитета, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Центр экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

Защита диссертации состоится «19» мая 2022 г на заседании диссертационного совета Д 001.035.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по адресу: 105064, г. Москва, Малый Казенный пер., д. 5А

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и на сайте www.instmech.ru

Автореферат разослан « » марта 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Яковлева Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) – условно патогенные грамположительные бактерии. Большая часть штаммов пневмококка окружена капсулой, содержащей полисахариды. Полимерные цепи капсульного полисахарида (КП) состоят из олигосахаридных повторяющихся звеньев [Kamerling J.P., 1999]. В настоящее время описано более 90 серологических типов *S. pneumoniae*, различающихся по химической структуре и антигенным свойствам КП [Костюкова Н.Н. и соавт., 2014]. Примерно 20 серотипов пневмококка могут быть причиной тяжелых заболеваний с различной локализацией патологического процесса у детей и взрослых [Ostergaard C. et al., 2004; Bender J.M. et al., 2008; Harboe Z.B. et al., 2009; Weinberger D.M. et al., 2010; Kawasaki S. et al., 2015].

КП клинически значимых серотипов *S. pneumoniae* входят в состав современных пневмококковых вакцин. Данные о профилактической и иммунологической эффективности КП *S. pneumoniae* серотипа 3 – противоречивы, и дискуссии по этому вопросу продолжаются. В одних исследованиях показана эффективность КП серотипа 3 [Douglas R.M. et al., 1983; Lodi L. et al., 2019; Laughlin J.M. et al., 2019; Thompson A. et al., 2019], в других - отмечают его недостаточную иммуногенность [Nurkka A. et al., 2004; Andrews N.J. et al., 2005; Simonsen V. et al., 2005; Prymula R. et al., 2006; Schuerman L. et al., 2007; Shiramoto M. et al., 2015]. Это объясняется тем, что в отличие от других серотипов пневмококка, полисахарид капсулы *S. pneumoniae* серотипа 3 не образует ковалентной связи с пептидогликаном клеточной стенки и, высвобождаясь в окружающую среду, связывает антитела, индуцированные введением вакцин [Choi E.H. et al., 2016]. Недостаточная иммунологическая активность КП *S. pneumoniae* серотипа 3 также может быть обусловлена образованием антител к различным эпитопам КП, в том числе неиммуногенным [Tian H. et al., 2009]; смещением рамки считывания при экспрессии генов, ответственных за продукцию КП [Cartee R.T. et al., 2005; Louçano J. et al., 2020].

Протективные эпитопы КП *S. pneumoniae* могут быть представлены синтетическими олигосахаридами с точно охарактеризованной химической

структурой [Jansen W.T. et al., 2004; Weishaupt M.W. et al., 2016]. Конъюгация олигосахаридов с белком-носителем индуцирует Т-зависимый иммунный ответ, необходимый для образования антител и защиты от заражения пневмококком [Song J.Y. et al., 2013; Choi E.H. et al., 2016]. Некоторые неогликоконъюгаты обладают даже более высокой иммуногенностью, чем конъюгированные КП [Jansen W.T. et al., 2004].

До настоящего времени не проводили углубленного сравнительного исследования иммунологической активности конъюгированных ди-, три- и тетрасахаридов, соответствующих фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 3. Выбор наиболее иммуногенного олигосахарида открывает новые возможности для повышения иммунологической эффективности этого компонента в составе пневмококковых вакцин.

Степень разработанности темы. В опытах активной защиты мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 конъюгаты синтетических ди-, три- и тетрасахаридов характеризовались примерно одинаковой протективной активностью [Benaissa-Trouw V. et al., 2001]. Последующие исследования показали, что конъюгаты тетра-, пента-, гекса-, гепта- и октасахарида вызвали образование олигосахаридспецифических IgG-антител у мышей и обладали протективной активностью [Parameswarappa S.G. et al., 2016, Kaplonek P. et al., 2018, Xiong C. et al., 2018, Feng S. et al., 2019]. Исследована возможность расширения спектра действия конъюгированных пневмококковых вакцин путем включения в их состав конъюгатов CRM₁₉₇ с синтетическими олигосахаридами, соответствующими фрагментам КП *S. pneumoniae*, серотипы которых не входят в состав вакцин; разработана формула пентавалентной полусинтетической вакцины [Kaplonek P. et al., 2018; 2022]. Данных по оценке молекулярно-клеточного механизма действия неогликоконъюгатов на иммунную систему в доступной литературе не найдено. Показано, что при экспериментальной пневмококковой инфекции у мышей, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3, ключевым эффекторами иммунитета являются: $\gamma\delta$ Т-клетки, НКТ-клетки при продукции Th1 и / или Th17-цитокинов [Ivanov S. et al., 2012; 2014].

Цель. Исследование иммунологической активности конъюгатов синтетических ди-, три- и тетрасахаридов, соответствующих фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, с бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Задачи исследования:

1. Оценить антигенную активность ди-, три- и тетрасахаридов в сравнении с капсульным полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 3.
2. Определить изотип и уровень антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгатами ди-, три- и тетрасахарида с БСА, адсорбированными на геле алюминия гидроксида.
3. Оценить опсонизирующую способность олигосахаридспецифических антител.
4. Исследовать протективную активность гликоконъюгатов в опытах активной защиты мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3.
5. Определить ключевые цитокины и маркеры активации клеточно-опосредованного звена иммунитета у мышей, иммунизированных гликоконъюгатами.

Научная новизна. Впервые показано, что синтезированные ди-, три- и тетрасахариды, имеют общие иммунологически активные антигенные структуры с капсульным полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 3. Установлено, что конъюгат тетрасахарида, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, обладает наибольшей способностью к активации эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета.

С помощью модифицированного метода ИФА с использованием биотинилированных олигосахаридов впервые показано, что тетрасахарид в высоком титре выявляет антитела, специфичные к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3, по сравнению с ди- и трисахаридом.

Конъюгат тетрасахарида с БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, индуцирует образование олигосахаридспецифических IgM-, IgG1-,

IgG2a- и IgG2b-антител у мышей, при меньшем разнообразии изотипов в ответ на введение конъюгатов ди- и трисахарида.

На модели пневмококковой инфекции у мышей, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3, впервые показано, что протективная активность адсорбированных на геле алюминия гидроксида конъюгатов три- и тетрасахарида, выше, чем адсорбированного конъюгата дисахарида.

Впервые показан высокий уровень продукции Th1/Th2/Th17 цитокинов спленоцитами мышей *in vitro*, индуцированный биотинилированными олигосахаридами, при более высокой стимулирующей активности тетрасахарида.

На примере конъюгата дисахарид-БСА раскрыты дополнительные свойства конъюгированных олигосахаридов, характеризующиеся способностью повышать уровень IL-17A, (TCR⁺) $\gamma\delta$ Т-клеток, CD5⁺ В1-клеток, а также активированных клеток, экспрессирующих молекулы МНС класса II.

Теоретическая значимость. Полученные данные о действии конъюгированных олигосахаридов, соответствующих фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, вносят вклад в понимание иммунологических механизмов поствакцинальной защиты от пневмококковой инфекции на системном, клеточном и молекулярном уровнях, расширяя знания в области вакцинологии и фундаментальной иммунологии. Обосновано проведение дальнейших исследований, направленных на поиск агонистов $\gamma\delta$ Т- и В1-клеток.

Практическая значимость. Высокая иммуногенность конъюгата синтетического тетрасахарида с БСА указывает на перспективность его использования в составе конъюгатов с белками – носителями, разрешенными к применению в клинической практике, а также как компонента при разработке поливалентной полусинтетической пневмококковой вакцины третьего поколения. Использование биотинилированного тетрасахарида при конструировании ИФА тест-систем позволит с высокой степенью точности идентифицировать КП *S. pneumoniae* серотипа 3 или определять уровень антител к КП.

Методология и методы исследования. Ди-, три- и тетрасахариды и их конъюгаты синтезированы в ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д.

Зелинского РАН. Для индукции Т-зависимого иммунного ответа у мышей исследуемые олигосахариды конъюгировали с БСА. Для определения уровня антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) использовали конъюгаты олигосахаридов с биотином, иммобилизованные на планшетах, покрытых стрептавидином. Выбор оптимальной иммунизирующей дозы и схемы иммунизации проводили на мышах, иммунизированных гликоконъюгатами без адьюванта и с адьювантом (алюминия гидроксид). В качестве препарата сравнения использовали 13-валентную конъюгированную пневмококковую вакцину (Превенар 13), содержащую в своем составе КП *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгированный с CRM₁₉₇ и алюминия фосфат в качестве адьюванта. Опсонизирующую активность антител определяли по способности нейтрофилов и моноцитов крови интактных мышей захватывать инактивированные клетки *S. pneumoniae* серотипа 3 в присутствии иммунной и нативной сывороток с детекцией результатов с помощью проточной цитофлуориметрии. Протективную активность гликоконъюгатов исследовали в опытах активной защиты мышей от заражения штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3. Продукцию цитокинов определяли *in vitro* в монокультуре спленоцитов неиммунизированных мышей при предварительном их культивировании с конъюгатами ди-, три- или тетрасахарида с биотином, иммобилизованными на планшетах, покрытых стрептавидином, а также *ex vivo*, в сыворотке крови мышей, при детекции результатов с помощью проточной цитофлуориметрии. Экспрессию мембраноассоциированных молекул на мононуклеарных лейкоцитах селезенки мышей определяли путем использования меченых моноклональных антител к поверхностным маркерам иммунокомпетентных клеток с оценкой результатов методом проточной цитофлуориметрии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Тетрасахарид, по сравнению с ди- и трисахаридом, активно взаимодействует с антителами к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3, не вступая в реакцию с антителами другой углеводной специфичности, а антитела, индуцированные к тетрасахариду, характеризуются специфичностью к капсульному полисахариду.

