

На правах рукописи

Прокопенко Юрий Анатольевич

**«Рекомбинантные белки на основе структуры IgA1-протеазы
N. meningitidis с протективным антибактериальным действием»**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

1.5.6. – Биотехнология

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории химии протеолитических ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Смирнов Иван Витальевич, доктор химических наук, член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты:

Щекотихин Андрей Егорович, доктор химических наук, профессор РАН, директор института и заведующий лабораторией химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Кузнецов Никита Александрович, доктор химических наук, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией генетических технологий ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Защита состоится «25» ноября 2026 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии науки на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2026 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
Доктор физико-математических наук



Олейников В.А.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Бактериальный менингит – это тяжелое инфекционное поражение центральной нервной системы полиэтиологической природы. Неспецифичность ранней симптоматики осложняет своевременную диагностику и ухудшает прогноз, приводя к развитию серьезных осложнений и высокой смертности. В этой связи вакцинопрофилактика рассматривается как ключевой метод борьбы с данным заболеванием.

Бактериальный менингит обладает четко очерченной этиологической структурой, где доминирующая роль принадлежит *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus agalactiae* (группа В). Менингококк (*N. meningitidis*) подразделяется на 12, а в некоторых источниках на 13 серогрупп по признаку строения капсульных антигенов, причем эпидемическую опасность несут шесть из них (А, В, С, W-135, X, Y).

Несмотря на прогресс в разработке поливалентных препаратов, все существующие противоменингококковые вакцины обладают узкой специфичностью, будучи направлены либо против ограниченного набора серогрупп *N. meningitidis*, либо против иных отдельных патогенов. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), создание универсальной вакцины, обеспечивающей перекрестную защиту против широкого спектра этиологических агентов бактериального менингита, остается нерешенной научной проблемой.

Создание кандидатного антигена для потенциальной вакцины, способной обеспечить защиту от менингококка любого патогенного штамма вне зависимости от серогруппы, является перспективной задачей.

Степень разработанности темы исследования

На момент начала данной части исследований, было известно, что у людей, переболевших менингококковой инфекцией, а также гонореей, присутствуют специфические антитела к IgA1-протеазе. Было известно, что иммунизация модельных животных рядом вариантов IgA1-протеазы *N. meningitidis*, включая нативный фермент серогруппы А, рекомбинантную протеазу серогруппы В (как нативную, так и мутантную по остатку серина-267, Ser267Ala) индуцировала эффективную перекрестную защиту от заражения вирулентными штаммами менингококков серогрупп А, В и С. При этом сывороточные антитела, продуцируемые в ответ на рекомбинантную протеазу, демонстрировали способность связываться как с секретируемой, так и с мембраносвязанной формой фермента на поверхности бактериальных клеток. Кроме того, было показано, что IgG, выделенные из сыворотки пациентов с пневмококковой инфекцией, нейтрализуют активность металлосодержащей IgA1-протеазы на поверхности *S. pneumoniae*. Более того, иммунизация мышей рекомбинантной IgA1-протеазой *Streptococcus suis* серотипа 2 обеспечивала полную защиту животных от инфицирования летальной дозой патогена, что свидетельствует о высоком протективном потенциале данного антигена.

Целью данного исследования является изучение роли различных участков первичной структуры IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы В штамма H44/76 в индуцировании иммуногенности и протективного действия этого фермента, а также создание новых рекомбинантных белков – протективных антигенов для долгосрочной эффективной защиты организмов от инфекционных заболеваний, вызываемых патогенными штаммами *N. meningitidis* и других бактерий, продуцирующих близкие по первичной структуре IgA1-протеазы серинового типа.

Задачами данной работы стали:

1. Исследовать первичные структуры IgA1-протеаз из *Neisseria meningitidis* различных серогрупп (А, В, С и др.) и других микроорганизмов, продуцирующих этот фермент, для выявления участков высокой степени идентичности, перспективных в качестве основы для проектирования действующего вещества, обладающего протективным антибактериальным действием.
2. Предсказать локализацию эпитопов на участке зрелой IgA1-протеазы менингококка серогруппы В, для проектирования протективного противоменингококкового антигена на основе фрагментов ее первичной структуры.
3. С учетом результатов проведенных расчетов эпитопов, консервативности отдельных фрагментов первичной структуры IgA1-протеазы и физико-химических свойств потенциальных структур на ее основе сконструировать и получить рекомбинантные белки меньшей молекулярной массы.
4. Изучить иммуногенные и протективные свойства полученных рекомбинантных белков в экспериментах на мышиную модели заражения.
5. На примере одного из рекомбинантных белков изучить его противоменингококковые свойства в составе ряда протективных композиций.

Новизна и практическая значимость работы

1. Исследование первичных структур IgA1-протеаз из более чем 1000 известных штаммов *Neisseria meningitidis* различных серогрупп (А, В, С и др.) в интервале А²⁸-Р¹⁰⁰⁴ выявило, что для них характерна высокая степень идентичности, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве основы для проектирования действующего вещества, обладающего протективным антибактериальным действием против менингококков любой серогруппы.
2. Для проектирования протективного противоменингококкового антигена на основе фрагментов первичной структуры IgA1-протеазы А²⁸-Р¹⁰⁰⁴ менингококка серогруппы В, было рассчитано расположение В- и Т-клеточных эпитопов, на основании которых были выбраны фрагменты первичной структуры этого белка.
3. С учетом результатов проведенных расчетов, консервативности отдельных фрагментов первичной структуры IgA1-протеазы и физико-химических свойств потенциальных структур на ее основе были сконструированы и получены семь рекомбинантных белков меньшей молекулярной массы.
4. В экспериментах на мышах линии BALB/с были изучены иммуногенные и протективные противоменингококковые свойства полученных рекомбинантных белков. Наилучшие результаты продемонстрировали два рекомбинантных гибридных белка: М(W¹⁴⁰-Н³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ с молекулярной массой 59,4 кДа и М(W¹⁴⁰-Q²⁹⁹)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ с молекулярной массой 34,7 кДа.
5. Изучены динамика иммунного ответа и способность к формированию иммунологической памяти при иммунизации животных рекомбинантным белком формулы М(W¹⁴⁰-Н³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ в составе ряда протективных композиций. Показаны протективные свойства исследованных препаратов и получены данные о механизмах защиты животных, иммунизированных этими препаратами, от заражения менингококком серогруппы В. Было показано, что наилучшими показателями обладают две протективные композиции в составе липосом: непосредственно белок и белок с ДНК, кодирующей его в клетках эукариот.

В данной работе впервые проведен комплексный анализ зрелых высокоидентичных бактериальных IgA1-протеаз серинового типа, представленных в *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*

и *H. influenzae*. Предсказаны В- и Т-клеточные эпитопы в структуре зрелой IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы В штамма Н44/76. Учитывая результаты проведенных расчетов, на основе первичной структуры данного фермента был спроектирован и получен ряд укороченных белковых молекул, потенциально пригодных в качестве основы действующего вещества, обладающего протективным антибактериальным действием против менингококков любой серогруппы. В экспериментах на мышах линии BALB/с были исследованы иммуногенные и протективные свойства полученных белков.

Полученные данные позволили нам считать IgA1-протеазу и рекомбинантные белки, созданные на основе ее первичной структуры и обладающие иммуногенной и защитной активностью, перспективными кандидатными молекулами для создания протективного антигена широкого спектра действия. Предполагается, что вакцина, созданная на основе такого антигена, сможет обеспечить эффективную защиту от инфекционных заболеваний, вызываемых подавляющим большинством патогенных штаммов *N. meningitidis* различных серогрупп, а также некоторых других микроорганизмов, продуцирующих IgA1-протеазы серинового типа.

Положения, выносимые на защиту:

Менингококковые и гонококковые IgA1-протеазы, а также IgA-В-протеазы из *H. influenzae* обладают высоким сходством первичных структур в интервалах 28–84, 146–193, 253–539, 567–628, 639–795 и 811–1004 по нумерации IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы В, штамм Н44/76. Это позволяет рассматривать IgA1-протеазу как основу для создания протективного антигена для защиты от заболеваний, вызванных этими патогенами.

Среди 7 спроектированных и полученных белков на основе IgA1-протеазы *N. meningitidis* серогруппы В, штамм Н44/76, наилучшую защиту мышей BALB/с от менингококков серогрупп А, В, С, двух штаммов Нib 1095, Нib 45-2 гемофильной инфекции и трех серотипов стрептококка: 3, 14 и 19А обеспечивали гибридные белки M(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ и M(W¹⁴⁰-Q²⁹⁹)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆. Данные белки были сконструированы на основе предсказанного распределения В- и МНС-II Т-клеточных эпитопов, с учетом экспериментальных данных о протективных и иммуногенных свойствах укороченных белков на основе фрагментов зрелого фермента.

По результатам подбора адъювантов для белка M(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆, выступающего в качестве протективного антигена, наилучшую защиту мышей от менингококка серогруппы В показали две липосомные композиции на основе DPPC, содержащие либо только данный антиген, либо этот же антиген, содержащийся совместно с ДНК, кодирующей его в эукариотических системах.

Связь с государственными программами

Субсидия в рамках реализации крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития № 075-15-2024-536 от 23.04.2024 г.

Объем и структура работы

Текст диссертации изложен на 131 страницах, иллюстрирован 21 рисунком, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, сокращений, списка литературы, включающего 217 источников, и 2 приложений.

Апробация работы

Основные результаты работы опубликованы в патенте, в 7 статьях в рецензируемых журналах, а также представлены автором на 9 конференциях.

Основное содержание работы

Анализ первичных структур белков, гомологичных сериновым IgA1-протеазам

Подготовка к расчетам

При разработке потенциального протективного антигена на основе аминокислотной последовательности IgA1-протеазы из *Neisseria meningitidis* серогруппы В штамма H44/76 учитывалось, что данный фермент представлен множеством вариантов в различных серогруппах и штаммах данного микроорганизма, демонстрируя вариабельность первичной структуры. Поскольку геномы различных штаммов *N. meningitidis* секвенированы, есть возможность получить представление о гипотетической первичной структуре IgA1-протеазы каждого из них при наличии соответствующей нуклеотидной последовательности.

Информация о том, что патогенные штаммы *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae* также способны синтезировать сериновую IgA1-протеазу, позволила предположить, что протективные антигены на основе структуры данного фермента могут обеспечить защиту организма от заражения и этими патогенами.

Таким образом, в процессе выполнения работы потребовалось:

- 1) определить степень распространенности нуклеотидной последовательности, кодирующей IgA1-протеазу, в геномах различных штаммов *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*;
- 2) оценить степень идентичности первичной структуры IgA1-протеаз в различных штаммах *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*.

В качестве совокупности штаммов, подлежащих исследованию, использовались те, чьи протеомы не были исключены из базы данных UniprotKB для микроорганизмов *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae* (см. раздел Proteomes в Universal Protein Resource).

Отсутствие унифицированной номенклатуры белков (и соответствующих генов) между штаммами потребовало применения BLAST (BLASTP – для получения общих сведений по референтным белкам и TBLASTN – для поиска по конкретным штаммам соответственно) для получения данных о последовательностях из базы данных RefSeq.

Сходство последовательностей полноразмерной цепи IgA1-протеазы из *N. meningitidis* штамма H44/76 с белками из разных штаммов *N. meningitidis*

Проведенный BLASTP последовательности полноразмерной IgA1-протеазы из *N. meningitidis* штамма H44/76 (AE_full) по базе данных RefSeq Protein (с ограничением поиска организмом *N. meningitidis*) выявил три группы ферментов, содержащих домен peptidase_S6: собственно IgA1-протеазы (>75% идентичности аминокислотной последовательности к референтному белку), а также белки App и MspA. Для двух последних белков характерно 34–40% идентичности первичных структур и отсутствие протяженных гомологичных участков, из-за чего мы исключили их из дальнейшего рассмотрения в контексте разработки потенциального протективного антигена.

