

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Прокопенко Юрий Анатольевич

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

1.5.6 – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН, доктор химических наук
Смирнов Иван Витальевич

Москва – 2026

Оглавление

Список использованных сокращений.....	5
Введение	8
1. Обзор литературы	16
1.1. Менингит	16
1.1.1. Бактериальный менингит.....	17
1.1.2. Вирусный менингит	30
1.1.3. Грибковый менингит.....	30
1.1.4. Паразитический менингит	31
1.2. Менингококк (<i>Neisseria meningitidis</i>).....	32
1.2.1. Общие сведения.....	32
1.2.2. Патогенность и вирулентность	36
1.3. IgA1-протеазы	37
1.3.1. Общие сведения.....	37
1.3.2. IgA1-протеаза и ее фрагменты как основа для создания противоменингококковой вакцины	45
1.4. Вакцины	50
1.4.1. Общие сведения.....	50
1.4.2. Виды вакцин	51
2. Материалы и методы	59
2.1. Штаммы <i>E. coli</i> и <i>N. meningitidis</i> . Клинические материалы	59
2.2. Методы генной инженерии	59
2.2.1. Основные реактивы.....	59
2.2.2. Ферменты	59
2.2.3. Маркеры молекулярных весов	59
2.2.4. Основные растворы.....	60
2.2.5. Среды для культивирования <i>E. coli</i> и <i>N. meningitidis</i>	60
2.2.6. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> и трансформация	

плазмидной ДНК	60
2.2.7. Выделение плазмидной ДНК	61
2.2.8. Создание генетических конструкций, кодирующих фрагменты IgA1-протеазы	61
2.2.9. Трансформация компетентных клеток	65
2.2.10. Приготовление музейного штамма	65
2.3. Методы работы с белками	66
2.3.1. Белковый электрофорез в полиакриламидном геле	66
2.3.2. Получение рекомбинантных белков	67
2.4. Биоинформатические методы	68
2.4.1. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности для входных данных	68
2.4.2. Основные списки штаммов	68
2.4.3. BLAST	70
2.4.4. Предсказание расположения Т-клеточных эпитопов	71
2.4.5. Моделирование трехмерных структур	71
2.4.6. Предсказание расположения В-клеточных эпитопов	72
2.5. Иммунологические методы исследований	72
2.5.1. Определение иммунологической активности рекомбинантных белков	72
2.5.2. Определение протективной активности рекомбинантных белков	73
2.6. Липосомные препараты	74
3. Результаты	76
3.1. BLAST	76
3.1.1. Подготовка к расчетам	76
3.1.2. Сходство последовательностей полноразмерной цепи IgA1-протеазы из <i>N. meningitidis</i> штамма Н44/76 с белками из разных штаммов <i>N. meningitidis</i>	77
3.1.3. Сходство последовательностей отдельных участков IgA1-протеазы из <i>N. meningitidis</i> штамма Н44/76 с белками из различных штаммов <i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> и <i>H. influenzae</i>	79

3.2. Эпитопы	84
3.2.1. Распределение Т-клеточных эпитопов в первичной структуре IgA1-протеазы	85
3.2.2. Распределение конформационных В-клеточных эпитопов в третичной структуре IgA1-протеазы.....	86
3.2.3. Сравнительный анализ третичных структур предложенных рекомбинантных белков	90
3.3. Нарботка, выделение и очистка рекомбинантных белков	92
3.4. Исследование иммуногенных и протективных свойств созданных рекомбинантных белков.....	95
3.5. Выбор адъюванта	100
4. Обсуждение	106
Выводы	110
Список литературы.....	111
Приложения.....	131
Приложение А	131
Приложение Б.....	131

Список использованных сокращений

Русскоязычные:

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – додецилсульфата натрия (также известен как лаурилсульфат натрия)

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ИФА – твердофазный иммуноферментный анализ

КОЕ – колониеобразующая единица

ЛОС – липоолигосахарид

ЛПС – липополисахарид

ПААГ – полиакриламидный гель

ПМН – полиморфноядерные нейтрофилы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СМЖ – спинномозговая жидкость

СРБ – С-реактивный белок

ТВ – тельца включения

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан

ФХ – фосфатидилхолин

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Англоязычные:

ANOVA – дисперсионный анализ (ANalysis Of VAriance)

BLAST – семейство компьютерных программ для поиска участков локального сходства между заданными аминокислотными или нуклеотидными последовательностями (Basic Local Alignment Search Tool)