2. Конъюгат тетрасахаарида с БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, по сравнению с адсорбированными конъюгатами ди- и трисахаарида, после двукратной иммунизации мышей стимулирует образование более высокого уровня опсонизирующих антител, относящихся к иммуноглобулинам разных изотипов, и характеризуется высокой протективной активностью.

3. Молекулярно-клеточными маркерами, ассоциированными с иммуногенной и протективной активностью у мышей, иммунизированных конъюгатом дисахаарида с БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, являются IL-17A, (TCR⁺) $\gamma\delta$ Т-клетки и CD5⁺ В1-клетки на фоне повышения количества клеток, экспрессирующих молекулы МНС класса II.

Личный вклад автора в проведенное исследование состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, включая разработку дизайна исследования, научно-информационный поиск по теме диссертации, подготовку обзора литературы, определение цели и задач исследования, проведение иммунизации животных, иммунологических и иммунохимических исследований, статистическую обработку данных, на основании которых сформулированы основные положения диссертационной работы, научно-практическая значимость исследования и выводы диссертации. Подготовка основных публикаций проведена при непосредственном участии автора.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Достоверность полученных результатов определяется использованием в работе современных методов иммунологических исследований, репрезентативностью выборки, адекватным статистическим анализом. Научные положения и выводы диссертации обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на научной конференции с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам», посвященной 100-летию основания НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, 18-20 апреля 2019 г); XXII Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Москва, 24-26 ноября 2019); научной конференции молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology" в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета (Москва, 11-12 марта 2020 года); научной конференции молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology", посвященной 300-летию РАН (Москва, 30-31 марта 2021 г, устный доклад, 2-е место).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-73-30017 «Разработка фундаментальных подходов для создания на основе углеводных лигандов вакцин третьего поколения и иммуноферментных диагностикумов для обнаружения и предотвращения клинически значимых бактериальных и грибковых инфекций» (2019-2022).

Апробация научно-квалификационной работы (диссертация) состоялась на конференции отдела иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова 27 октября 2021 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 4 – в материалах международных конференций.

Структура и объём работы. Материалы диссертации изложены на 135 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 19 таблицами, 5 рисунками, 1 схемой и 1 фотографией. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 202 источника (из них – 10 отечественных и 192 зарубежных авторов).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Ди-, три- и тетрасахариды (*Схема 1*), соответствующие одному, полутора и двум повторяющимся звеньям КП *S. pneumoniae* серотипа 3, синтезированы в ФГБУН ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН (лаборатория гликоконъюгатов, заведующий лабораторией член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор Н.Э. Нифантьев). Для иммунизации животных олигосахариды конъюгировали с БСА скваратным методом. Для идентификации индуцированных антител в ИФА использовали конъюгаты олигосахаридов с биотином, полученные методом ацилирования, которые иммобилизовали на пластике планшетов, покрытых стрептавидином [Цветков Ю.Е. и соавт., 2017]. Лиофилизированные конъюгаты хранили в стеклянных флаконах при температуре от 2° С до 8° С.

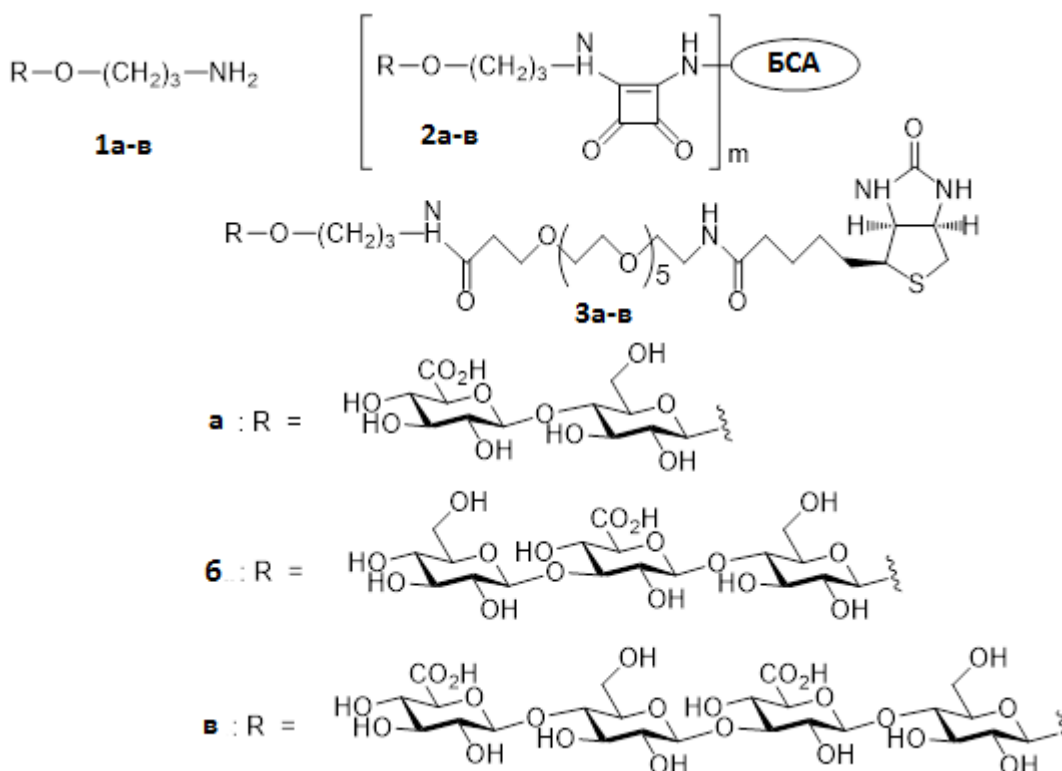


Схема 1. Структура олигосахаридов, соответствующих фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, и их конъюгатов.

Примечание: а) дисахарид, б) трисахарид; в) тетрасахарид; 1 а-в) спейсер; 2 а-в) конъюгаты олигосахаридов с БСА; 3 а-в) конъюгаты олигосахаридов с биотином.

Методом MALDI-TOF анализа установлено, что конъюгаты ди-, три- и тетрасахарида с БСА содержали в среднем 19, 18 и 16 олигосахаридных лигандов на одну молекулу белка соответственно. Содержание углеводов в конъюгатах составило 9, 13 и 15% соответственно [Tsvetkov YE., et al. 2017].

Бактериальный капсульный полисахарид получен в лаборатории иммунохимической диагностики ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (заведующий лабораторией д.м.н., профессор Н.Е. Ястребова) из штамма *S. pneumoniae* серотипа 3 №10196 [Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е., 2015].

Конъюгированная 13-валентная пневмококковая вакцина Превенар 13 (фирма “Pfizer”, США), содержащая в своем составе конъюгат КП *S. pneumoniae* серотипа 3 с CRM₁₉₇, использована в качестве референс-препарата в разовой иммунизирующей дозе 1,1 мкг/мышь по КП серотипа 3, что эквивалентно ½ дозы, рекомендуемой для человека.

Лабораторные животные. Мыши линии BALB/c (самцы) (n=250) массой 14-16 г получены из питомника НЦ биомедицинских технологий (филиал «Андреевка»). Протоколы экспериментов утверждены этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Иммунные сыворотки. Гипериммунные антибактериальные кроличьи сыворотки к различным серотипам пневмококка, а также к некоторым грамотрицательным и грамположительным бактериям получены в лаборатории иммунохимической диагностики ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Иммунизация мышей, определение титра и изотипа антител в ИФА. Мышей иммунизировали двукратно внутрибрюшинно конъюгатами ди-, три- и тетрасахарида с БСА (2,5; 5; 10 или 20 мкг в расчете на углевод), адсорбированными на геле алюминия гидроксида (Sigma–Aldrich Co., США) (250 мкг/доза), с интервалом 14 суток. Через 2 недели в сыворотке крови иммунизированных мышей определяли титр и изотип антител (АТ) углеводной специфичности методом ИФА. В качестве антигена в твердофазном ИФА использовали биотинилированные олигосахариды или КП *S. pneumoniae* серотипа 3. Оптическую плотность (ОП) определяли с помощью микропланшетного ИФА-

ридера (iMark, Bio-Rad, Япония) при длине волны 450 нм. Титр АТ представляли в виде разведения сыворотки или трансформировали значения в \log_{10} .