Анализ 1061 штамма *N. meningitidis* (список штаммов из базы UniProt, Proteomes) показал, что 1060 штаммов содержат гены, кодирующие IgA1-протеазы со степенью идентичности не менее 75,59% при полном покрытии последовательности (см. Табл. 1). Единственное исключение – штамм NM1359, где соответствующие последовательности не обнаружены. Однако, для корректной интерпретации данных следует указать некоторые ограничения: часть нуклеотидных последовательностей демонстрирует фрагментацию соответствующих им IgA1-протеаз. Это может быть связано как с артефактами секвенирования, так и с мутациями, приводящими к сдвигу рамки считывания.

Ключевой мишенью для проектирования потенциального протективного антигена

является зрелая форма IgA1-протеазы, включающая протеазный домен и гамма-пептид полноразмерного фермента. Из рассмотрения исключены отщепляемый сигнальный пептид, остающийся в мембране транспортный домен и альфа-пептид, обладающий низкой гомологией. Для зрелой IgA1-протеазы из *N. meningitidis* штамма H44/76 релевантная область – участок 28–1004 (AE_28–1004), соответствующий максимально возможной длине секретируемой части зрелого фермента.

Таблица 1. Результаты TBLASTN для не фрагментированных последовательностей полноразмерной (AE_full) и зрелой (AE_28–1004) IgA1-протеазы из *Neisseria meningitidis* серогруппы B штамма H44/76: AE_full у *N. meningitidis* и AE_28–1004 у *N. meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Haemophilus influenzae*.

AE_full в <i>N. meningitidis</i>		AE_28-1004 в <i>N. meningitidis</i>		AE_28-1004 в <i>N. gonorrhoeae</i>		AE_28-1004 в <i>H. influenzae</i>	
Количество штаммов (из 1061)	Степень идентичности	Количество штаммов (из 1061)	Степень идентичности	Количество штаммов (из 602)	Степень идентичности	Количество штаммов (из 521)	Степень идентичности
979	75,59%-100,00%	1013	87,20%-100,00%	590	87,10%-88,51%	124	85,21%-93,58%

Сходство последовательностей отдельных участков IgA1-протеазы из *N. meningitidis* штамма H44/76 с белками из различных штаммов *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*

Зрелый фермент

Зрелая IgA1-протеаза (AE_28–1004), первичная структура которой была использована нами в качестве входных данных для TBLASTN, стала основой для поиска подобных белков, кодируемых в геномах *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*. Кроме трех вышеназванных микроорганизмов данный фермент никакой другой организм не продуцирует. Был проведен подробный анализ белков, гомологичных зрелой AE_28–1004, закодированных в геномах каждого из трех вышеназванных микроорганизмов.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерную IgA1-протеазу и зрелый фермент AE_28–1004, встречаются в 1060 штаммах *N. meningitidis* из 1061 исследованных нами штаммов. Для не фрагментированных данных (в 1013 штаммах), были показаны значения степени идентичности первичной структуры от 87,20% до 100% с полным покрытием последовательности. В геномах всех 602 рассмотренных нами штаммов *N. gonorrhoeae* были обнаружены гены IgA1-протеазы AE_28–1004, причем последовательности из 590 штаммов демонстрируют не фрагментированные данные со степенью идентичности первичной структуры в интервале от 87,10% до 88,51% при полном покрытии последовательности (см. Табл. 1). В *H. influenzae* наблюдается более разнообразная картина. В дополнение к IgA1-протеазам, высоко идентичным рассматриваемой (IgA-B-протеазам), штаммы *H. influenzae* содержат IgA1-протеазы со степенью идентичности первичной структуры 51–59%

(IgA-A-протеазы). Поиск в базе *refseq_genomes* показал результаты для 521 из 536 рассмотренных штаммов. В 137 штаммах были найдены гены, соответствующие белкам с высокой степенью идентичности AE_28–1004, из них для 124 данные оказались не фрагментированными со значениями степени идентичности от 85,21% до 93,58% при полном покрытии последовательности (см. Табл. 1). Для фрагментированных данных наблюдалась схожая картина.

Таким образом, поскольку зрелая IgA1-протеаза из *N. meningitidis* является важным фактором вирулентности и обладает высокой степенью идентичности по первичной структуре (более 87% на участке A²⁸-P¹⁰⁰⁴) вне зависимости от серогруппы и штамма производящего ее

организма, она рассматривается нами в качестве основы для проектирования действующего вещества потенциальной противоменингококковой вакцины. *N. gonorrhoeae* и часть штаммов *H. influenzae* также продуцируют данный фермент со степенью идентичности по первичной структуре на участке A²⁸-P¹⁰⁰⁴ более 85%, что позволяет рассматривать возможность обеспечения защиты проектируемой вакциной и от этих патогенов. Основным препятствием при использовании этого белка в качестве антигенной детерминанты потенциальной вакцины является его ферментативная активность, но применение в качестве антигенной детерминанты в составе вакцины каталитически неактивной протеазы, мутантной по активному центру, в которой аминокислотный остаток серина 267 заменен на остаток валина, вполне возможно. Однако, данный белок обладает высокой молекулярной массой (109 кДа). Связанные с этим низкая растворимость в растворах для инъекций, а также большое количество потенциальных антигенных детерминант, вызывающих высокую антигенную нагрузку на организм, побудило нас спроектировать на основе зрелой IgA1-протеазы более короткие белки, обладающие лучшей растворимостью и вызывающие меньшую нагрузку, но при этом обладающие сравнимыми с исходным ферментом протективными свойствами.

Короткие фрагменты

Различия между представителями IgA1-протеаз не являются равномерно распределенными по всей белковой цепи. Напротив, в этих молекулах существуют ярко выраженные высоко консервативные участки. При проектировании кандидатов на роль потенциального протективного антигена для возможного действующего вещества универсальной противоменингококковой вакцины – укороченных белков на основе AE₂₈₋₁₀₀₄ – нас интересовала высокая консервативность используемых в ней участков цепи.

При рассмотрении выравнивания результатов проведенного во всех интересующих нас организмах одновременно (*N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*) TBLASTN белка AE_{full} на участке 1-1004, состоящем из зрелого фермента совместно с сигнальным пептидом, нам удалось выявить участки с высокой степенью идентичности среди белков данного типа из рассматриваемых организмов и, в частности, их штаммов. Это участки 28-84, 146-193, 253-539 и 567-1004 (нумерация по AE_{full}). Также удалось выявить участки низкой сложности (low complexity regions, LCRs) это неструктурированные и гибкие пептиды, которые приходится на интервалы 552-562, 629-638 и 796-810, согласно той же нумерации аминокислотных остатков. Данные участки считаются нежелательными в составе протективного антигена, так как они не являются иммуногенными полипептидами. Дополнительный поиск с помощью BLASTP по базе данных референс белков не обнаружил LCRs за пределами вышеуказанных интервалов.

Таким образом наиболее интересными фрагментами с точки зрения высокой степени идентичности первичных структур исследуемых IgA1-протеаз, с исключенными LCRs, являются участки: 28-84, 146-193, 253-539, 567-628, 639-795 и 811-1004, согласно нумерации по AE_{full}.

Проведенный по отдельности в *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae* TBLASTN для указанных участков высокой степени идентичности (в том числе с учетом разделения LCRs), а также для оставшихся участков низкой степени идентичности показал численные значения степени идентичности первичной структуры для соответствующих степеней покрытия последовательностей. Минимальные (MIN), средние (AVG) и максимальные (MAX) значения степеней идентичности и покрытия, полученных в результате данного BLAST, представлены в Табл. 2.

Участки 85-145 и 194-252 в рассмотренных белках существуют в двух вариантах, где каждый из вариантов представляет собой кластер последовательностей, идентичных по первичной структуре более чем на 94%.

Участок 28-311 («Peptidase family S6 domain», IPR030396) демонстрирует два варианта

кластеризованных последовательностей, что хорошо согласуется с литературными данными о двух

сайт-специфических типах IgA1-протеаз из *N. meningitidis* (тип 1 и тип 2). Исключением является единственный гипотетический референс-белок WP_219200234.1, содержащий участок 85-145 от типа 1 и 194-252 от типа 2. Этот белок вносит третий кластер при рассмотрении участка 28-1004.

Для потенциальной однокомпонентной вакцины, выбор фермента типа 1, к которому относится белок AE_full, является более перспективным, поскольку он способен к расщеплению IgG3 и характерен для более эпидемически опасных штаммов. Таким образом, в дополнение к участкам, высоко консервативным во всех штаммах *N. meningitidis*, при проектировании протективного антигена мы не отвергаем и участки 85-145 и 194-252. Участок 540-566 показал себя в большем количестве вариантов, что является дополнительным критерием против использования данного участка.

Таблица 2. Результаты TBLASTN для фрагментов AE_28–1004.

Зеленым цветом обозначены области, которые для всех штаммов, рассматриваемых в этом параграфе, имеют степень идентичности не менее 85% с полным покрытием последовательностей и не содержат LCRs.

А. Степень идентичности и соответствующее покрытие последовательностей из *N. meningitidis*.

Участок цепи		28-84	85-145	146-193	194-252	253-539	540-566	567-1004	567-628	639-795	811-1004
Количество штаммов (из 1887)		1887	1887	1887	1887	1887	893	1887	1887	1887	1887
Степень идентичности соответствующих участков, %	MIN	98,25	57,38	87,50	56,86	88,85	96,30	92,76	88,71	95,54	88,89
	AVG	99,99	87,14	96,76	86,60	96,01	99,90	97,52	95,63	98,64	97,23
	MAX	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Степень покрытия соответствующих участков, %	MIN	100	98	100	86	100	100	100	100	100	100
	AVG	100	99	100	96	100	100	100	100	100	100
	MAX	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

В. Степень идентичности и соответствующее покрытие последовательностей из *N. gonorrhoeae*.

Участок цепи		28-84	85-145	146-193	194-252	253-539	540-566	567-1004	567-628	639-795	811-1004
Количество штаммов (из 683)		683	683	683	683	683	683	683	683	683	683
Степень идентичности соответствующих участков, %	MIN	96,49	59,02	85,42	54,90	90,24	92,59	92,99	93,55	94,90	89,39
	AVG	98,93	59,08	87,53	56,92	92,43	99,39	94,07	96,81	97,11	90,20
	MAX	100,00	100,00	100,00	100,00	96,86	100,00	94,57	98,39	97,45	91,41
Степень покрытия соответствующих участков, %	MIN	100	98	100	86	100	100	100	100	100	100
	AVG	100	98	100	86	100	100	100	100	100	100
	MAX	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

С. Степень идентичности и соответствующее покрытие последовательностей из *H. influenzae*.

Участок цепи		28-84	85-145	146-193	194-252	253-539	540-566	567-1004	567-628	639-795	811-1004
Количество штаммов (из 154)		154	154	154	154	154	0	154	154	154	154
Степень идентичности	MIN	100,00	59,02	89,58	56,86	88,50	-	92,31	88,71	95,54	90,91
	AVG	100,00	71,28	92,83	67,67	91,20	-	93,68	90,91	96,00	92,53

соответствующих участков, %	MAX	100,00	98,36	100,00	91,53	94,43	-	95,48	100,00	96,82	93,43
Степень покрытия соответствующих участков, %	MIN	100	98	100	86	100	-	100	100	100	100
	AVG	100	99	100	90	100	-	100	100	100	100
	MAX	100	100	100	100	100	-	100	100	100	100

Предсказание эпитопов

Выбор потенциальных фрагментов производили на основе полученных нами результатов расчетов распределения В- и Т-клеточных эпитопов в структуре фермента, рассчитанных значений изоэлектрической точки проектируемых коротких белков и полученной нами информации о распределении консервативных участков в первичной структуре IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴.