BLASTP – BLAST, предназначенный для поиска участков локального сходства между заданной аминокислотной последовательностью и всеми аминокислотными последовательностями из базы данных

CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation)

CD19+ – маркер В-лимфоцитов

CD4+ – маркер Т-хелперов (вид Т-клеток, регулирующие процессы работы других клеток иммунной системы)

CD8+ – маркер Т-киллеров (вид цитотоксических Т-лимфоцитов)

DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин

DTT – дитиотреитол

ECHO – эховирусы

EMA – Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency)

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration)

fHbp – белок, связывающий липопротеиновый фактор H (Factor H-binding protein)

GBD – глобальное бремя болезней – это показатели, характеризующие всевозможные последствия от основных заболеваний и травм (Global Burden of Disease Study)

GBS – стрептококк группы В (group B *Streptococcus*)

Hib – гемофильная инфекция типа b (type B *H. influenzae*)

HLA – человеческие лейкоцитарные антигены (human leukocyte antigen)

IEDB – База данных и аналитический ресурс по иммунным эпитопам (Immune Epitope Database, Immune Epitope Database and Analysis Resource)

IgA1 – сывороточный иммуноглобулин человека типа A1

sIgA1 – секреторный иммуноглобулин человека типа A1

IgA1pr1, IgA1P – фермент IgA1-протеаза

IgG3 –подкласс иммуноглобулина человека G3

IPTG – изопропилтиогаляктопиранозид

LAMP-1 – гликопротеин мембраны лизосомы типа 1 (Lysosomal-associated membrane protein 1)

LB, 2YT, SOB, SOC и TSA-F – питательные среды для культивирования бактерий

LCMV – вирус лимфоцитарного хориоменингита

LCR – участок низкой сложности в белке (low complexity region)

MAFFT – программа для множественного выравнивания аминокислотных и нуклеотидных последовательностей (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform)

MenACWY-D, MenACWY-CRM, MenACWY-TT, MenAfriVac (PsA-TT), MeNZB, 4CMenB, MenB-FHbp, MenABCWY, MenABCWY-CRM – противоменингококковые вакцины

MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information)

NTHi – нетипируемые гемофильные инфекции (nontypable *H. influenzae*)

OMV – белки наружной мембраны (Outer Membrane Vesicles)

PBS – фосфатно-солевой буферный раствор

PBST – фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением твин-20

PCV – противопневмококковые вакцины различной валентности

pLDDT – параметр, описывающий локальную достоверность модели белка (predicted Local Distance Difference Test)

RMSD – среднеквадратичное отклонение между положениями атомов (root mean square deviation)

T4P – пили типа 4 (Type IV pili)

TBE – буферный раствор, содержащий трис, борную кислоту и ЭДТА

TBLASTN – BLAST, предназначенный для поиска участков локального сходства между заданной аминокислотной последовательностью и аминокислотными последовательностями, соответствующими нуклеотидным последовательностям из базы данных

TD – транслокаторный домен

TE – буферный раствор, содержащий только трис и ЭДТА

TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

Введение

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 [1–3].

Бактериальный менингит обладает четко очерченной этиологической структурой, где доминирующая роль принадлежит *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus agalactiae* (группа Б). 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) [3,4].

Современный арсенал средств специфической профилактики бактериального менингита включает три основных типа вакцин:

Полисахаридные вакцины, основанные на капсульных полисахаридах и существующие в двухвалентном (серогруппы А, С), трехвалентном (А, С, W-135) и четырехвалентном (А, С, W-135, Y) вариантах.

Конъюгированные вакцины, в которых полисахариды ковалентно связаны с белком-носителем, что включает моновалентные (А или С), четырехвалентные (А, С, W-135, Y) и новейшие пентавалентные (А, С, W-135, Y, X) формы.

Белковые вакцины, созданные на основе поверхностных антигенов (главным образом, против серогруппы В) [3].

Несмотря на прогресс в разработке поливалентных препаратов, все существующие 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 всего спектра этиологических агентов бактериального менингита, остается нерешенной научной задачей [3,5–7].

Бактериальная IgA1-протеаза – ключевой фактор вирулентности для ряда патогенов – рассматривается в качестве перспективного протективного антигена для разработки универсальной вакцины широкого спектра действия. Основанием для этого служит высокая степень идентичности первичной структуры протеаз серинового типа, выявленная у *N. meningitidis* (независимо от серогруппы), *N. gonorrhoeae* и у ряда штаммов *H. influenzae*, что позволяет рассматривать данный антиген или его иммуногенные фрагменты в качестве

основы для создания моновакцины [3,8].