Определение антител к двуспиральной ДНК проводили методом твердофазного ИФА при иммобилизации на дне лунок пластиковых планшетов препарата нативной ДНК, полученной из спермы лосося (Boehringer GmbH, Германия). Результаты учитывали на многоканальном автоматическом фотометре (Titertech Multiscan MC, Flow Laboratories, Англия) при длине волны 490 нм (работу выполняли на базе лаборатории иммунохимической диагностики).

Антигенсвязывающую способность антител исследовали в реакции ингибирования ИФА при прибавлении к иммунным сывороткам лигандов олигосахаридов или КП серотипа 3. Определяли IC_{50} – концентрацию антигена, уменьшающую OP_{450} в 2 раза.

Антитело-зависимый фагоцитоз (опсонофагоцитоз). Количество нейтрофилов и моноцитов периферической крови интактных мышей ($n=10$), захвативших инактивированные ацетоном FITC-меченные бактерии *S.pneumoniae* серотипа 3, обработанные иммунной и нативной сыворотками, определяли с помощью проточного цитофлуориметра (Cytomix FC-500, Beckman Coulter, США, с программным обеспечением СХР). Результат представляли процентах.

Протективная активность. Мышей, иммунизировали внутрибрюшинно гликоконъюгатами (2,5; 5; 10 или 20 мкг по углеводу на мышь) 2-кратно с интервалом 14 суток. Через 2 недели животных заражали *S. pneumoniae* серотипа 3 №3 (ЦКП НИИВС им. И.И. Мечникова) путем внутрибрюшинного введения 10^4 колониеобразующих единиц на мышь (5,6 LD_{50}). Количество выживших животных учитывали на 16 сутки после заражения.

Содержание бактериальных эндотоксинов в гликоконъюгатах определяли хромогенным ЛАЛ-тестом по конечной точке в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» 42-0062-07. Результат оценивали в единицах эндотоксина (ЕЭ). Содержание эндотоксинов в конъюгатах ди-, три- и тетрасахаридов с БСА составляло 0,08-0,11 ЕЭ/мл. Исследование проведено в испытательной лаборатории ООО «НПО «ЛАЛ-Центр», г. Москва, Россия.

Продукция цитокинов. Спленоциты неиммунизированных мышей ($2,5 \times 10^5$ клеток/лунка) вносили в лунки стрептавидиновых планшетов (Pierce, США) с иммобилизованными на их поверхности биотинилированными олигосахаридами, и инкубировали 24 ч при 37°C [Komarova B.S. et al., 2018]. Содержание цитокинов в супернатанте клеток определяли с помощью набора реагентов FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10-plex Kit (eBioscience, США), содержащего бусы, покрытые моноклональными антителами к цитокинам (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, GM-CSF, IFN γ и TNF α).

Концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей определяли с помощью набора реагентов FlowCytomix Mouse Th1/Th2 Kit 14-plex (eBioscience, США), с бусами, покрытыми моноклональными антителами к цитокинам (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IFN γ и TNF α). Детекцию результатов проводили методом проточной цитофлуориметрии (FC-500, Beckman Coulter, США).

Экспрессия поверхностных молекул на мононуклеарных клетках селезенки мышей. Спленоциты мышей обрабатывали анти-мышинными антителами, конъюгированными с фикоэритрином (PE) или флуоресцеин-изоцианатом (FITC): CD3, CD4, CD8, CD19, CD5.2, NK1.1, CD25, CD4/CD25 (Treg), TCR (гамма-дельта Т) и I-EK (МНС класса II) (eBioscience, США) при 4°C в течение 30 мин. Результаты оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, представляя их как количество иммунокомпетентных клеток (в %), экспрессирующих на поверхностной мембране соответствующие маркеры.

Статистический анализ. Результаты представляли средним значением \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Для оценки различий между сравниваемыми группами использовали критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Выживаемость мышей после заражения оценивали с помощью точного критерия Фишера. Значения $P \leq 0,05$ считали статистически значимыми. Программное обеспечение Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Антигенная активность ди-, три- и тетрасахаридов

Наличие общих антигенных детерминант у олигосахаридов и КП *S. pneumoniae* серотипа 3 определяли по способности АТ, индуцированных к КП, взаимодействовать с биотинилированными ди-, три- и тетрасахаридами методом ИФА, а также по способности лигандов олигосахаридов блокировать связывание АТ, специфичных к КП или олигосахаридам, с биотинилированными олигосахаридами или КП, иммобилизованными на твердой фазе, методом ингибирования ИФА.

Биотинилированный тетрасахарид выявлял IgG-АТ к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 в исследуемой сыворотке в более высоком титре по сравнению с ди- и трисахаридом (\log_{10} 3,2; 2,0; 2,4 соответственно) и не взаимодействовал с АТ к *S. pneumoniae* серотипов 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 14, 19F, 23F, *Haemophilus influenzae* типа b, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Рис.1).

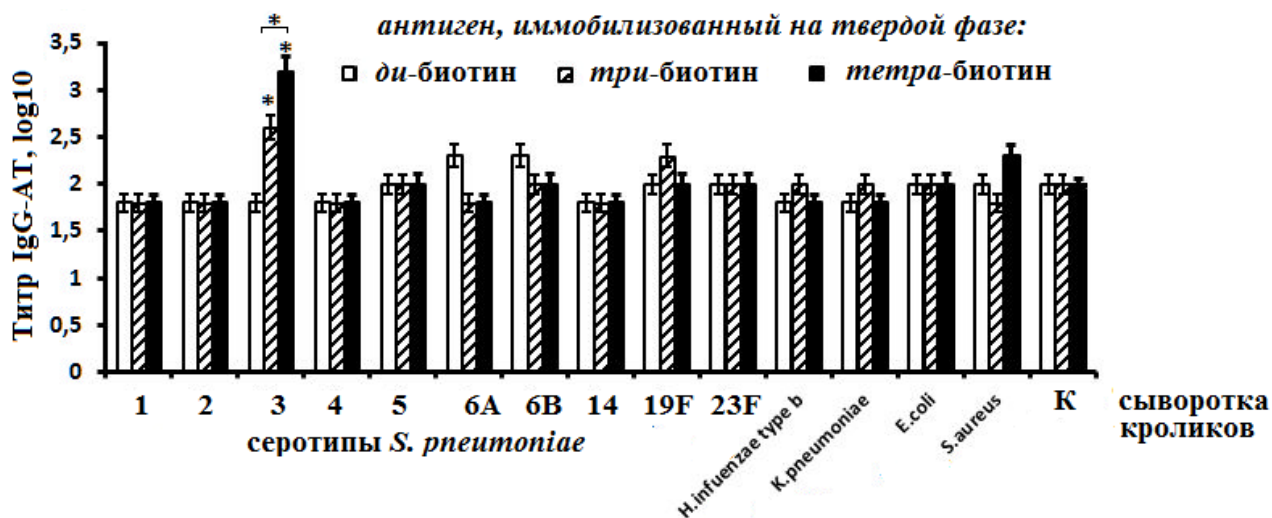


Рис.1. Специфичность взаимодействия АТ, индуцированных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, с биотинилированными олигосахаридами в ИФА.

Примечание. К - контроль (нативная сыворотка). Каждый образец пуловой иммунной сыворотки кроликов (n=2) исследовали в 4-х повторях. $M \pm SD$. Тест Манна-Уитни, * $P < 0,05$ по сравнению с контролем и гетерологичными сыворотками.

Способность IgG-АТ, специфичных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, связывать свободные олигосахариды (лиганды) показана в реакции ингибирования ИФА при использовании иммобилизованных на твердой фазе конъюгатов ди-, три- и тетрасахарида с биотином (Рис.2).

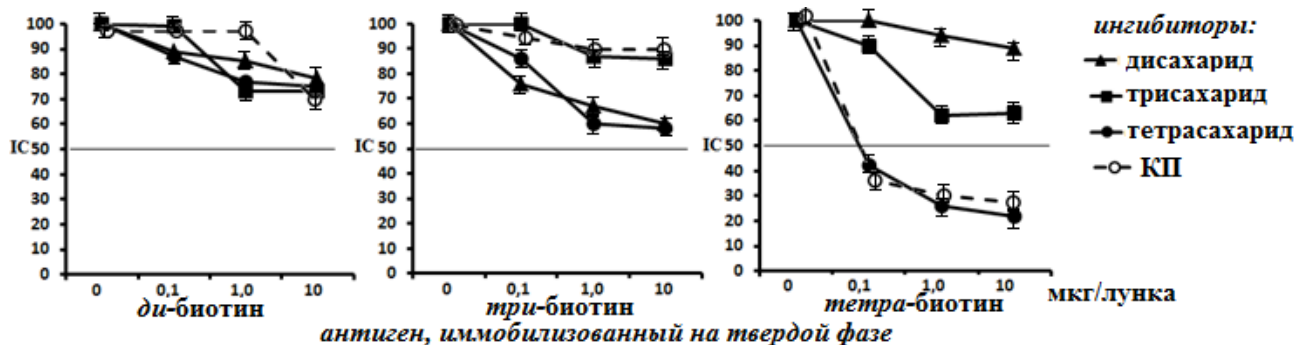


Рис.2. Блокирование лигандами взаимодействия IgG-АТ, индуцированных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, с иммобилизованными на твердой фазе биотинилированными олигосахаридами, в реакции ингибирования ИФА.