Для дальнейших расчетов по предсказанию расположения эпитопов, мы используем в качестве шаблона для входных данных IgA1-протеазу из *N. meningitidis* серогруппы В штамма Н44/76. Она относится к типу 1 по расщеплению IgA1. Вследствие высокой степени идентичности вышеописанных IgA1-протеаз, для нас был оптимален выбор представителя первого типа, поскольку данный тип протеаз обладает более широкой субстратной специфичностью. При этом нас интересуют не столько отдельно взятые конкретные эпитопы, сколько общее множество эпитопов, порождаемых некими протяженными участками белка. Данное множество будет иметь тем более широкое пересечение с эпитопами из прочих вариантов фермента, чем более консервативные участки послужат прототипом протективного антигена.

Для предсказания расположения МНС-II Т- и конформационных В-клеточных эпитопов в составе исследуемых белковых молекул применяли современные инструменты, предоставленные на сервере IEDB, кроме того для предсказания расположения конформационных В-клеточных эпитопов был использован сервер CaoZhiwei Lab, содержащий программный пакет SEPPA 2.0.

В результате расчетов в программе «Т Cell Epitopes – МНС Binding Prediction/Peptide binding to МНС class II molecules» методом «IEDB recommended 2.22» для первичной структуры IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴ из *N. meningitidis* серогруппы В штамма Н44/76 в организмах мыши линии BALB/c и человека, рассматривая эпитопы длиной 15 а.о., был получен перечень комбинаций «эпитоп-аллель», каждой из которых соответствовал параметр percentile_rank (далее «ранг»), характеризующий качество связывания эпитопа с МНС. Ранжирование полученных данных показало, что 10% наилучших комбинаций имеют ранг $\leq 20 \pm 1$.

Для мышей линии BALB/c соответствующие результаты для наилучших комбинаций рассчитанных пар «эпитоп-аллель» приведены на Рис. 1. Эти данные демонстрируют существенные различия вдоль цепи исследуемого белка. Для мышинной модели заражения живой вирулентной культурой *N. meningitidis* серогруппы В наилучшие результаты предполагаются для участков 75–109, 155–352, 552–595, 686–735 и 923–983.

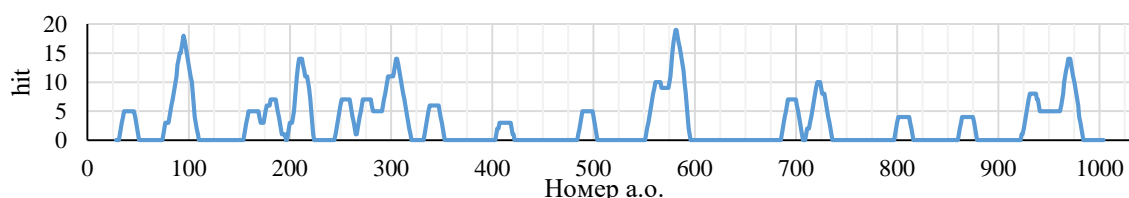


Рисунок 1. Количество (hit) предсказанных комбинаций “эпитоп-аллель” на цепи A²⁸-P¹⁰⁰⁴, в которых участвует данный аминокислотный остаток (для комбинации МНС-II Т-клеточных эпитопов с аллелями мыши BALB/c; ранг ≤ 20).

В случае людей данный подход не вполне применим ввиду наличия большого

разнообразия аллелей в человеческих популяциях и требует дополнительного их учета, для чего мы воспользовались инструментом «Population Coverage». В качестве параметра оценки эффективности участка цепи IgA1-протеазы мы выбрали average_hit (среднее количество комбинаций «эпитоп/HLA», распознаваемых населением). Каждый аминокислотный остаток вдоль цепи IgA1-протеазы получил рассчитанное значение суммы average_hit для всех эпитопов, в составе которых он может участвовать, как для комбинаций с рангом ≤ 10 , так и с рангом ≤ 20 . Эти результаты были получены для различных популяций в зависимости от географического региона. Данные для ранга ≤ 20 для всего мира и для Российской Федерации приведены на Рис. 2.

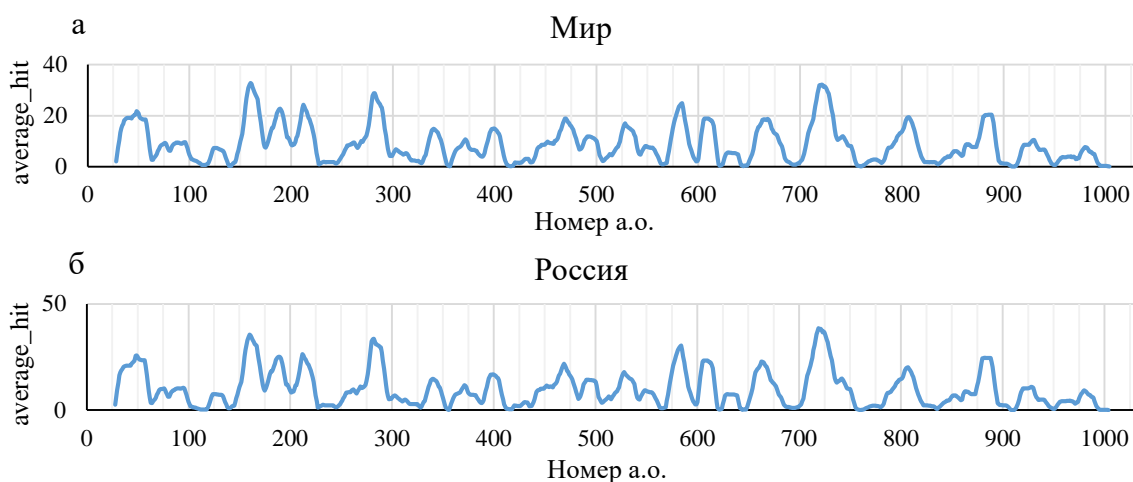


Рисунок 2. Суммарное значение среднего количества (average_hit) предсказанных комбинаций “эпитоп-аллель” на цепи $A^{28}-P^{1004}$, в которых участвует данный аминокислотный остаток (для комбинации МНС-II Т-клеточных эпитопов с аллелями человека; ранг ≤ 20) для всего мира (а) и для России (б).

Результаты предсказания МНС-II Т-клеточных эпитопов для мышей хорошо согласуются с протективными свойствами рекомбинантных белков $ME^{135}-H^{328}-LEN_6$ и $MH^{835}-P^{1004}-LEN_6$, но не объясняют отсутствие иммуногенных и протективных свойств белка $MW^{329}-H^{622}-LEN_6$. Прогнозируемое распределение МНС-II Т-клеточных эпитопов для людей гораздо более однородно, чем для мышей (см. Рис. 1 и 2), что затрудняет использование этих данных для выбора крупных фрагментов (более 100 а.о.) протеазы, однако позволяет локально оптимизировать границы фрагментов, выбранных иным методом.

В качестве входных данных для расчета потенциального расположения пространственных В-клеточных эпитопов на поверхности IgA1-протеазы $A^{28}-P^{1004}$, применялась трехмерная модель этого фермента. Участок $A^{28}-P^{1004}$ модели IgA1-протеазы был выбран из трех моделей (зрелого фермента, либо участков $A^{28}-P^{1004}$ его рекомбинантной формы и полноразмерной формы), построенных с помощью AlphaFold2, поскольку он имеет более удобное для данных расчетов расположение гибкой цепи на участке 967-1004. Сопоставление этих моделей по RMSD ($C\alpha$) показало эквивалентность всех трех моделей, что позволяет в дальнейших расчетах конформационных эпитопов обходиться только одной из них.

Результаты расчетов в программах ElliPro и DiscoTope 2.0 продемонстрировали высокое сходство (см Рис. 3). Для программы SEPPA 2.0, учитывающей вид организма-хозяина, картины распределения эпитопов для человека и мыши различались; трехмерная картина распределения данных эпитопов приведена на Рис. 4.

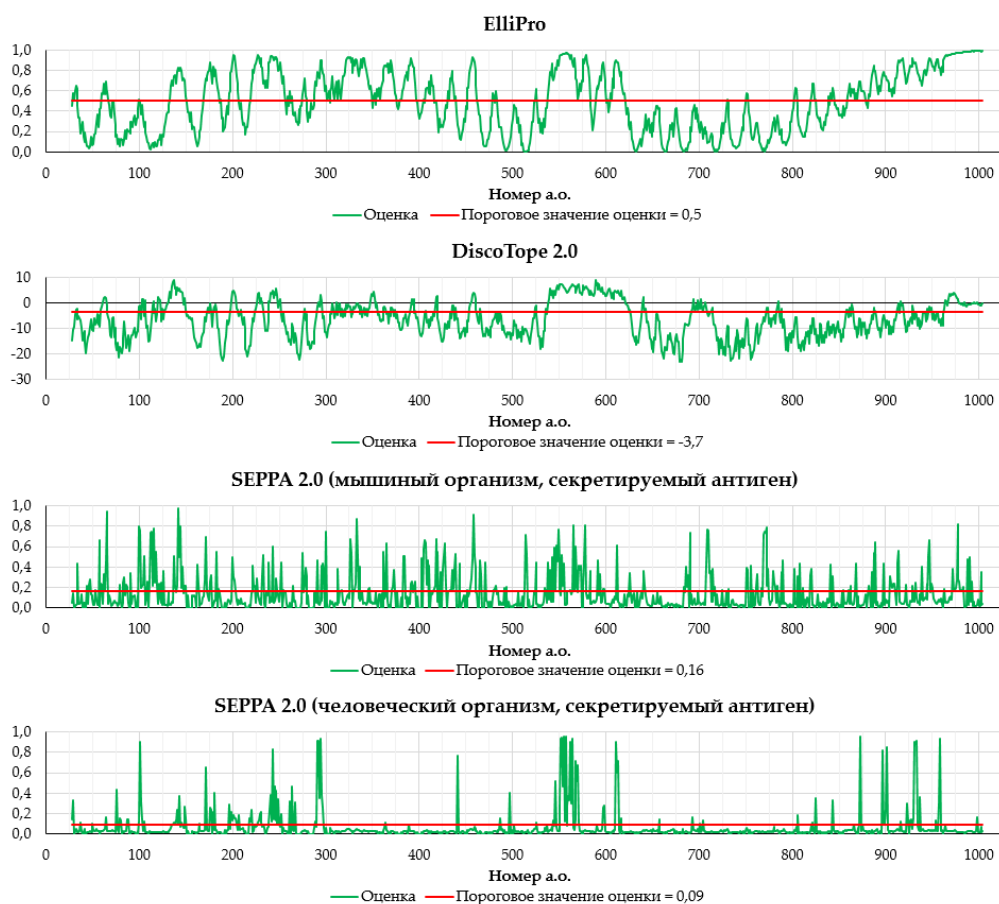


Рисунок 3. Двумерные диаграммы распределения аминокислотных остатков, включенных в предсказанные конформационные В-клеточные эпитопы на поверхности участка A²⁸-P¹⁰⁰⁴ IgA1-протеазы, с пороговыми значениями (thresholds) по умолчанию.