Эти высокоспецифичные ферменты катализируют гидролиз пептидных связей Pro-Ser или Pro-Thr в шарнирной области секреторных (sIgA1) и сывороточных (IgA1) иммуноглобулинов A1 человека [9]. Также имеются данные о расщеплении IgG3 IgA1-протеазой типа 1 из *N. meningitidis* [10]. Расщепляя sIgA1, покрывающий слизистую оболочку организма хозяина, IgA1-протеазы способствуют адгезии болезнетворных бактерий к поверхности слизистой оболочки и тем самым способствуют развитию инфекции. Иммунизация организма хозяина рекомбинантной IgA1-протеазой должна приводить к образованию антител, нейтрализующих IgA1-протеазу микроорганизмов и предотвращающих развитие инфекции на ранней ее стадии, и к последующему формированию длительного иммунитета [3].

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 [11].

Кроме того, 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 [3,12,13].

Эти данные позволили нам считать IgA1-протеазу и рекомбинантные белки, основанные на фрагментах ее первичной структуры и обладающие иммуногенной и защитной активностью, как перспективные кандидатные молекулы для создания протективного антигена широкого спектра действия. Предполагается, что такая вакцина 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 [3].

Целью данного исследования является изучение роли различных участков первичной структуры IgA1-протеазы из *Neisseria meningitidis* серогруппы В штамма Н44/76 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 её 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 мышинной 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/c были изучены иммуногенные и протективные противоменингококковые свойства полученных рекомбинантных белков. Наилучшие результаты продемонстрировали два рекомбинантных гибридных белка: M(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ с молекулярной массой 59,4 кДа и M(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 M(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(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 проведён 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 H44/76. 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/c 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

Менигококковые и гонококковые IgA1-протеазы, а также IgA-B-протеазы из *N. 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/c от менигококков 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 менигококка 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.

Объём и структура работы

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

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих конференциях и симпозиумах:

1. Жигис Л.С., Котельникова О.В., Зинченко А.А., Аллилуев А.П., Серова О.В., Гордеева Е.А., Нокель Е.А., **Прокопенко Ю.А.**, Румш Л.Д. Сравнительный анализ иммуногенных и протективных свойств белковых фрагментов IgA1 протеазы менингококка // V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России. Сочи, Дагомыс, 4–8 октября 2016 г. / АСТА NATURAE. – 2016. – Спецвыпуск, Т. 2. – С. 36.
2. Зинченко А.А., **Прокопенко Ю.А.**, Котельникова О.В., Аллилуев А.П., Гордеева Е.А., Калиберда Е.Н., Мелихова Т.Д., Некрасов А.Н., Нокель Е.А., Румш Л.Д. IgA1 протеаза *N. meningitidis*. поиск и создание рекомбинантных белковых фрагментов с потенциальным протективным действием // V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России. Сочи, Дагомыс, 4–8 октября 2016 г. / АСТА NATURAE. – 2016. – Спецвыпуск, Т. 2. – С. 37.
3. Зинченко А.А., Котельникова О.В., **Прокопенко Ю.А.**, Гордеева Е.А., Разгуляева О.А., Калиберда Е.Н., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Жигис Л.С., Аллилуев А.П., Румш Л.Д. Фрагменты IgA1 протеазы *N. meningitidis* как основа поливалентной вакцины // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII российский симпозиум «Белки и пептиды». Москва, ИБХ РАН, 18–22 сентября 2017 г. / АСТА NATURAE. – 2017. – Спецвыпуск. – С. 122
4. **Прокопенко Ю.А.**, Карлинский Д.М., Зинченко А.А. Конформационные эпитопы бактериальных IgA1 протеаз // XXXI зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, ИБХ РАН, 11–14 февраля 2019 г. / Сборник тезисов. – С. 55.
5. **Прокопенко Ю.А.**, Карлинский Д.М., Серова О.В., Котельникова О.В., Зинченко А.А., Румш Л.Д. Поливалентная моновакцина на основе сериновой IgA1 протеазы менингококка // XXXI зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, ИБХ РАН, 11–14 февраля 2019 г. / Сборник тезисов. – С. 27.
6. **Прокопенко Ю.А.**, Зинченко А.А., Котельникова О.В., Румш Л.Д. Потенциальная однокомпонентная вакцина широкого спектра действия на основе фрагментов рекомбинантной IgA1 протеазы *N. meningitidis* // IV международная научно-практическая конференция «Биотехнология: достижения и перспективы развития».