Примечание. Каждый образец пуловой иммунной сыворотки кроликов (n=2) исследовали в 4-х повторях. M±SD.

Лиганды ди- и трисахарида характеризовались слабой способностью блокировать связывание IgG-АТ, индуцированных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, независимо от использованного биотинилированного олигосахарида, иммобилизованного на планшетах, покрытых стрептавидином. В системе сыворотка к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 / биотинилированный тетрасахарид лиганд тетрасахарида связывал IgG-АТ к КП в той же концентрации, что и очищенный бактериальный КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (IC₅₀ = 0,1 мкг/лунка).

В системе сыворотка к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 / бактериальный КП только лиганд тетрасахарида обладал ингибирующей активностью, сопоставимой с активностью КП *S. pneumoniae* серотипа 3 в максимальной из испытанных концентраций (10 мкг/лунка) (**Рис.3 А**).

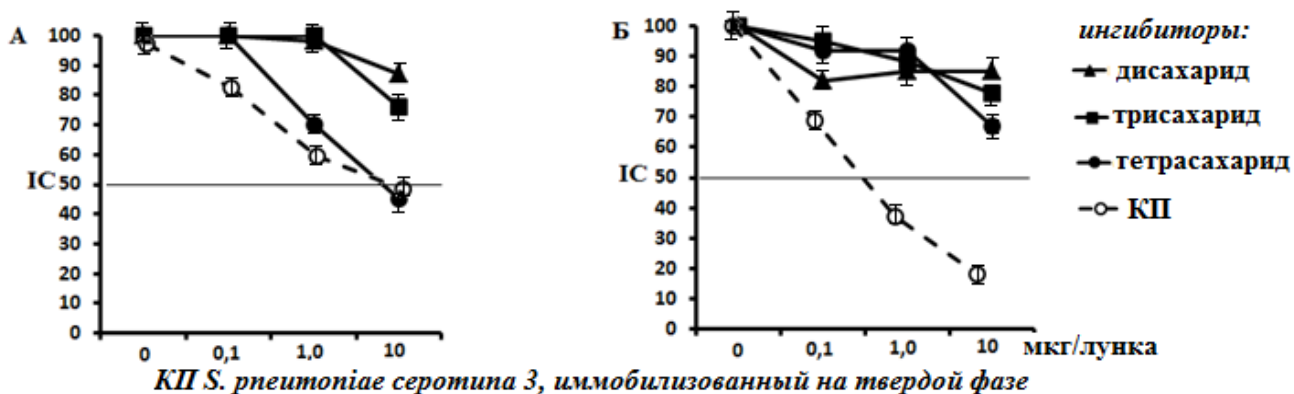


Рис.3. Блокирование лигандами взаимодействия IgG-АТ, индуцированных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, с иммобилизованным на твердой фазе КП, в реакции ингибирования ИФА.

Примечание. А) Антибактериальная сыворотка кроликов (n=2) к *S. pneumoniae* серотипа 3. Б) Сыворотка мышей (n=6), иммунизированных вакциной Превенар 13, содержащая CRM₁₉₇-КП *S. pneumoniae* серотипа 3. Каждый образец пуловой иммунной сыворотки исследовали в 4-х повторях. M±SD.

Ингибирующая активность всех исследованных лигандов в сыворотке крови животных, иммунизированных вакциной Превенар 13, не достигала IC₅₀ (Рис. 3 Б).

Различия между связыванием АТ с лигандами в антибактериальной сыворотке и в сыворотке к КП, входящему в состав пневмококковой вакцины, могут быть обусловлены строением активных центров антител, определяемых структурой КП, использованного для иммунизации животных: в одном случае - нативного бактериального, в другом – подвергнутого химической модификации в процессе получения вакцины.

Показано, что лиганд тетрасахарида, по сравнению с ди- и трисахаридом, активно блокировал связывание IgG1-АТ, специфичных к олигосахаридной части конъюгатов, с КП, иммобилизованным на твердой фазе (Рис. 4А).

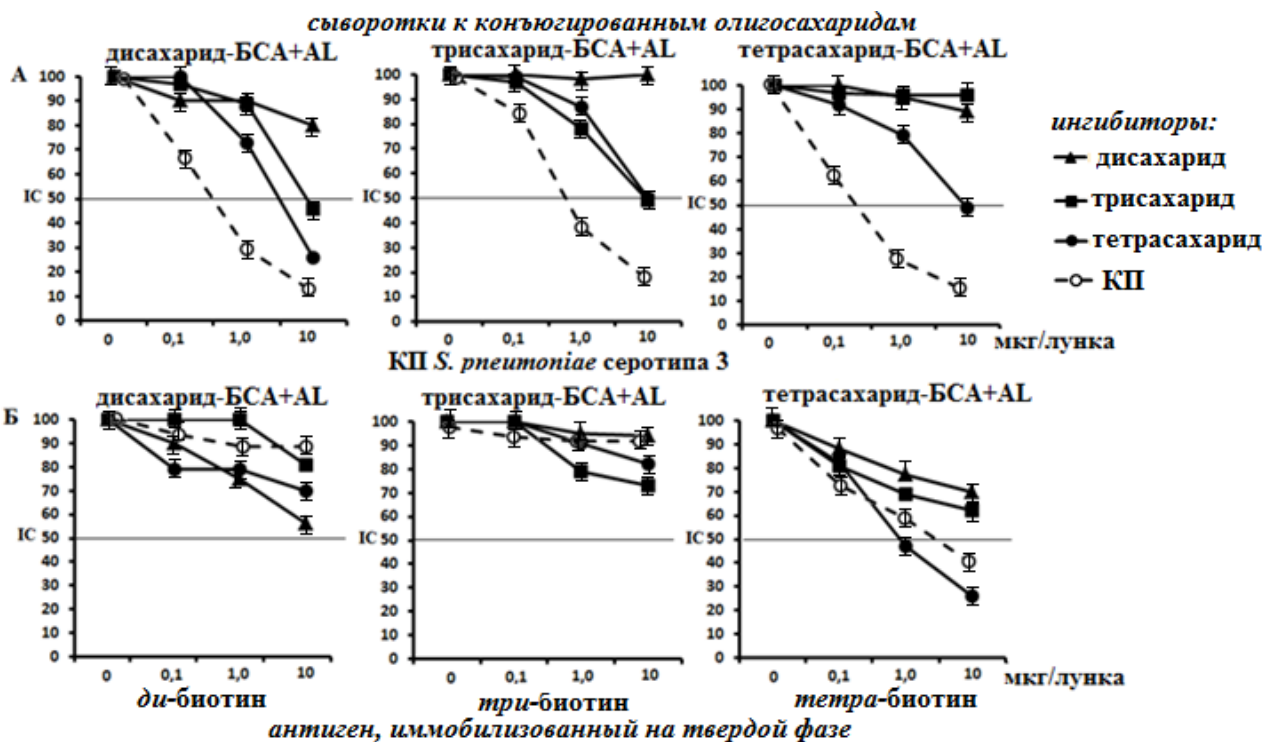


Рис 4. Блокирование лигандами и КП взаимодействия олигосахаридспецифических IgG1-АТ с КП (А) или биотинилированными олигосахаридами (Б), иммобилизованными на твердой фазе, в реакции ингибирования ИФА.

Примечание. AL – алюминия гидроксид. Каждый образец пуловой иммунной сыворотки мышей (n=6 для каждого конъюгата) исследовали в 4-х повторах. M±SD.

При использовании в качестве антигенов в твердофазном ИФА биотинилированных олигосахаридов, только лиганд тетрасахарида и КП *S.*

pneumoniae серотипа 3 блокировали связывание АТ, специфичных к тетрасахариду, при условии иммобилизации на твердой фазе конъюгата тетрасахарид-биотин (*Рис. 4Б*).

2. Иммуногенность конъюгатов олигосахаридов с БСА

Конъюгат тетрасахарида с БСА (20 мкг по углеводу на мышь), адсорбированный на геле алюминия гидроксида, приводил к образованию у мышей, на 14 сутки после 2-кратной иммунизации, самого высокого уровня IgG1-АТ, специфичных к КП, иммобилизованному на твердой фазе (*Рис.5*).