В первом приближении, мы можем рассматривать в качестве перспективных участки в N-концевой, C-концевой и центральной части молекулы. Тот факт, что на этих участках присутствуют предсказанные эпитопы и для человека, и для мыши, позволяет предполагать высокую эффективность мышинной модели при проектировании препарата, предназначенного для человека. В свою очередь, менее перспективным выглядит участок в интервале 620-820 по нумерации зрелого фермента. В целом, данные по распределению расчетных конформационных В-клеточных эпитопов, приведенные в виде 2D-диаграмм, подходят для стратегического выбора фрагментов A²⁸-P¹⁰⁰⁴, поскольку они указывают на области высокой плотности аминокислотных остатков, которые с большой вероятностью могут быть частью эпитопов. Они локализуются преимущественно в области интересующих нас фрагментов IgA1-протеазы E¹³⁵-H³²⁸, W³²⁹-H⁶²² и H⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴, и практически отсутствуют в интервале K⁶²³-W⁸³⁴. Последний интервал с этой точки зрения не выглядит многообещающим.

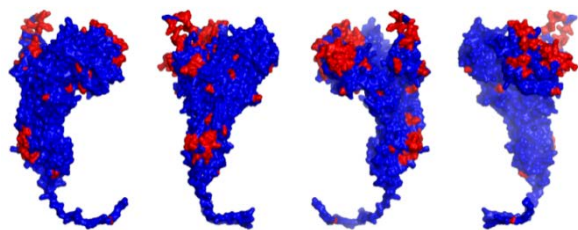


Рисунок 4. Распределение аминокислотных остатков, включенных в конформационные В-клеточные эпитопы, предсказанные в SEPPA 2.0 (для секретрируемого антигена, с порогами по умолчанию) для поверхности области A²⁸-P¹⁰⁰⁴ IgA1-протеазы ADC80147.1, в организме человека. Аминокислотные остатки, принадлежащие эпитопам, обозначены на модели 3D структуры красным цветом.

Сравнительный анализ третичных структур предложенных рекомбинантных белков

Полученные данные о распределении теоретических конформационных В- и линейных Т-эпитопов в структуре IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴ позволили сосредоточить внимание на трех наиболее перспективных участках, расположенных приблизительно в первой, второй и четвертой четвертях молекулы зрелого фермента. Для нарушения структуры активного центра фермента, нежелательного в структуре антигена, мы отказались от использования в составе перспективной молекулы участка A²⁸-Y¹³⁴, при этом потери эпитопов предполагались малозначимыми. Более детальное проектирование укороченных белков проводилось с учетом величины их изоэлектрической точки, которая должна была заметно отличаться от физиологического значения pH. Точные формулы созданных на основе фрагментов IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴ коротких рекомбинантных белков, кандидатов на роль протективного антигена, приведены в Табл. 3.

Таблица 3. Свойства IgA1-протеазы MA²⁸-P¹⁰⁰⁴-LEH₆ и рекомбинантных белков, созданных на основе ее фрагментов.

Белок	Длина, а.о.	Молекулярная масса, Да	pI
M(A ²⁸ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆ (AE)	986	109 020,08	7,56
M(W ¹⁴⁰ -K ⁸³³)-LEH ₆ (белок 8)	703	77 609,56	8,79
M(W ³²⁹ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆ (белок 3)	685	74 819,44	8,65
M(W ¹⁴⁰ -H ³²⁸)-(W ⁴¹² -D ⁶⁰⁴)-(Y ⁸⁶⁶ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆ (белок 11)	521	59 407,63	8,32
M(W ¹⁴⁰ -Q ²⁹⁹)-(Y ⁸⁶⁶ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆ (белок 13)	308	34 690,13	8,05
M(E ¹³⁵ -H ³²⁸)-LEH ₆ (белок 9)	203	23 366,74	7,37
M(W ³²⁹ -H ⁶²²)-LEH ₆ (белок 10)	303	33 459,92	6,43
M(H ⁸³⁵ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆ (белок 4)	179	19 807,80	6,84

Белки 3 и 8 были спроектированы для исследования возможной роли участка K⁶²³-W⁸³⁴, не обладающего значимым количеством расчетных эпитопов.

Для того, чтобы рекомбинантные белки, созданные на основе выбранных фрагментов IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴, имели иммуногенную и протективную активность, сравнимую с исходным ферментом, они должны были сохранять как можно больше детерминантных конформационных В-клеточных эпитопов, расположенных в соответствующих участках исходного фермента.

Сохранение возможно большего числа конформационных эпитопов в укороченном белке требует сохранения трехмерной структуры зрелого фермента на соответствующем ему участке. Чтобы определить, насколько пространственные структуры созданных соединений отличаются от соответствующих 3D-структур в IgA1-протеазе, мы провели сравнительный анализ моделей третичных структур рекомбинантных белков с моделью третичной структуры нативной IgA1-протеазы. Для этого с помощью программы Swiss PDB Viewer мы проводили наложение (по атомам Ca) отдельных участков моделей белка, построенных в AlphaFold2, а результаты представляли в виде RMSD. Области для наложения были выбраны на основе pLDDT (Рис. 5). Модель N-концевой части белка 13 (RMSD = 2,71 Å), согласно pLDDT, не является достаточно надежной, и к полученным с ее помощью результатам следует относиться с осторожностью. Для всех рассматриваемых участков, имеющих достоверные модели третичной структуры, значения RMSD не превышают 1,37 Å (Рис. 5). Таким образом, все достоверные участки построенных нами моделей укороченных белков сохраняют третичную структуру, характерную для соответствующих участков зрелой IgA1-протеазы.

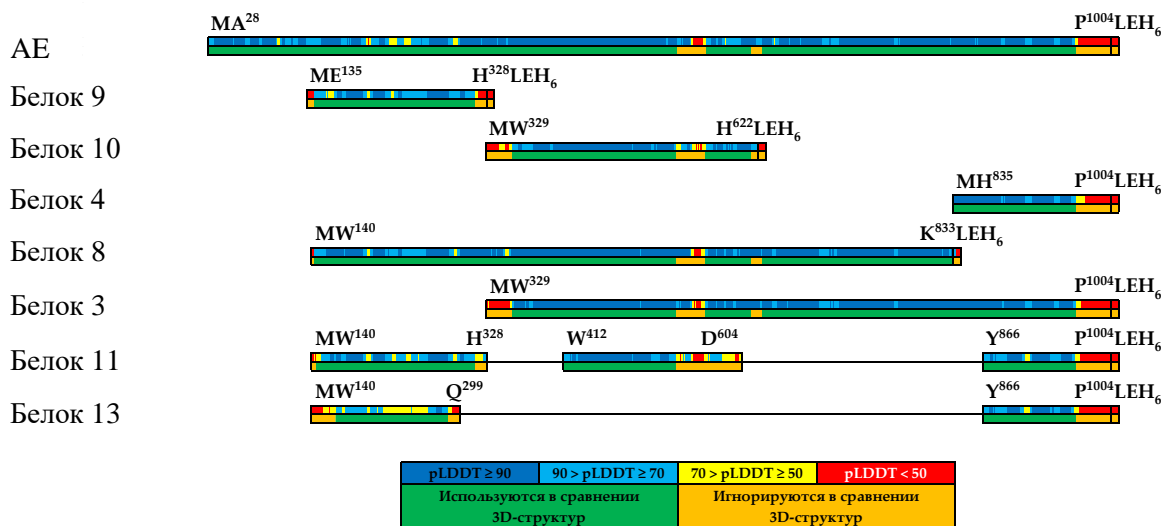


Рисунок 5. Двухуровневое схематическое изображение исследуемых белков, выровненных по первичной структуре. Верхние половины схематических изображений белков окрашены в соответствии со значениями pLDDT: синий для pLDDT ≥ 90 (высокая точность), голубой для 90 > pLDDT ≥ 70 (средняя точность для боковых цепей, хорошая точность для основной цепи), желтый для 70 > pLDDT ≥ 50 (низкая точность), красный для pLDDT < 50 (не следует интерпретировать, т.к. участки «либо не структурированы в физиологических условиях, либо структурированы только как часть комплекса»), как указано в FAQ AlphaFold). Нижние половины окрашены в зеленый и оранжевый цвета, при этом области, выбранные для сопоставления на основе RMSD, окрашены в зеленый цвет.

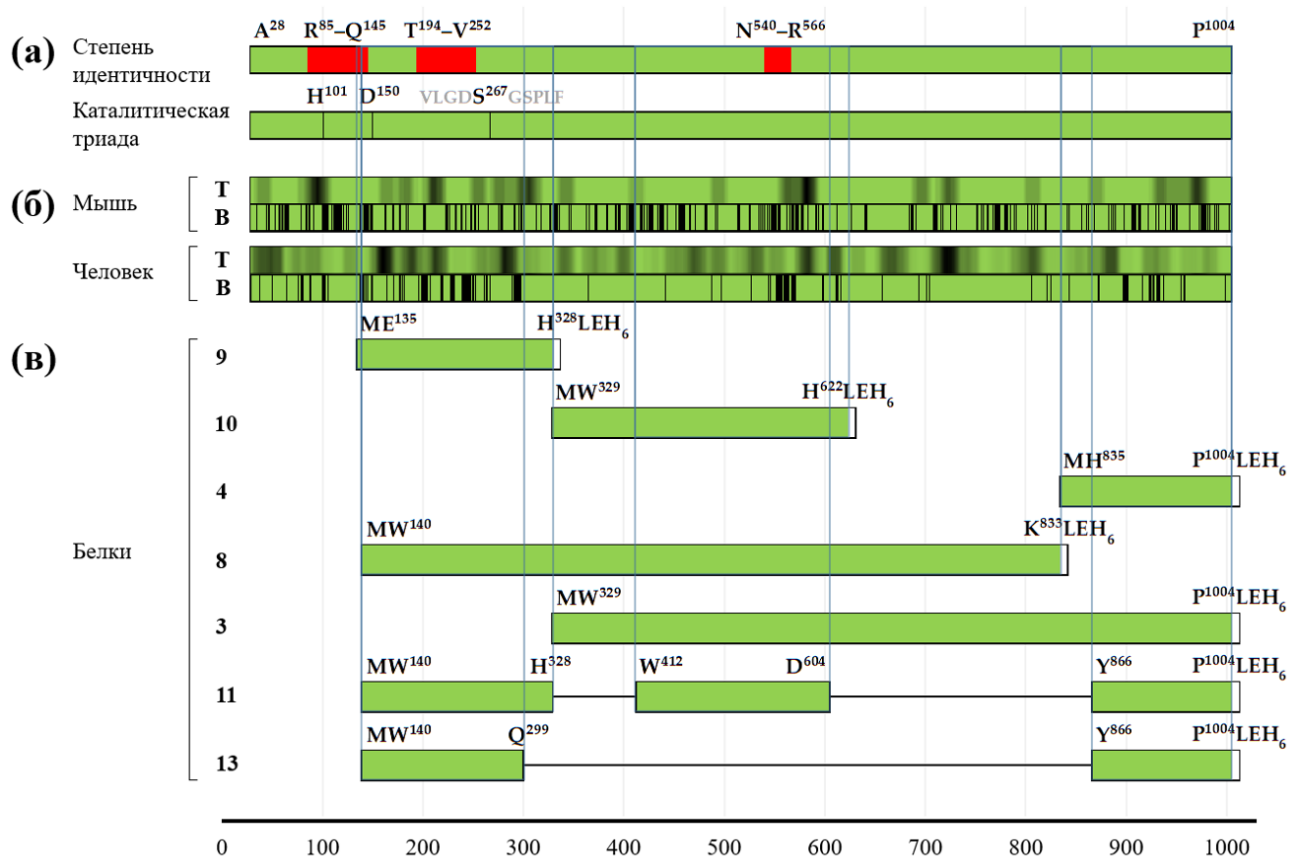


Рисунок 6. Упрощенное представление дизайна рекомбинантных белков на основе данных о последовательностях и эпитопах A²⁸-P¹⁰⁰⁴.