- Республика Беларусь, Пинск, Полесский государственный университет, 20–22 ноября 2019 г. / Сборник материалов IV международной научно-практической конференции. – С. 90-93.
7. Карлинский Д.М., **Прокопенко Ю.А.**, Зинченко А.А. Сравнительный анализ гомологии первичной структуры IgA1 протеаз из *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Haemophilus influenzae* // III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021 г. / Сборник тезисов. – 2021. – Т. 2. – С. 128.
 8. **Прокопенко Ю.А.**, Котельникова О.В., Карлинский Д.М., Залевский А.О., Жигис Л.С., Румш Л.Д., Зинченко А.А., Смирнов И.В. Универсальная моновакцина на основе сериновой IgA1 протеазы менингококка // III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021 г. / Сборник тезисов. – 2021. – Т. 2. – С. 119.
 9. **Prokopenko Yu.**, Karlinsky D., Zinchenko A., Kotelnikova O., Zhigis L., Rumsh L. and Smirnov I. Broad-spectrum vaccine based on meningococcal serine IgA1 protease // 46-th FEBS Congress. Lisbon, 09–14 July 2022. Ссылка: https://2022congress.febs-iubmb-pabmb.org/abstract_preview.aspx?idAbstractEnc=4424170095096098098092424170

По теме диссертации опубликованы следующие статьи и патент:

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 // Биоорганическая 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 // *Биоорганическая 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 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 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
 8. 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).

1. Обзор литературы

1.1. Менингит

Менингит представляет собой острое или хроническое воспаление оболочек головного и спинного мозга [14], вызванное инфекционными возбудителями (вирусами, бактериями, грибами, простейшими) [15] или неинфекционными факторами (прием некоторых лекарств (НПВС, антибиотиков, моноклональных антител), аутоиммунными и онкологическими заболеваниями) [16].

По механизму возникновения менингиты подразделяются на первичные и вторичные. Первичные менингиты развиваются у исходно здоровых людей, в этом случае возбудители инфекции сразу поражают мозговые оболочки. К ним относятся менингококковый, первичный паротитный, энтеровирусные менингиты и другие.

Вторичные менингиты возникают вследствие распространения инфекции в мозговые оболочки из первичных очагов воспаления в организме, таких как синуситы, отиты или мастоидиты, а также в результате открытых черепно-мозговых травм, сопровождающихся ликвореей, или осложнённого течения нейрохирургических вмешательств. К данной группе относятся туберкулёзный, стафилококковый и пневмококковый менингиты, развивающиеся как осложнение локальных или системных инфекционных заболеваний.

Специфический симптомокомплекс заболевания представлен лихорадочным синдромом, некупируемой головной болью, рвотой центрального генеза и менингеальными знаками (преимущественно ригидностью затылочных мышц), нередко сопровождающимися фотофобией. У пациентов младшей возрастной группы наблюдается стертая клиническая картина с преобладанием общих церебральных симптомов: раздражительности, патологической сонливости и отказа от приема пищи. Несвоевременное начало терапии повышает вероятность развития необратимых нейрональных повреждений, проявляющихся в виде глухоты, эпилептиформной активности, гипертензионно-гидроцефального синдрома и олигофрении. Исходом может стать церебральная кома или смерть пациента [17–20].

Инфекционные менингиты по своей этиологии подразделяются на бактериальные, вирусные, грибковые, менингиты, вызванные паразитами (паразитическими червями [21], реже паразитическими амебами [22]), а также смешанной этиологии [15].

Существует четыре главных возбудителя острого бактериального менингита:

- *Neisseria meningitidis* (менингококк);
- *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк);
- *Haemophilus influenzae* (гемофильная палочка);
- *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы В).

Во всем мире более половины всех случаев менингита со смертельным исходом вызваны этими бактериями, которые также вызывают ряд других тяжелых заболеваний, таких как сепсис и пневмонию. Оптимальным и наиболее эффективным методом борьбы с бактериальным менингитом является вакцинация.

К другим, менее распространенным возбудителям менингита относятся другие бактерии, например *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Listeria*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*, некоторые вирусы, например энтеровирусы и вирус паротита, некоторые грибки, особенно *Cryptococcus*, а также паразиты, например амебы [23,24].