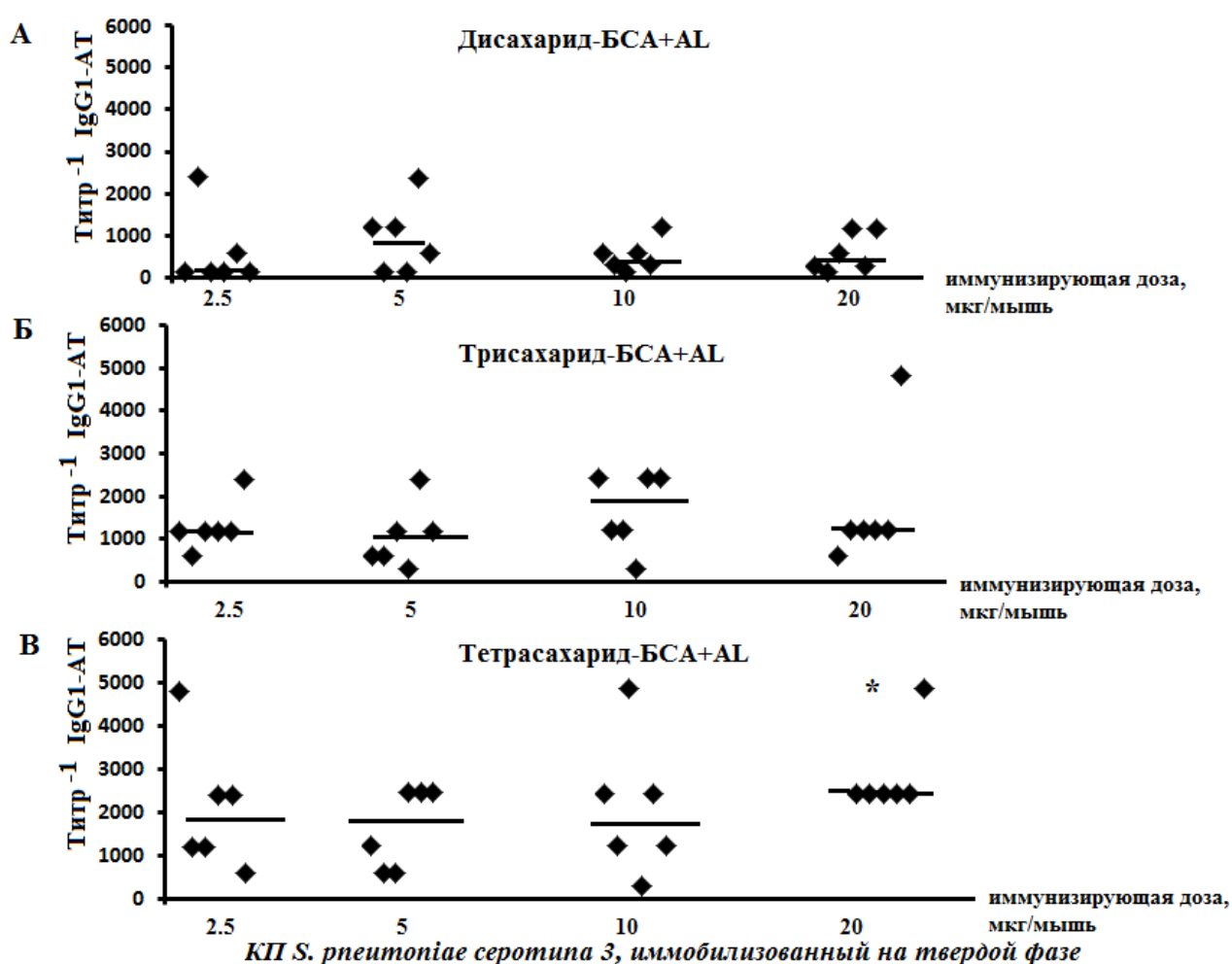


Рис.5. Титр IgG1-АТ, специфичных к КП, иммобилизованному на твердой фазе, в сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгатами олигосахаридов с БСА.

Примечание. 6 мышей на иммунизирующую дозу. Тест Манна-Уитни, * $P < 0,05$ по сравнению с конъюгатами ди- и трисахаридов с БСА в дозе 20 мкг на мышь.

С помощью биотинилированных ди-, три- и тетрасахаридов, иммобилизованных на твердой фазе, в сыворотках крови мышей, полученных

через 14 суток после 2-ой иммунизации гликоконъюгатами, выявлены IgM- и IgG-АТ (**Рис.6**). Наибольшее разнообразие изотипов IgG-АТ: IgG1, IgG2a и IgG2b (\log_{10} 3,9; 2,4; 2,9 соответственно), выявлено в сыворотке к конъюгату тетрасахарид-БСА в гомологичной системе. IgG1- и IgG2a-АТ к CRM₁₉₇-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13), выявляли только с помощью биотинилированного тетрасахарида. IgG3-АТ не обнаружены.

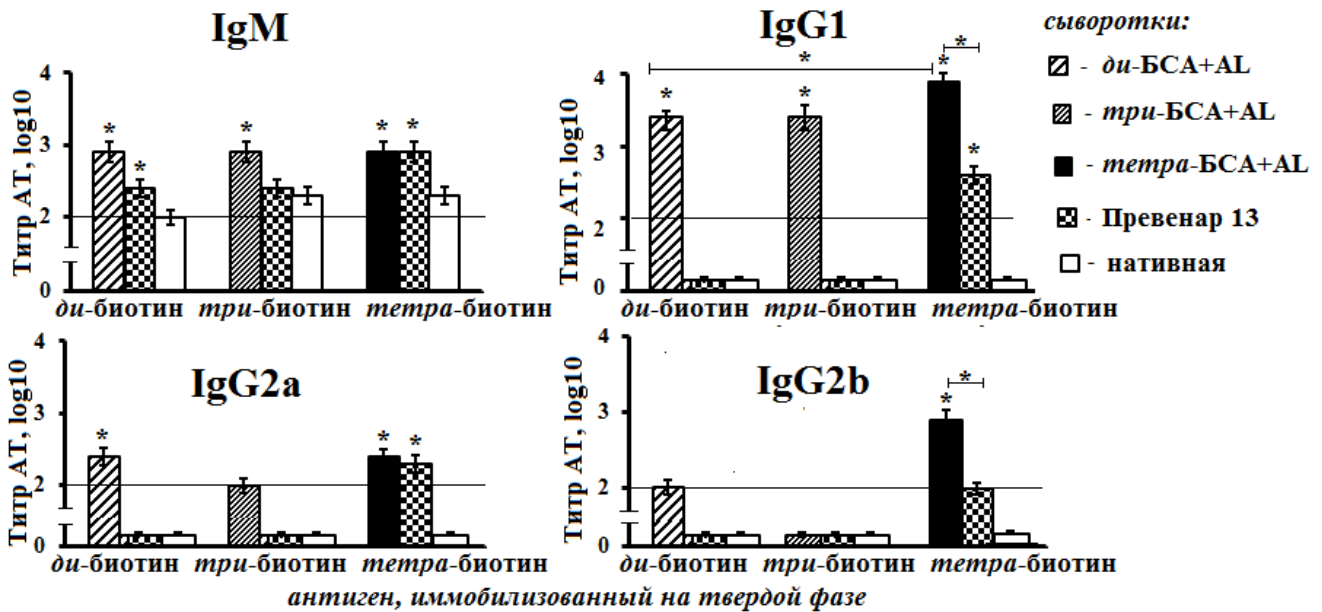


Рис.6. Изотипы олигосахаридспецифических АТ у иммунизированных мышей.

Примечание. АЛ – алюминия гидроксид. Горизонтальная линия отсекает отрицательные результаты. Каждый образец пуловой иммунной сыворотки мышей (n=6 для каждого конъюгата) исследовали в 4-х повторах. $M \pm SD$. Тест Манна-Уитни, * $P < 0,05$ по сравнению с нативной сывороткой.

При оценке опсонизирующей активности олигосахарид-индуцированных АТ установлено, что нейтрофилы (**Рис 7А**) и моноциты (**Рис.7Б**) интактных мышей захватывали больше инактивированных бактерий *S. pneumoniae* серотипа 3 (%) в присутствии сывороток к ди-, три- и тетрасахариду по сравнению с использованием нативной сыворотки ($P < 0,05$). Только в присутствии сыворотки к конъюгату тетрасахарид-БСА фагоцитарная активность нейтрофилов и моноцитов крови мышей была выше по сравнению с использованием сыворотки к CRM₁₉₇-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13) ($P < 0,05$).