(а) Сходство последовательностей с IgA1-протеазами из различных штаммов *N. meningitidis*. Области с низким сходством окрашены в красный цвет. В каталитической триаде сериновой IgA1-протеазы

серин-267 представлен в составе последовательности VLGDSGSPLF.

(б) Результаты предсказания Т- и В-клеточных эпитопов для мышей и людей на основе рисунков 1, 2а, 3 (SEPPA 2.0). Для Т-клеточных эпитопов аминокислотные остатки с соответствующими значениями переменных *hit* и *average_hit* для мыши и человека соответственно окрашены темнее для более высоких значений на диаграмме. Для В-клеточных эпитопов аминокислотные остатки с оценкой выше рекомендуемого порога окрашены в черный цвет.

(в) Схемы рекомбинантных белков 9, 10, 4, 8, 3, 11 и 13.

Наработка, выделение и очистка рекомбинантных белков

Для каждого из спроектированных белков была создана соответствующая генетическая конструкция, трансформированная в клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), в которых проводилась его индукция. Для наработки каждого из исследуемых белков были подобраны условия культивирования, обеспечивающие максимальный уровень его экспрессии.

Была разработана единая методика выделения и очистки созданных нами новых рекомбинантных белков в растворимой форме. Общая схема очистки полученных белков приведена на Рис. 7.

В рамках данной схемы очистки различными являются только значения величины рН, которые выбираются согласно расчетному значению рI для каждого белка индивидуально и сохраняются при всех последующих манипуляциях. После очистки белки собирали и высушивали на лиофильной сушильной установке. Чистоту белков оценивали с помощью электрофоретического анализа в ДСН-ПААГ. По результатам анализа в ДСН-ПААГ чистота препаратов, использованных в процессе биологических испытаний, составляла не менее 92% (см Рис. 7). Полученные препараты хранили в низкотемпературном холодильнике при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

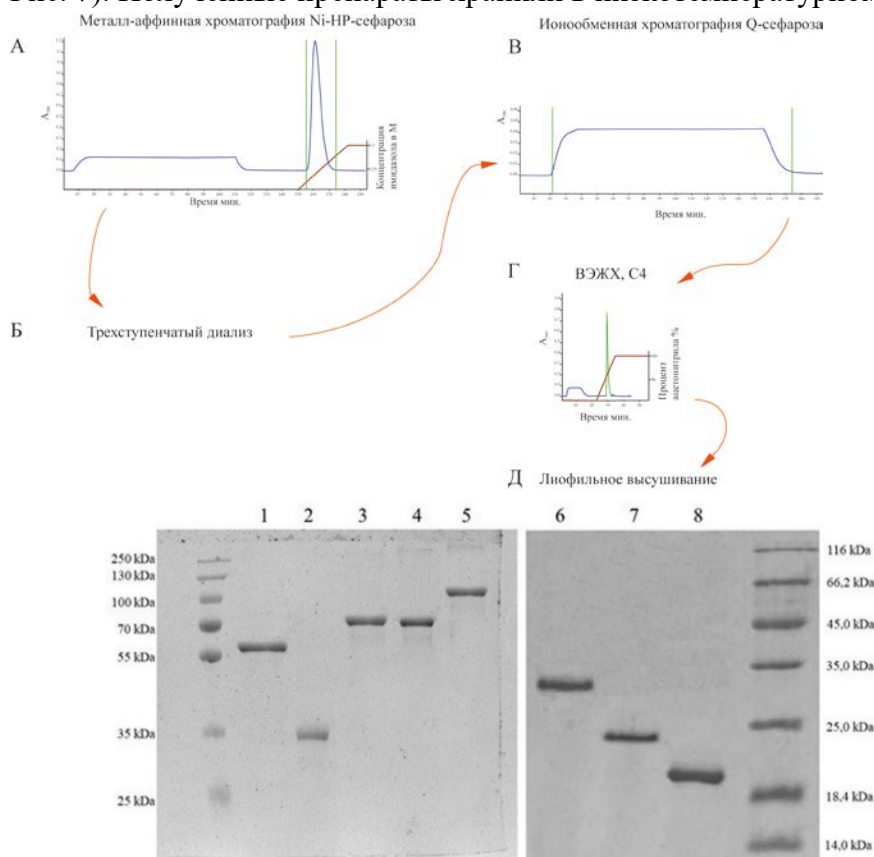


Рисунок 7. Схема единого процесса очистки белковых препаратов со следующими стадиями: А) металл-аффинная хроматография в градиенте имидазола, Б) снижение концентрации мочевины с 8 до 2 М посредством ступенчатого диализа, В) анионообменная очистка, Г) очистка на обращенно-фазовой

ВЭЖХ колонне в градиенте ацетонитрила и Д) высушивание готового препарата на лиофильной сушильной установке и электрофоретический анализ белков методом ДСН-ПААГ (10% полиакриламидный гель, восстанавливающие условия), где под номерами: 1 – белок 11, 2 – белок 13, 3 – белок 8, 4 – белок 3, 5 – белок АЕ, 6 – белок 10, 7 – белок 9, 8 – белок 4.

Исследование иммуногенных и протективных свойств созданных рекомбинантных белков

Полученные рекомбинантные белки были использованы в сравнительных иммунологических исследованиях в экспериментах *in vitro* и *in vivo* на мышах в качестве прототипов протективных антигенов широкого спектра действия для профилактики заболеваний, вызываемых патогенами *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Во всех опытах на животных моделях заражения в качестве контрольной группы выступали не иммунизированные животные.

Оценку иммуногенных свойств полученных белков осуществляли по уровню специфических антител к IgA1-протеазе в сыворотках крови иммунизированных животных на пике антителообразования. Протективную способность препаратов и возможность формирования долговременной иммунологической памяти оценивали по степени защиты животных (в %) от заражения живой вирулентной культурой менингококков серогрупп А, В и С, стрептококков серотипов 3, 19А и 13, а также гемофильной инфекцией серогруппы b штаммов 1095 и 45-2 на сроке от 4 до 6 месяцев после последнего тура иммунизации, при отсутствии антител к зрелому ферменту в крови иммунизированных животных.

Данные об уровне специфических антител в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных полученными рекомбинантными белками, и степени защиты (в %) этих животных после заражения менингококками приведены на Рис. 8.

Уровень антител к зрелой IgA1-протеазе в сыворотках мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, в структуре которых имеется общий участок W³²⁹-K⁸³³ (белки 3 и 8) из третьей четверти первичной структуры молекулы зрелого фермента, был сходен между собой и отличался от исходного белка почти в два раза (титры антител 10³/титр: 6±1, 6±2 и 11±1 соответственно, p < 0,001).

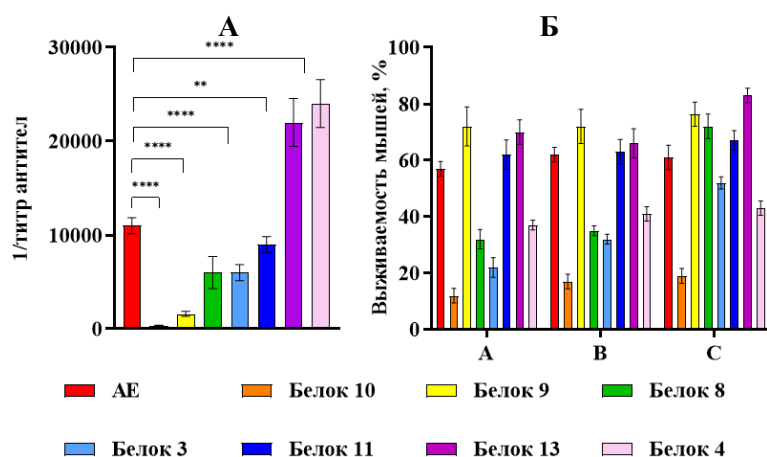


Рисунок 8. Иммуногенные и протективные свойства исследуемых белков (А) Уровень антител к белку АЕ, 1/титр; (Б) степень защиты от серогрупп *N. meningitidis*, %. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Из рисунков видно, что для мышей, иммунизированных укороченными рекомбинантными белками 3 и 8, по сравнению с иммунизацией зрелой IgA1-протеазой, характерно более низкое значение титров антител к зрелому ферменту, а также более слабая поствакцинальная защита от заражения менингококками серогрупп А и В.

Очевидно, что уровень защиты мышей, иммунизированных белками 8 и 3, значительно ниже, чем у исходного белка АЕ: 32±4%, 22±4% и 57±3% соответственно (p < 0,001), при заражении *N. meningitidis* серогруппы А, и 35±2%, 32±2% и 62±3% соответственно (p < 0,001),

при заражении *N. meningitidis* серогруппы В. В то же время, защита животных, иммунизированных этими рекомбинантными белками, от заражения менингококком серогруппы С изменяется существенно меньше: $72\pm 5\%$, $52\pm 2\%$ и $61\pm 5\%$ соответственно ($p < 0,01$).

Несмотря на низкий уровень антител к белку АЕ в сыворотке крови мышей, иммунизированных $M(E^{135}-H^{328})-LEH_6$ ($(1,6\pm 0,3) \times 10^3$ /титр) уровень защиты иммунизированных животных от заражения менингококками А, В и С был достоверно выше, чем при иммунизации исходным белком АЕ: $72\pm 8\%$, $72\pm 7\%$, $77\pm 6\%$ и $57\pm 3\%$, $62\pm 3\%$, $61\pm 5\%$ соответственно ($p < 0,005$).

Несмотря на существенные различия первичных структур рекомбинантного белка 11 и исходного белка АЕ, уровни титров антител в сыворотках крови животных, иммунизированных этими соединениями практически не отличались (титры антител 10^3 /титр: 9 ± 1 и 11 ± 1 соответственно, $p > 0,8$). Защита мышей, иммунизированных белком 11, после заражения менингококками А, В и С ($62\pm 6\%$, $63\pm 5\%$ и $67\pm 4\%$ соответственно) также осталась на уровне исходного белка АЕ ($57\pm 3\%$, $62\pm 3\%$ и $61\pm 5\%$ соответственно, $p > 0,8$).

Напротив, иммунизация мышей рекомбинантным белком 13, первичная структура которого включает только фрагменты N-концевой и С-концевой областей белка АЕ, приводит к значительному увеличению титра антител в сыворотке крови животных по сравнению с иммунизацией белком АЕ (титр антител 10^3 /титр: 22 ± 3 и 11 ± 1 соответственно, $p < 0,001$).

Кроме того, в сравнении с белком АЕ, уровень защиты мышей от заражения менингококками серогрупп А и С после иммунизации белком 13 существенно увеличился ($57\pm 3\%$ и $70\pm 5\%$, $61\pm 5\%$ и $83\pm 3\%$, соответственно, $p < 0,001$).

По результатам биологических испытаний созданных рекомбинантных гибридных белков по защите от заражения *N. meningitidis* трех серогрупп, было выявлено, что протективные характеристики молекул белков 9, 11 и 13 не уступают протективным свойствам белка АЕ.

Для исследования защитных свойств против *H. influenzae* серотип b (Hib) были выбраны препараты белков 9, 11 и 13 как препараты белковых молекул, показавших наилучшие защитные характеристики при вакцинации против всех трех серотипов *N. meningitidis*, (у 65–80% мышей см. Рис. 8) и белок АЕ. Мышей заражали летальной дозой *H. influenzae* серотип b (Hib) штаммы 1095 и 45-2. Результаты биологических испытаний четырех препаратов приведены на рисунке 9.

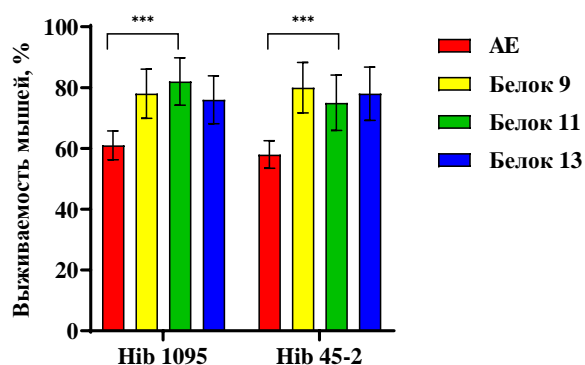


Рисунок 9. Протективные свойства препаратов белков 9, 11, 13 и АЕ от (Hib) штаммы 1095 и 45-2, в %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Выживаемость мышей, вакцинированных всеми четырьмя препаратами, оказалась на высоком уровне и по своим значениям приблизилась к защите от заражения *N. meningitidis*.

Для белка АЕ показатель защиты составил $61\pm 9\%$ для штамма Hib 1095 и $58\pm 9\%$ для штамма Hib 45-2. Защита белками 11, 13 и 9 от Hib штамма 1095 статистически не отличалась между собой и составила $82\pm 11\%$, $76\pm 12\%$ и $78\pm 12\%$ соответственно. При защите этими же белками от Hib штамма 45-2 также не было выявлено статистических различий между белками

11, 13 и 9, она составила $75 \pm 11\%$, $78 \pm 13\%$ и $80 \pm 13\%$. В обоих случаях защита белками 11, 13 и 9 значительно ($p < 0,001$) превышает защиту белком АЕ от заражения живой культурой *H. influenzae*.

Изучение протективных свойств против *S. pneumoniae* также проводили для белков 9, 11, 13 и АЕ. Защитные свойства всех белков оценивали на модели заражения иммунизированных мышей живыми вирулентными культурами серотипов 3, 14 и 19А, которые были выбраны для тестирования как наиболее распространенные патогенные серотипы. Иммунизация мышей препаратами на основе менингококковой IgA1-протеазы проявила выраженный защитный эффект при прямом инфицировании живой культурой (Рис. 10).

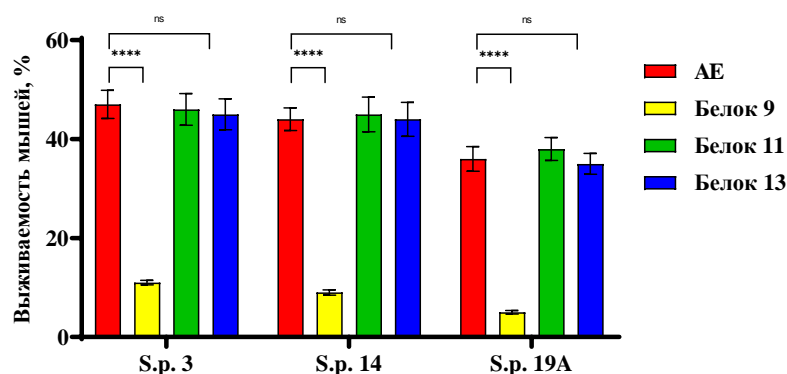


Рисунок 10. Протективные свойства препаратов белков 9, 11, 13 и АЕ от *S. pneumoniae* серотипов 3, 14 и 19А, в %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Уровень выживаемости у мышей, иммунизированных менингококковой IgA1-протеазой (АЕ), при инфицировании каждым из исследуемых серотипов, оказался весьма существенным и для серотипов 3, 14 и 19А составил соответственно $47 \pm 7\%$, $44 \pm 6\%$, и $36 \pm 8\%$ ($p < 0,001$). Это свидетельствует о принципиальной способности протеазы из *N. meningitidis* защищать мышей от летального заражения не только менингококковыми, но и пневмококковыми живыми культурами.

Что касается белков 11 и 13, они также защищали мышей от пневмококковой инфекции, и отличие их от защитного эффекта препарата АЕ статистически незначимо ($p > 0,8$).

При заражении мышей пневмококком серотипа 19А защита препаратами 11 и 13 была наименьшей и статистически не отличалась от защиты белком АЕ, выживаемость составила $38 \pm 7\%$ и $35 \pm 7\%$ соответственно ($p < 0,001$).

Защитный эффект этих препаратов против *S. pneumoniae* серотипа 14 был заметно выше, чем против серотипа 19А: выживаемость животных приблизилась к 45% ($p < 0,001$), при этом различия между белками 11 и 13 не наблюдались ($45 \pm 9\%$ и $44 \pm 9\%$ соответственно). Аналогичный результат для этих белков был получен и в отношении пневмококков серотипа 3: для белка 11 защита составила $46 \pm 8\%$, а для белка 13 – $45 \pm 8\%$.

Иммунизация белком 9 не защитила животных ни от одного из исследованных нами серотипа пневмококка. Для серотипов 3, 14 и 19А защита составила $11 \pm 5\%$, $9 \pm 7\%$, и $5 \pm 8\%$ соответственно

($p < 0,001$). Это может указывать на отсутствие в трехмерной структуре белка 9 конформационных эпитопов, общих для пневмококковых белков.

Очевидно, что по результатам исследования иммуногенных и протективных свойств созданных нами рекомбинантных белков на мышинных моделях наиболее перспективными препаратами в качестве кандидатных протективных препаратов широкого спектра действия для профилактики заболеваний, вызываемых патогенами *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и, возможно, *N. gonorrhoeae* являются рекомбинантные белки 11 и 13: $M(W^{140}-H^{328})-(W^{412}-D^{604})-(Y^{866}-P^{1004})-LEH_6$ и $M(W^{140}-Q^{299})-(Y^{866}-P^{1004})-LEH_6$, соответственно.

Выбор адьюванта

Для сравнительных иммунологических исследований в экспериментах на животных различных кандидатных протективных композиций препаратов широкого спектра действия, были выбраны два рекомбинантных белка: АЕ – зрелый фермент общей формулы $MA^{28}-P^{1004}LEN_6$ с мол. массой 109 кДа и белок 11 общей формулы $M(W^{140}-H^{328})-(W^{412}-D^{604})-(Y^{866}-P^{1004})-LEN_6$, состоящий из трех соединенных в единую полипептидную цепь фрагментов первичной структуры IgA1-протеазы, а также кодирующая белок 11 в клетках эукариот плазмидная ДНК pcDNA-IgA-11-3 в векторе pcDNA3.1.

В исследованиях были использованы растворы белков АЕ и 11 с 2М мочевиной, растворы белка 11 в смеси с гелем гидроокиси алюминия (Alhydrogel) в качестве адьюванта, а также белок 11 с плазмидной ДНК pcDNA-IgA-11-3 и без ДНК в составе полученных нами ранее липосом на основе дипальмитоил фосфатидилхолина (DPPC) (Табл. 4).

Таблица 4. Состав протективных композиций.

Шифр группы	Состав препарата
L	Липосомы
Белок 11 + L	Белок 11 + липосомы
Белок 11 + L + D	Белок 11 + липосомы + ДНК pcDNA-IgA-11-3
Белок 11 + Alhydrogel	Белок 11 + гидроокись алюминия
Белок 11 + ur	Белок 11 + мочевины
АЕ	Белок АЕ – $MA^{28}-P^{1004}LEN_6$

В работе оценивали уровень специфических антител к рекомбинантному белку АЕ в сыворотках крови мышей, иммунизированных внутрибрюшинно каждой из протективных композиций.

На 45-й день после однократной иммунизации мышей четырьмя исследованными препаратами (Белок 11 + L), (Белок 11 + L + D), (Белок 11 + Alhydrogel), и (Белок 11 + ur) титры антител против белка АЕ в сыворотках животных были невысокими и практически одинаковыми. Однако уже на 10-й день после повторной иммунизации титр антител в препаратах против АЕ был на порядок выше и практически одинаков для всех исследованных препаратов, кроме композиции Белок 11 + Alhydrogel. Кратное увеличение титра антител может указывать на успешное формирование иммунологической памяти к введенному антигену.

Динамику формирования специфических антител к белку АЕ в сыворотках мышей, иммунизированных исследованными препаратами, изучали в течение 3-х месяцев и определяли с помощью метода твердофазного ИФА. Данные по изменению титров антител в течение всего времени наблюдения приведены на Рис. 11.

Независимо от состава протективной композиции пик уровня антител в сыворотках мышей приходится на 21-й день после повторной иммунизации животных всеми исследованными препаратами. Кроме того, состав препаратов практически не повлиял на общую продолжительность иммунного ответа, которая составила 87 дней (срок наблюдения).

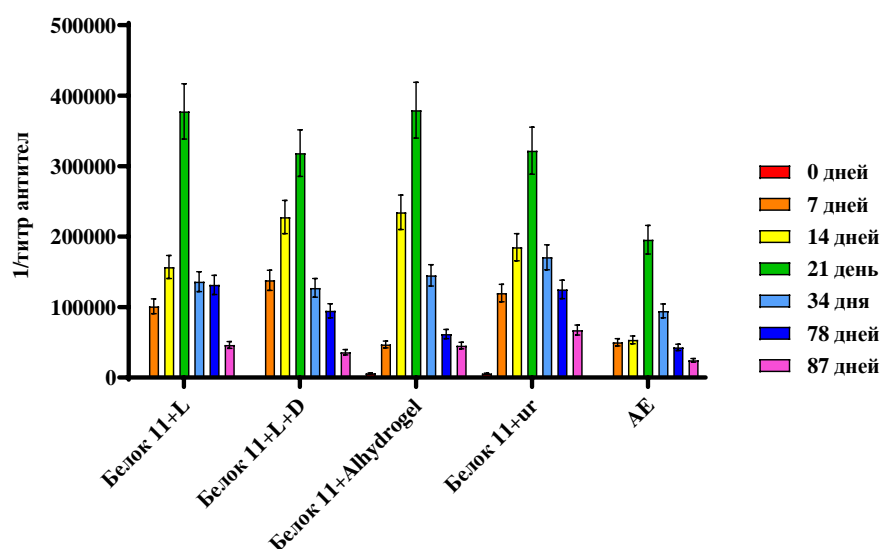


Рисунок 11. Уровень антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных исследованными препаратами.

Наибольший уровень антител наблюдался в сыворотке мышей, иммунизированных препаратом (Белок 11 + L) с белком 11, включенным в липосомы, и препаратом (Белок 11 + Alhydrogel) с белком 11 в геле гидроокиси алюминия. С учетом доверительного интервала обратные титры антител у этих препаратов составили около $(3,7 \pm 0,9) \times 10^5$. Несколько меньший уровень антител формировали препарат (Белок 11 + L + D), белок 11 с соответствующей ДНК в составе липосом, и препарат белка 11 с мочевиной без адьюванта. Обратный титр антител у этих препаратов составил $(3,2 \pm 0,8) \times 10^5$. Наконец, самый низкий титр антител наблюдался при внутрибрюшинном введении ничем не защищенного зрелого фермента, величина его обратного титра составила около $(2,0 \pm 0,5) \times 10^5$.