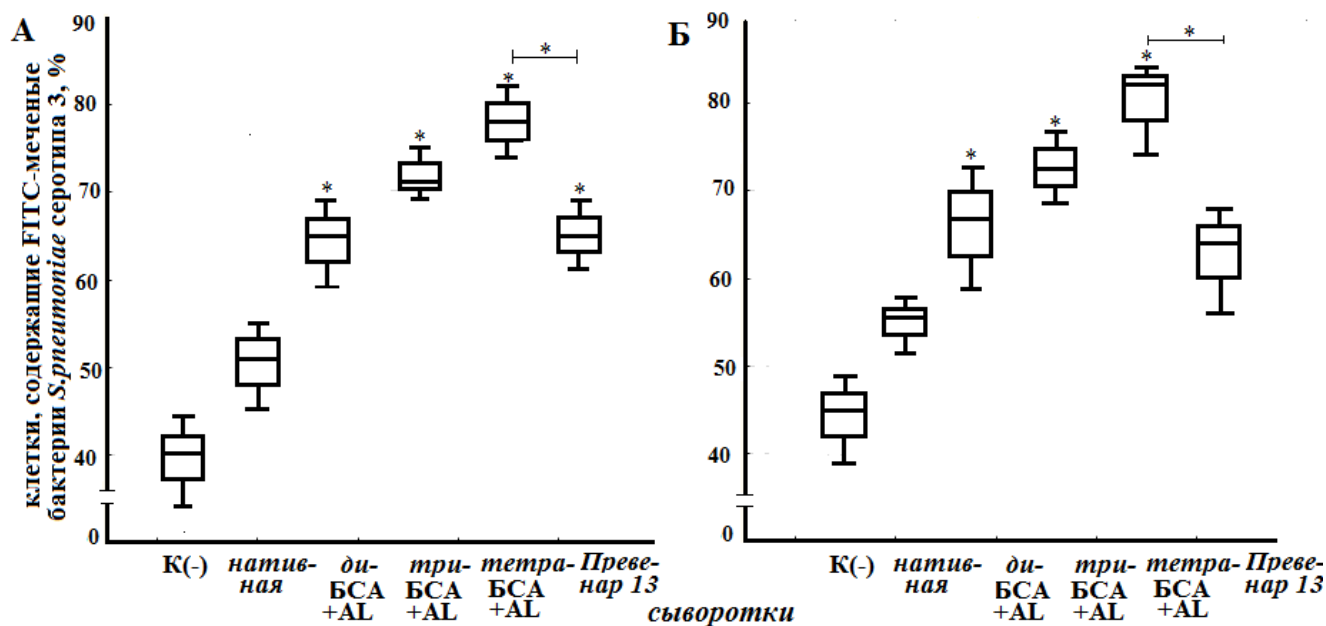


Рис.7. Антитело-зависимый фагоцитоз инактивированных клеток *S.pneumoniae* серотипа 3 нейтрофилами (А) и моноцитами (Б) периферической крови мышей. **Примечание.** Проточная цитофлуориметрия. Каждый образец исследовали в 4-х гейтах. К(-) – без обработки сывороткой. Ме(Q1-Q3). Ме – медиана. Q – квартиль. Тест Манна-Уитни, * $P < 0,05$ по сравнению с нативной сывороткой.

Протективную активность гликоконъюгатов (*табл.1*) оценивали при

Таблица 1. Протективная активность гликоконъюгатов при заражении мышей *S. pneumoniae* серотипа 3

Иммуноген	Разовая доза по углеводу, мкг	Титр IgG1-АТ, \log_{10}	Выжило мышей	
			день 0	день 16
<i>Ди</i> -БСА+AL	2,5	2,5±0,5	8	7*
	5,0	2,8±0,5	8	7*
	10	2,7±0,3	8	8**
	20	2,7±0,3	8	7*
<i>Три</i> -БСА+AL	2,5	3,1±0,2	8	8**
	5,0	3,0±0,3	8	8**
	10	3,2±0,4	8	8**
	20	3,2±0,3	8	8**
<i>Тетра</i> -БСА+AL	2,5	3,3±0,3	8	8**
	5,0	3,2±0,2	8	8**
	10	3,2±0,4	8	8**
	20	3,5±0,1*	8	8**
CRM ₁₉₇ -КП	1,1	2,9±0,3	6	6**
<i>S. pneumoniae</i> серотипа 3	2,2	2,9±0,2	Н.о.	Н.о.
Контроль	09 % NaCl	0±0	8	1

Примечание. AL – алюминия гидроксид. Н.о. – не определяли. Заражающая доза 5,6 LD₅₀. М±SD. Точный критерий Фишера, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

внутрибрюшинном заражении мышей *S. pneumoniae* серотипа 3 через 2 недели после 2-ой иммунизации. Самой высокой протективной активностью обладали конъюгаты три- и тетрасахарида с БСА, а также конъюгат CRM₁₉₇-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13). Единичная гибель мышей отмечена в группе животных, иммунизированных конъюгатом дисахарид-БСА.

Конъюгаты без адьюванта не стимулировали формирование антител и не обладали протективной активностью (данные не представлены).

3. Молекулярно-клеточные исследования

Продукцию цитокинов, индуцированную биотинилированными ди-, три- и тетрасахаридами, исследовали *in vitro* в монокультуре лейкоцитов селезенки интактных мышей. Все биотинилированные олигосахариды, иммобилизованные на твердой фазе, стимулировали продукцию IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, IFN γ , TNF α , кроме IL-6 и GM-CSF (Рис.8).

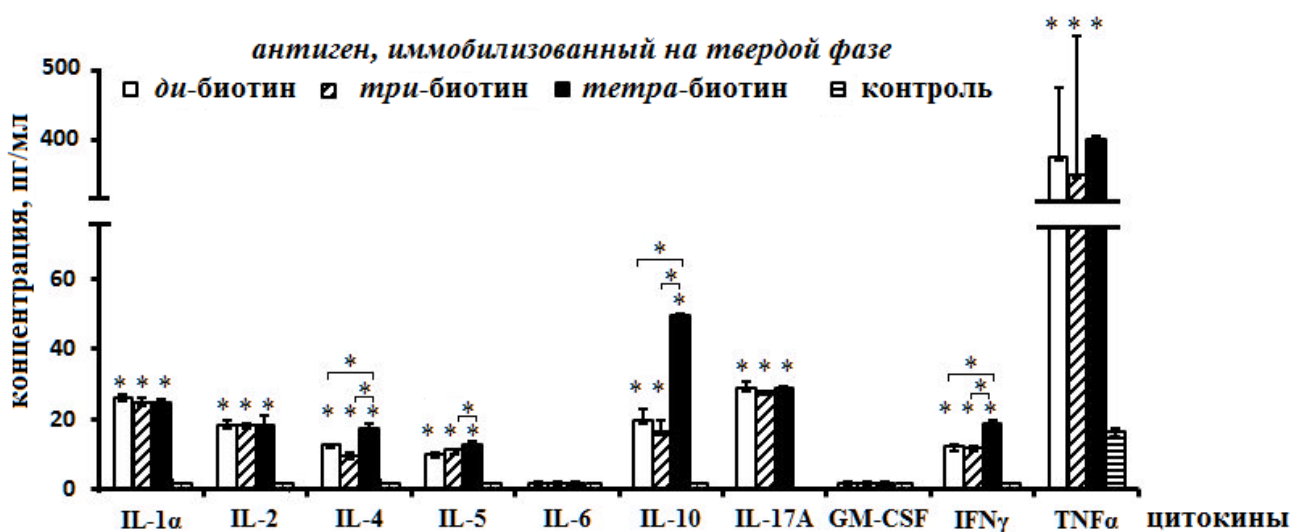


Рис.8. Продукция цитокинов *in vitro*.

Примечание. Проточная цитофлуориметрия. Исследовали пуловую монокультуру спленоцитов мышей (n=6) в 4 гейтах. $M \pm SD$. * $P < 0,05$ по сравнению с контролем (без биотинилированного олигосахарида).

Биотинилированный тетрасахарид стимулировал более высокую продукцию IL-4, IL-10, IFN γ в среду культивирования по сравнению с конъюгатами биотина с ди- и трисахаридом; различий в продукции IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, IFN γ и TNF α между конъюгатами не выявлено.

Олигосахариды не являются лигандами Толл-подобных рецепторов и в составе иммобилизованных конъюгатов с биотином не могут быть захвачены антигенпрезентирующими клетками. Вероятно, активация иммунного ответа происходила через углеводсвязывающий домен лектина С-типа SIGN-R1, экспрессируемый на макрофагах [Paterson GK. et al., 2006].

На примере конъюгата дисахарида, соответствующего минимальному структурному фрагменту КП *S. pneumoniae* серотипа 3, и обладающего в присутствии адьюванта иммуногенной активностью, исследовали концентрацию цитокинов в сыворотке крови иммунизированных мышей (Рис.9).