Протективную активность препаратов (Белок 11 + L), (Белок 11 + L + D), (Белок 11 + Alhydrogel) и (Белок 11 + ur) оценивали через месяц после повторной иммунизации мышей по уровню бактериемии и гибели инфицированных животных в сравнении с контрольными не иммунизированными животными. Для заражения животных использовали живую вирулентную культуру менингококка серогруппы В штамм Н44/76 в дозе $0,25 \times 10^6$ микробных клеток (м.к.). Оценку уровня бактериемии проводили у инфицированных мышей через 4 ч после внутрибрюшинного заражения. Контролем служили не иммунизированные животные или животные, получившие чистые липосомы по той же схеме (Рис. 12).

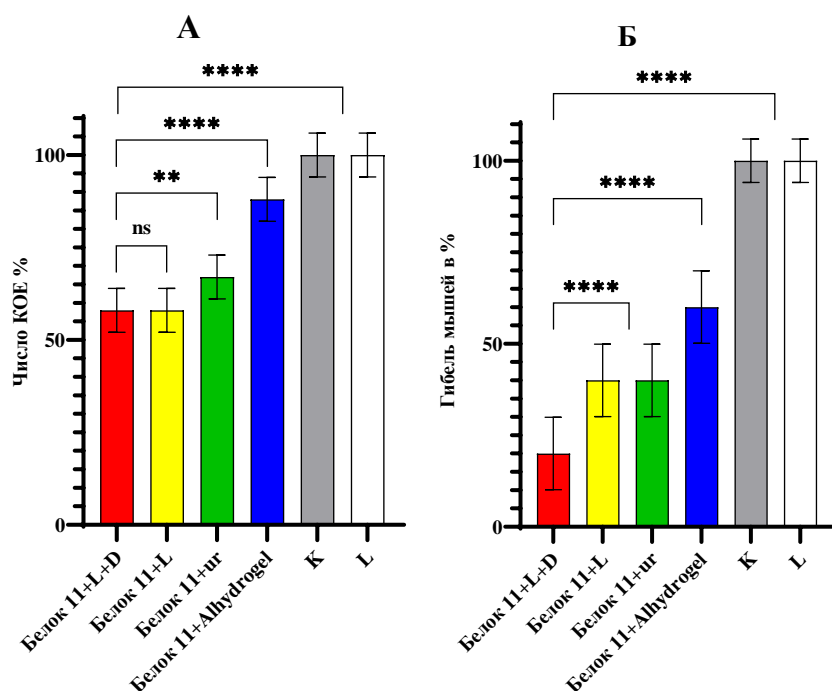


Рисунок 12. Уровень бактериемии (А) и гибель (Б) мышей при заражении *N. meningitidis* серогруппы В через 30 дн. после повторной иммунизации, в %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Максимальную защиту от заражения менингококком серогруппы В обеспечивали препараты (Белок 11 + L) и (Белок 11 + L + D), содержащие либо только белок 11, либо белок 11 с рсDNA-IgA-11-3, соответственно, в составе липосом. Число КОЕ в этих группах составляло 58% по сравнению с контролем (100%), а гибель мышей соответственно 40% и 20%. Несколько меньшую защиту показал препарат (Белок 11 + ur), содержащий белок 11 в мочевины (67% КОЕ и 40% погибших животных). Введение препарата (Белок 11 + Alhydrogel), белок 11 в смеси с гидроокисью алюминия (88%), не давало статистически значимого снижения числа КОЕ в сравнении с контролем и вызывало 60% гибели мышей.

Для оценки роли гуморального звена в защите от менингококковой инфекции мышей, иммунизированных препаратами (Белок 11 + L), (Белок 11 + L + D), (Белок 11 + Alhydrogel) и (Белок 11 + ur), животных делили на две группы, одна из которых на 34 день после повторной иммунизации получала сублетальную дозу микробов *N. meningitidis* серогруппы В, вторая группа мышей оставалась не инфицированной. На 10-й, 34-й и 56-й день после заражения, что соответствует 44-му, 68-му и 90-му дню после второй иммунизации соответственно, у мышей обеих групп отбирали кровь и оценивали уровень специфических антител к белку АЕ в сыворотке животных (Табл. 5).

Анализ полученных данных показал, что уровень антител в сыворотках крови мышей после внутрибрюшинного заражения *N. meningitidis* серогруппы В заметно отличается для различных препаратов. В группах мышей, иммунизированных препаратом (Белок 11 + L + D), у переболевших мышей на 10 день после заражения уровень титра антител возрос незначительно и в течение всего времени наблюдения оставался лишь немногим выше, чем у животных, не контактировавших с патогеном. В группах мышей, иммунизированных препаратом (Белок 11 + ur), наблюдалась аналогичная картина, только эффект превышения титра антител у переболевших животных был значительно ниже.

В то же время в группах мышей, иммунизированных препаратом (Белок 11 + Alhydrogel), у переболевших мышей на 10 день после заражения уровень титра антител заметно повысился и оставался выше, чем у здоровых животных до 78 дня наблюдения. Сходная картина изменения

титра антител наблюдалась для групп мышей, иммунизированных препаратом (Белок 11 + L), с тем отличием, что после резкого увеличения титра у переболевших мышей на 10 день после заражения, на 56 день наблюдения уровень титра отличался уже не столь заметно, как и на 78 день наблюдения, где разница также была невелика.

Таблица 5. Уровень специфических антител, $\times 10^5$ к белку АЕ в сыворотке животных на 10-й, 34-й и 56-й день после заражения сублетальной дозой микробов *N. meningitidis* серогруппы В.

Срок после 2 имм., дней	Срок после N.m., дней	N.m.*	Белок 11 + L	Белок 11 + L + D	Белок 11 + Alhydrogel	Белок 11 + ur
44	-	-	1,4	1,3	1,5	1,7
44	10	+	2,3	1,5	1,7	1,8
68	-	-	1,1	0,9	0,6	1,3
68	34	+	1,8	1,1	0,8	1,4
90	-	-	0,5	0,4	0,5	0,7
90	56	+	0,6	0,4	0,5	0,7

* (+) – мыши, зараженные *N. meningitidis* серогруппы В;
 (-) – не зараженные животные.

Для оценки роли иммунных лимфоцитов в защите от менингококка был использован метод адоптивного переноса лимфоцитов селезенки от мышей-доноров, иммунизированных исследованными препаратами, интактным мышам-реципиентам при внутрибрюшинном введении. Перенос лимфоцитов осуществляли через 10 месяцев после повторной иммунизации доноров в отсутствие циркулирующих антител к белку АЕ в крови иммунизированных животных. Через сутки после переноса лимфоцитов интактным мышам-реципиентам, животных заражали по стандартной схеме. Уровень бактериемии в крови инфицированных мышей по сравнению с контрольными животными (реципиентами лимфоцитов интактных мышей) был снижен (Рис. 13).

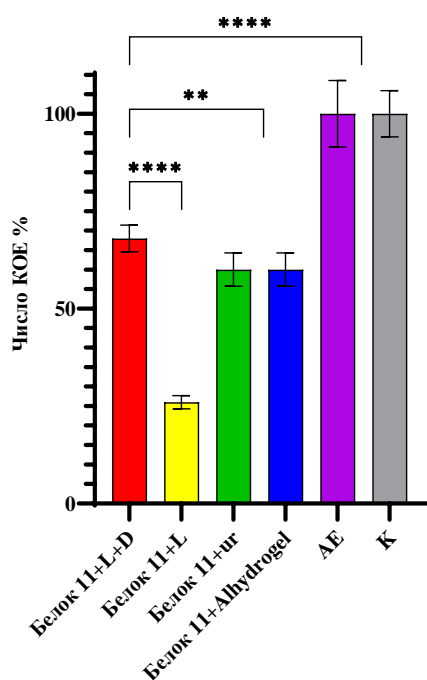


Рисунок 13. Уровень бактериемии у мышей-реципиентов при переносе лимфоцитов от мышей-доноров через 10 мес. после реиммунизации, в %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Обсуждение

В результате проведенных исследований были созданы семь новых рекомбинантных белков на основе фрагментов первичной структуры IgA1-протеазы *N. meningitidis* серогруппы В штамм Н44/76, из различных участков молекулы. Данные белки были сконструированы на основе расчетов распределения В- и Т-клеточных эпитопов в составе молекулы зрелого фермента. При исследовании распределения предсказанных В-эпитопов применялись как линейная первичная последовательность белка, так и его трехмерная структура (Рис. 6).

Участок первичной структуры с высокой плотностью линейных и пространственных В-эпитопов фермента E¹³⁵-H⁶²² был разделен на два фрагмента: N-концевую часть E¹³⁵-H³²⁸ и C-концевую часть W³²⁹-H⁶²². C-концевая часть всего зрелого фермента рассматривалась нами в интервале W⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴. При этом участок первичной структуры IgA1-протеазы M¹-A²⁷ мы не рассматривали, так как этот диапазон соответствует сигнальному пептиду, который отсутствует в зрелом ферменте. Также был удален из рассмотрения интервал A²⁸-Y¹³⁴, где расположен остаток H¹⁰¹, принадлежащий к каталитической триаде, тем самым исключается возможность какой-либо каталитической активности у всех рассмотренных нами фрагментов протеазы. Роль участка с наименьшей плотностью В-эпитопов оценивали, удаляя фрагменты N- и/или C-концевых частей. Указанные фрагменты имеют формулу W³²⁹-P¹⁰⁰⁴ и W¹⁴⁰-K⁸³³. На основе выбранных структур были созданы соответствующие рекомбинантные белки, снабженные полигистидиновой меткой на C-концевой части: M(E¹³⁵-H³²⁸)-LEN₆ (белок 9), M(W³²⁹-H⁶²²)-LEN₆ (белок 10), M(H⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ (белок 4), M(W¹⁴⁰-K⁸³³)-LEN₆ (белок 8), M(W³²⁹-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ (белок 3). Были исследованы иммуногенные и протективные свойства всех указанных рекомбинантных белков против живой вирулентной культуры *N. meningitidis* серогрупп А, В и С на мышинной модели заражения. При этом белок, содержащий N- концевую часть молекулы IgA1-протеазы (белок 9) проявил низкую иммуногенность и при этом показал высокий уровень протективности против всех трех исследованных штаммов менингококка. В свою очередь, белок 10 не проявил иммуногенных, и показал слабые протективные свойства. Белок 4 обладает иммуногенными свойствами, превосходящими зрелую IgA1-протеазу, но несколько уступает ей по протективным свойствам. Результаты биологических испытаний свидетельствуют, что у рекомбинантных белков 8 и 3, тестируемых на мышах BALB/c, удаление N-концевой или обеих (N- и C-концевой) областей исходного белка существенно снижало выработку антител, ослабляя иммуногенность, а также, для менингококков серогрупп А и В, защитные свойства. В результате проведенных исследований была установлена ключевая роль N- и C-концевых частей в защите животных.