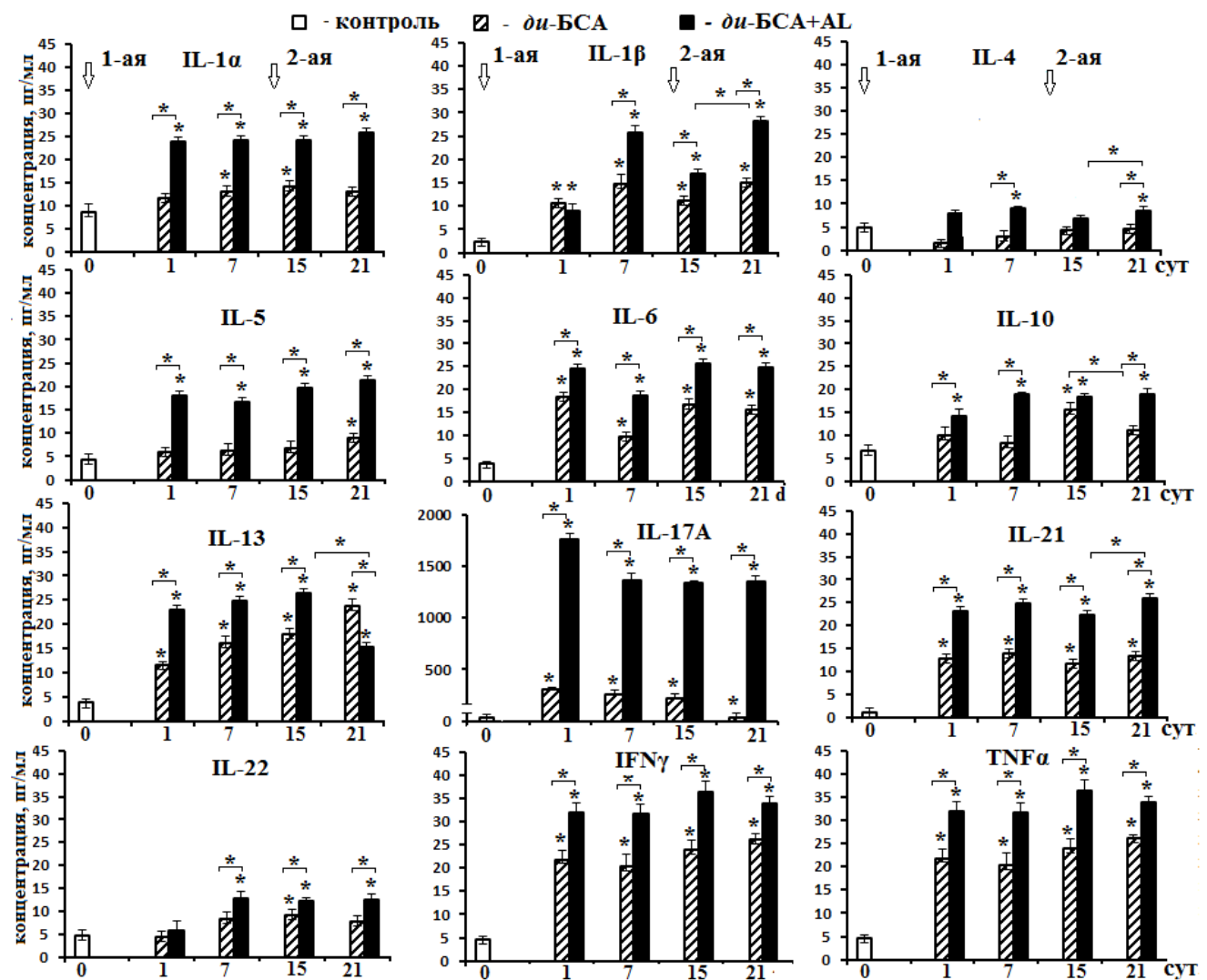


Рис.9. Концентрация цитокинов в сыворотке крови мышей, иммунизированных конъюгатом дисахарид-БСА с адьювантом и без адьюванта.

Примечание. Проточная цитофлуориметрия. На каждый срок исследовали пуловую сыворотку мышей (n=3) в 4-х гейтах. Контроль - до иммунизации. М±SD. Тест Манна-Уитни, * P < 0,05 по сравнению с контролем.

Продукцию цитокинов определяли до иммунизации (контроль) и на 1 и 7 сутки после 1-ой и 2-ой иммунизации (15 и 21 сутки от начала иммунизации)

мышей разовой дозой 20 мкг по углеводу. Конъюгат дисахарид-БСА без адьюванта индуцировал продукцию IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IFN γ и TNF α . Адсорбция конъюгата на геле алюминия гидроксида приводила к более высокой и стойкой продукции ряда цитокинов: IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21, IFN γ и TNF α во все сроки наблюдения. В самой высокой концентрации выявляли IL-17A (1767, 1356, 1336, 1347 пг/мл, соответственно срокам, при 19,3 пг/мл в контроле), тогда как без адьюванта - его концентрация снижалась (308, 257, 222, 28 пг/мл, соответственно срокам). Уровень IL-2 и IL-12p70 не изменялся.

Экспрессию поверхностных молекул в культуре спленоцитов мышей определяли в те же сроки у тех же мышей (*Рис.10*).

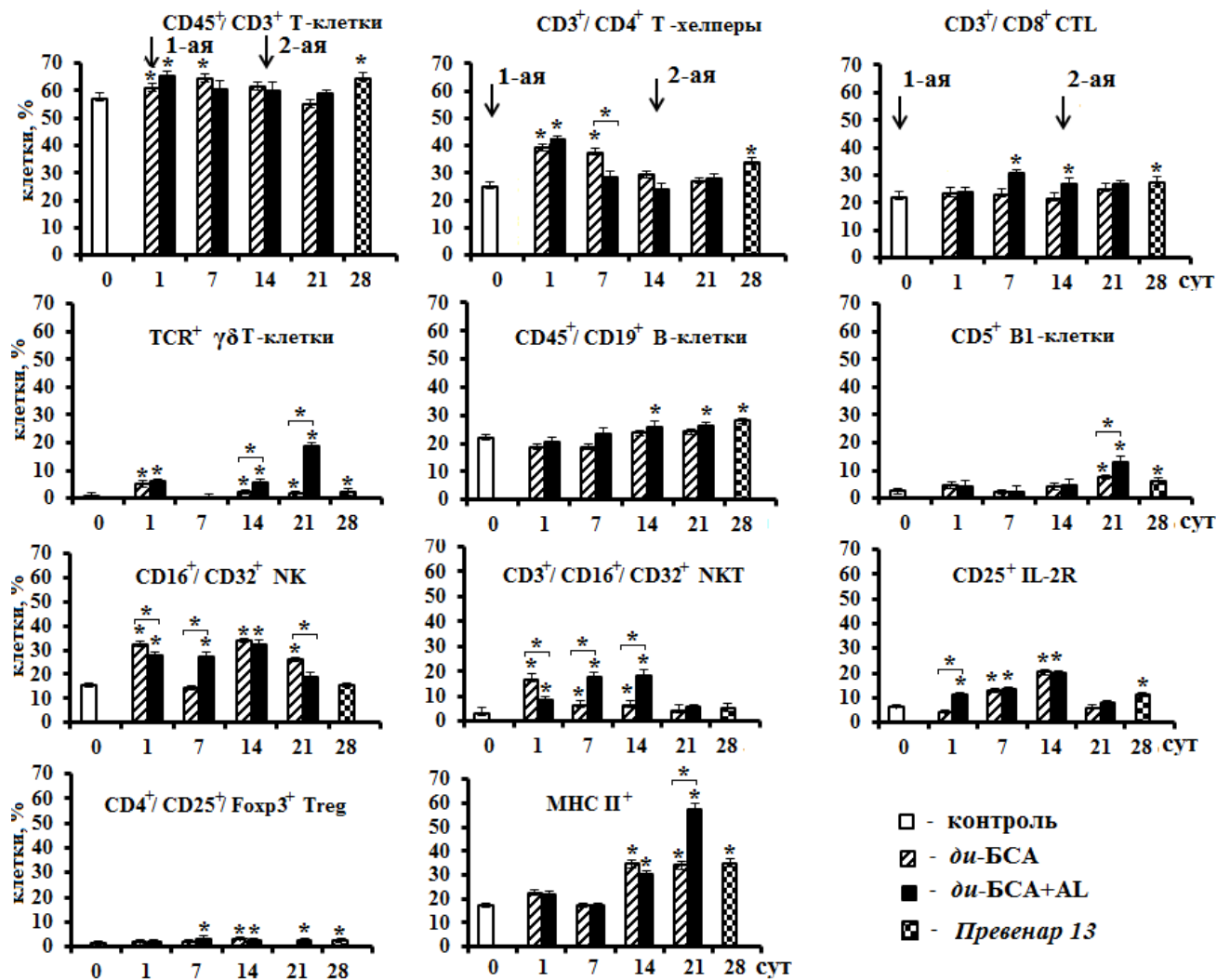


Рис.10. Экспрессия поверхностных маркеров на мембране спленоцитов мышей, иммунизированных конъюгатом дисахарид-БСА с адьювантом и без адьюванта.

Примечание. Проточная цитофлуориметрия. На каждый срок исследовали пуловую монокультуру спленоцитов мышей (n=3) в 4 гейтах. M \pm SD. Тест Манна-Уитни, * P < 0,05 по сравнению с контролем.