Анализ участков высокой степени сходства по первичной структуре зрелой IgA1-протеазы выявил, что в предсказанных в результате TBLASTN зрелых IgA1-протеазах бактерий *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и около четверти изученных штаммов *H. influenzae* имеется сходство первичных структур более чем на 85% (следует отметить, что у *H. influenzae* есть и другие варианты IgA1-протеазы). Однако анализ этих участков высокой степени сходства по первичной структуре всех исследуемых белков, показал наличие в белке 9 существенных фрагментов (E¹³⁵-Q¹⁴⁵ и T¹⁹⁴-V²⁵²), обладающих низкой консервативностью среди всего семейства микробных IgA1-протеаз серинового типа (Рис. 6). Данный результат дает основания сомневаться в способности антигена на основе белка 9 защищать от иных патогенов, вирулентность которых обусловлена продукцией IgA1-протеазы серинового типа. Для устранения этой проблемы были предложены еще две белковые молекулы на основе различных сшитых между собой участков IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴: белок 11 (M(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆) с молекулярной массой 59,4 кДа и белок 13 (M(W¹⁴⁰-Q²⁹⁹)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆) с молекулярной массой 34,7 кДа. Точные границы выбранных фрагментов в составе гибридных

белков определялись с учетом значений величины изоэлектрической точки конечных белковых молекул, таким образом, чтобы данная величина заметно отличалась от физиологического значения рН, равного 7,4. Для этого структуру укороченных участков, входящих в состав слитых белков, подбирали путем последовательного удаления с С- и/или N-концов фрагментов E¹³⁵-H³²⁸, H⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴ и W³²⁹-H⁶²² аминокислотных последовательностей, содержащих заряженные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот, аргинина, лизина и гистидина, с дальнейшим вычислением значений изоэлектрической точки (pI) для каждого варианта слитого белка. Очевидно, что выбор более коротких, в сравнении с белками 9, 10 и 4, интервалов W¹⁴⁰-Q²⁹⁹ и Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴ при проектировании белка 13, а также интервалов W¹⁴⁰-H³²⁸, W⁴¹²-D⁶⁰⁴ и Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴ при проектировании белка 11 приводит к незначительной потере МНС-II Т-клеточных эпитопов и аминокислотных остатков, которые потенциально являются частью конформационных В-клеточных эпитопов IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴, по крайней мере, в N- и С-концевых областях потенциальных слитых белков, то есть при этом удалось сохранить максимальное количество В- и Т-клеточных эпитопов исходных коротких структур (Табл. 3 и Рис. 6).

Изучение иммуногенных и протективных свойств данных белков показало, что несмотря на существенную разницу в иммуногенности, белки 9, 11 и 13 не уступают, а в ряде случаев и превосходят белок АЕ по протективным свойствам. Иммуногенные и протективные свойства белков 11 и 13 на мышинной модели заражения охарактеризованы на Рис. 8. Иммуногенные и протективные свойства белка 11 очень близки к таковым для IgA1-протеазы. Белок 13 обладает более высокими иммуногенными, а также, для менингококков А и С, более высокими протективными свойствами, и, как и 11, очень близок к IgA1-протеазе по протективным свойствам для менингококков В. Это может свидетельствовать о том, что структуры рекомбинантных белков 11 и 13 сохраняют практически все необходимые МНС-II Т-клеточные эпитопы и конформационные В-клеточные эпитопы зрелого фермента.

Белки 9, 11 и 13 были испытаны против заражения мышей живыми культурами *H. influenzae* и *S. pneumoniae*. Защита животных от заражения живой вирулентной культурой *H. influenzae* двух штаммов не выявила различий между белками 9, 11 и 13, при этом каждый из них защищал животных лучше, чем белок АЕ. Белки 11, 13 и АЕ показали защиту против *S. pneumoniae* на уровне 40%, однако белок 9 не проявил выраженных протективных свойств, находясь на уровне 5-10%.

Результаты изучения иммуногенных и протективных свойств полученных нами рекомбинантных белков позволили рассматривать слитые белки 11 и 13 как основу для потенциальной вакцины против менингококковой инфекции и, возможно, других заболеваний, вызываемых патогенами, продуцирующими IgA1-протеазу.

Для исследований протективных антигенов в составе различных композиций был выбран белок 11 как белок, обладающий меньшим титром антител, который не превосходит титр исходной молекулы АЕ. При практически неотличимых значениях КОЕ для композиций (Белок 11 + L), (Белок 11 + L + D) и (Белок 11 + ur) наилучшая выживаемость наблюдалась для композиции, содержащей белок 11 и кодирующей его молекулы ДНК pcDNA-IgA-11-3. в составе липосом на основе DPPC. Этот результат можно объяснить как известной способностью липосом, содержащих белковые антигены, стимулировать макрофаги эффективно процессировать антиген и представлять его продукты молекулам МНС класса II, так и возможным влиянием молекулы ДНК, способной обеспечить экспрессию молекулы антигена в клетках эукариот.

Различие же в титрах на пике антителообразования может объясняться либо разницей в мол. массе антигенов (мол. масса белка АЕ вдвое больше, а значит, концентрация антигена вдвое ниже), либо более низкой устойчивостью белка АЕ в процессе иммунизации, либо тем, что

частично денатурированное состояние белка 11 экспонирует большее количество эпитопов на единицу массы, в сравнении с белком АЕ.

Анализ данных по бактериемии животных после адоптивного переноса лимфоцитов селезенки выявил, что все композиции показали значимое снижение числа КОЕ, при этом минимальное число КОЕ (26%) наблюдается у мышей-реципиентов, которым были перенесены лимфоциты селезенки от мышей, иммунизированных препаратом (Белок 11 + L). Отсутствие защиты лимфоцитами мышей, иммунизированных АЕ, может свидетельствовать об отсутствии долгоживущих клеток памяти у доноров через 10 месяцев после иммунизации.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли гуморального и клеточного звеньев иммунитета при защите животных, иммунизированных исследуемыми препаратами, от заражения менингококками различных серогрупп.

Выводы

1. Исследование первичных структур IgA1-протеаз из *Neisseria meningitidis* и *Neisseria gonorrhoeae*, а также IgA-B-протеаз из *Haemophilus influenzae* выявило их высокую степень идентичности на участках, соответствующих зрелому ферменту ($A^{28}-P^{1004}$) из менингококка серогруппы В штамма Н44/76, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве основы для проектирования противоменингококкового антигена, обладающего протективным антибактериальным действием.
2. Для проектирования протективного противоменингококкового антигена на основе фрагментов первичной структуры IgA1-протеазы $A^{28}-P^{1004}$ менингококка серогруппы В штамма Н44/76, было рассчитано распределение В- и Т-клеточных эпитопов, на основании которых были выбраны фрагменты первичной структуры этого белка.
3. На основе проведенных исследований, были сконструированы и получены семь рекомбинантных белков с формулами: $M(H^{835}-P^{1004})-LEN_6$, $M(W^{329}-H^{622})-LEN_6$, $M(E^{135}-H^{328})-LEN_6$, $M(W^{329}-P^{1004})-LEN_6$, $M(W^{140}-K^{833})-LEN_6$, $M(W^{140}-H^{328})-(W^{412}-D^{604})-(Y^{866}-P^{1004})-LEN_6$, $M(W^{140}-Q^{299})-(Y^{866}-P^{1004})-LEN_6$.
4. В экспериментах на мышах линии BALB/c были изучены иммуногенные и протективные свойства полученных рекомбинантных белков в отношении менингококков трех серогрупп, двух штаммов гемофильной инфекции и трех штаммов стрептококка. Показана высокая протективность в отношении всех исследованных патогенов для двух сконструированных гибридных белков: $M(W^{140}-H^{328})-(W^{412}-D^{604})-(Y^{866}-P^{1004})-LEN_6$ с молекулярной массой 59,4 кДа и $M(W^{140}-Q^{299})-(Y^{866}-P^{1004})-LEN_6$ с молекулярной массой 34,7 кДа.
5. Изучены динамика иммунного ответа и способность к формированию иммунологической памяти при иммунизации животных рекомбинантным белком формулы $M(W^{140}-H^{328})-(W^{412}-D^{604})-(Y^{866}-P^{1004})-LEN_6$ в составе ряда протективных композиций. Показаны протективные свойства исследованных препаратов от заражения менингококком серогруппы В. Наилучшие результаты были достигнуты для двух протективных композиций, содержащих белок $M(W^{140}-H^{328})-(W^{412}-D^{604})-(Y^{866}-P^{1004})-LEN_6$ и этот же белок совместно с ДНК, кодирующей его в клетках эукариот в составе липосом.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Котельникова О.В., Аллилуев А.П., Зинченко А.А., **Прокопенко Ю.А.**, Жигис Л.С., Зуева В.С., Разгуляева О.А., Гордеева Е.А., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Румш Л.Д. Особенности формирования иммунитета к менингококковой инфекции у мышей, иммунизированных фрагментами IgA1 протеазы *N. meningitidis* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 165, № 6. – С. 722–725. DOI: 10.1007/s10517-018-4260-1
2. Зинченко А.А., Котельникова О.В., Гордеева Е.А., **Прокопенко Ю.А.**, Разгуляева О.А., Серова О.В., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Жигис Л.С., Зуева В.С., Аллилуев А.П., Румш Л.Д. Иммуногенные и протективные свойства IgA1-протеазы *Neisseria meningitidis* и ее фрагментов // Биоорг. химия. – 2018. – Т. 44, № 1. – С. 61–70. DOI: 10.1134/S1068162018010193
3. Kotelnikova O., Alliluev A., Zinchenko A., Zhigis L., **Prokopenko Y.**, Nokel E., Razgulyaeva O., Zueva V., Tokarskaya M., Yastrebova N., Gordeeva E., Melikhova T., Kaliberda E., Rumsh L. Protective potency of recombinant meningococcal IgA1 protease and its structural derivatives upon animal invasion with meningococcal and pneumococcal infection // *Microbes and Infection*. – 2019. – Vol. 21, № 7. – P. 336–340. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.02.003
4. Жигис Л.С., Котельникова О.В., Зинченко А.А., Карлинский Д.М., **Прокопенко Ю.А.**, Румш Л.Д. IgA1 протеаза как основа вакцины для профилактики бактериальных менингитов // Биоорг. химия. – 2021. – Т. 47, № 4. – С. 419–430. DOI: 10.1134/S106816202104021X
5. Котельникова О.В., **Прокопенко Ю.А.**, Зинченко А.А., Разгуляева О.А., Нокель Е.А., Карлинский Д.М., Жигис Л.С., Румш Л.Д. Специфические антитела к фрагментам IgA1 протеазы менингококка при формировании иммунитета к бактериальным инфекциям // БЭБИМ. – 2022. – Т. 173, № 4. – С. 436–439. DOI: 10.1007/s10517-022-05614-z
6. Karlinsky D., **Prokopenko Yu.**, Zinchenko A., Zhigis L., Kotelnikova O., Rumsh L. Smirnov I. Highly Similar Sequences of Mature IgA1 Proteases from *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* // *Pathogens*. – 2022. – Vol. 11, № 7. – P. 734–743. DOI: 10.3390/pathogens11070734
7. **Prokopenko Yu.**, Zinchenko A., Karlinsky D., Kotelnikova O., Razgulyaeva O., Gordeeva E., Nokel E., Serova O., Kaliberda E., Zhigis L., Rumsh E., Smirnov I. Protective Antimicrobial Effect of the Potential Vaccine Created on the Basis of the Structure of the IgA1 Protease from *Neisseria meningitidis* // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12, № 12. – P. 1355. DOI: 10.3390/vaccines12121355

Патенты

RU 2701964 C2, 2019 (Зинченко А.А., Серова О.В., **Прокопенко Ю.А.**, Гордеева Е.А., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Калиберда Е.Н., Котельникова О.В., Жигис Л.С., Разгуляева О.А., Аллилуев А.П., Румш Л.Д. Рекомбинантный белок, обладающий протективным действием в отношении менингококков (варианты), полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный белок, рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая указанный полинуклеотид, клетка-хозяин, содержащая указанную рекомбинантную плазмидную ДНК, способ получения рекомбинантного белка // Патент РФ на изобретение №2 701 964. Опубликовано 02.10.2019. Бюл. №28).