Конъюгат дисахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, вызывал более выраженные изменения уровня исследованных поверхностных молекул по сравнению с конъюгатом без адъюванта. Установлено, что на 1 и 7 сутки после 2-ой иммунизации мышей конъюгатом дисахарида, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, повышалось содержание спленоцитов, экспрессирующих молекулы (TCR⁺) $\gamma\delta$ Т-клеток (с 5,8 % до 19 % при 0,6 % в контроле); CD5⁺ В1-клеток (с 4,5 % до 13 % при 2,6 % в контроле), а также продуктов генов главного комплекса гистосовместимости класса II на антигенпрезентирующих клетках (с 30,2 % до 57,2 % при 17,4 % в контроле). Вакцина Превенар 13 индуцировала экспрессию всех исследованных молекул, кроме CD16⁺/CD32⁺ NK и CD3⁺/CD16⁺/CD32⁺ NKT через 14 дней после 2-ого введения (28 суток от начала иммунизации).

IL-17, $\gamma\delta$ Т-клетки и CD5⁺ В1-клетки имеют значение не только в защите от инфекции, но могут участвовать в развитии аутоиммунных реакций [Su D. et al., 2013; Popi A.F. et al., 2016]. В связи с этим, проведено определение уровня антител к двуспиральной ДНК в сыворотке крови иммунизированных мышей (Рис.11).

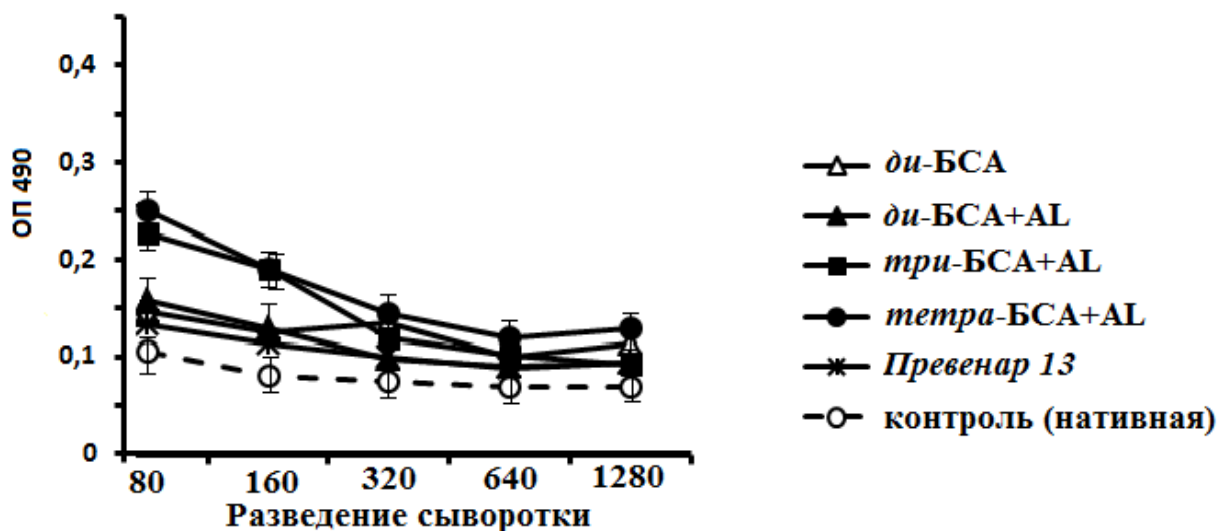


Рис. 11. Уровень IgG-АТ к двуспиральной ДНК у иммунизированных мышей в ИФА.

Примечание. Каждый образец пуловой иммунной сыворотки мышей (n=6) исследовали в 4-х повторях. M±SD.

В сыворотках мышей, иммунизированных конъюгатами олигосахаридов с БСА или конъюгатом CRM₁₉₇ с КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13), не выявлено повышения уровня антител в разведении $\geq 1:160$ (точка отсечения отрицательных результатов ОП₄₉₀ $\leq 0,2$) к двуспиральной ДНК, действие которых направлено на разрушение ядер клеток иммунизированных мышей.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что антитела к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3 распознавали тетрасахарид, а антитела к тетрасахариду характеризовались специфичностью к капсульному полисахариду, что свидетельствует о наличии общих антигенных структур у тетрасахарида и капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3.
2. Установлено, что конъюгаты ди-, три- и тетрасахарида с БСА, адсорбированные на геле алюминия гидроксида, при двукратной иммунизации мышей, вызывали образование олигосахаридспецифических IgM- и IgG-антител при наибольшем разнообразии изотипов антител (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b), индуцированных к конъюгату тетрасахарид-БСА, и не стимулировали повышение уровня IgG-антител к двуспиральной ДНК.
3. Отмечено, что антитела к тетрасахариду стимулировали фагоцитоз инактивированных бактерий *S. pneumoniae* серотипа 3 нейтрофилами и моноцитами периферической крови интактных мышей в большей степени, чем антитела к капсульному полисахариду серотипа 3, индуцированные введением конъюгированной 13-валентной пневмококковой вакцины.
4. Выявлено, что протективная активность конъюгатов три- и тетрасахарида, адсорбированных на геле алюминия гидроксида, при заражении иммунизированных мышей *S. pneumoniae* серотипа 3, была выше, чем адсорбированного конъюгата дисахарида (100, 100 и 87,5 % выживших мышей соответственно).
5. Показано, что *in vitro* биотинилированный тетрасахарид, иммобилизованный на твердой фазе, индуцировал более высокую продукцию IL-4, IL-10, IFN γ

спленоцитами интактных мышей по сравнению с конъюгатами биотина с ди- и трисахаридом; различий в стимуляции продукции IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, IFN γ , TNF α между конъюгатами не выявлено.

6. На примере конъюгата дисахарид-БСА, адсорбированного на геле алюминия гидроксида, показана стимуляция у мышей продукции цитокинов: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IFN γ и TNF α ; IL-17A в сыворотке крови выявляли в стабильно высокой концентрации, тогда как при введении конъюгата без адьюванта его уровень снижался.
7. Установлено, что после второй иммунизации мышей конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, повышалось содержание спленоцитов, экспрессирующих молекулы (TCR⁺) $\gamma\delta$ Т-клеток, CD5⁺ В1-клеток, а также активированных клеток МНС II⁺.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Иммунологические и эпидемиологические аспекты иммуногенности капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 в составе пневмококковых вакцин / Зайцев А.Е., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б., Сухова Е.В., Нифантьев Н.Э. // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2020. - № 1. – С. 72-82. doi:10.36233/0372-9311-2020-1-72-82
2. Higher cytokine and opsonizing antibody production induced by bovine serum albumin (BSA)-conjugated tetrasaccharide related to *Streptococcus pneumoniae* type 3 capsular polysaccharide / Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Zaytsev A.E., Akhmatova E.A., Egorova N.B., Yastrebova N.E., Sukhova E.V., Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., and Nifantiev N.E. // **Frontiers in Immunology.** – 2020. - № 11:578019. doi: 10.3389/fimmu.2020.578019

Материалы конференций

1. Зайцев, А.Е. Биотинилированные олигосахариды в детекции антител, индуцированных к капсульному полисахариду *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 / Зайцев А.Е., Сухова Е.В., Ахматова Э.А. // В книге: Сборник тезисов молодых ученых в рамках научной конференции с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам». Под ред. акад. В.В. Зверева. - Москва, 18-20 апреля 2019 г. - С. 45.
2. Протективная активность конъюгатов белка-носителя и олигосахаридов – синтетических аналогов фрагментов капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 / Зайцев А.Е., Ахматова Э.А., Курбатова Е.А., Сухова Е.В., Цветков Ю.Е., Яшунский Д.В., Нифантьев Н.Э. // В книге: Сборник тезисов XXII Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии. – Москва, 24-26 ноября 2019 г. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия (КМАХ). - 2020. - Приложение 1. - Том 22. - С.19.
3. Зайцев, А.Е. Использование конъюгатов биотина и олигосахаридов – синтетических фрагментов капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 для определения уровня антител и продукции цитокинов / Зайцев А.Е., Ахматова Э.А., Сухова Е.В. // В книге: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology». Под ред. акад. В.В. Зверева. – Москва, 11-12 марта 2020 г. - С.15.
4. Зайцев, А.Е. Молекулярно-клеточные маркеры иммуногенной активности конъюгированного дисахарида – синтетического аналога повторяющегося звена капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 / Зайцев А.Е., Ахматова Э.А., Сухова Е.В. // В книге: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology». Под ред. акад. В.В. Зверева. – Москва, 30-31 марта 2021 г. - С. 16.

СОКРАЩЕНИЯ

АТ- антитело

КП – капсульный полисахарид

CRM₁₉₇ - нетоксичная форма рекомбинантного дифтерийного анатоксина

CTL – цитотоксические лимфоциты

НК – натуральные киллеры

НКТ – натуральные киллерные Т-клетки

Treg – Т-регуляторные клетки