1.1.1. Бактериальный менингит

По данным Всемирной Организации Здравоохранения бактериальный менингит входит в перечень заболеваний с высоким показателем смертности (достигает 50% при отсутствии лечения) [15]. Заболевание сложно идентифицируется на ранних стадиях и тяжело поддается лечению. Согласно клиническим данным, приблизительно у 20% пациентов, перенесших бактериальный менингит, развиваются отдалённые осложнения, включающие нейросенсорную тугоухость, эпилептические приступы, парезы конечностей, зрительные и речевые дисфункции, когнитивные нарушения (в частности, расстройства памяти), коммуникативные затруднения, а также рубцовые изменения тканей и постампутационные дефекты в случае менингококкового сепсиса.

Бактериальный менингит имеет полиэтиологичную природу, однако более 90% случаев заболевания обусловлены тремя ключевыми патогенами: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* [25].

Бактериальный менингит представляет собой быстро протекающее, эпидемически и социально опасное заболевание, обладающее тяжелыми симптомами, сопровождающимися множественными неблагоприятными исходами и высокой смертностью. Оперативная медицинская помощь часто затруднена, поскольку до развития синдрома фатального токсического шока часто проходит менее 24 часов с момента появления первых симптомов, причем эти симптомы сходны по своему проявлению с симптомами ОРВИ и других инфекционных заболеваний. До 19% пациентов после выздоровления страдают тяжелыми

отдаленными последствиями: неврологическими заболеваниями, потерей зрения или слуха, судорогами, психическими расстройствами, потерей конечностей [2,26–28].

В зависимости от характера воспаления бактериальные менингиты разделяют на гнойные и серозные. Гнойные бактериальные менингиты – это гетерогенная группа заболеваний, характеризующаяся единством патогенетических механизмов: связанным с развитием системного воспалительного ответа или локального воспалительного процесса в мягких мозговых оболочках, индуцированного различными бактериальными патогенами. Заболевание протекает в острой форме нейроинфекции, ведущими синдромами которой являются оболочечный синдром, внутричерепная гипертензия и общеинфекционный синдром. Данная патология занимает одно из первых мест в структуре инфекционных болезней по показателям летальности и частоте возникновения тяжелых резидуальных последствий, преимущественно в виде стойких двигательных дефектов.

Инициация воспалительного каскада при бактериальном поражении центральной нервной системы связана с действием бактерий и их токсинов на эндотелий микрососудов головного мозга, что стимулирует гиперпродукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, являющихся основными медиаторами остроты и распространенности воспалительных реакций. Одним из критических последствий данного процесса выступает нарастание внутричерепной гипертензии, которая закономерно сопровождается дисциркуляторными нарушениями и угнетением метаболической активности мозга.

Патогенез бактериальных гнойных менингитов представляет собой многоэтапный каскад взаимообусловленных патофизиологических реакций. Первичным звеном выступает преодоление микроорганизмами гематоэнцефалического барьера, чему способствует повышение его проницаемости на фоне системного синдрома высвобождения цитокинов, индуцированного высвобождением бактериальных токсинов. Проникнув в субарахноидальное пространство, бактерии начинают реплицироваться ввиду практически полного отсутствия в цереброспинальной жидкости ключевых факторов противoinфекционной защиты – иммуноглобулинов, компонентов системы комплемента и специфических антител. Развивающийся в центральной нервной системе воспалительный процесс сопровождается нарушением ликвородинамики: дисбаланс между продукцией и резорбцией цереброспинальной жидкости, а также гиперсекреция антидиуретического гормона с развитием гипернатриемии приводят к прогрессирующему нарастанию внутричерепной гипертензии, а также отеку головного мозга. В условиях нарастающей внутричерепной гипертензии и сопутствующих ишемически-гипоксических изменений нервной ткани происходит переключение энергетического метаболизма на анаэробный гликолиз, что клинично-лабораторно манифестирует гипогликемией и лактатацидозом.

Избыточное накопление глутамата, гиперпродукция оксида азота и активных форм кислорода формируют феномен эксайтотоксичности, который индуцирует апоптотическую и некротическую гибель нейронов. Формирующееся в исходе этих процессов паренхиматозное поражение головного мозга является наиболее тяжелым последствием гнойного менингита. Оно клинически проявляется стойкими резидуальными нарушениями в виде двигательных и сенсорных синдромов, а также глубокими расстройствами эмоционально-волевой и интеллектуальной сфер. Бактериальные гнойные менингиты могут иметь как первичное, так и вторичное происхождение. Первичные формы развиваются без предшествующего инфекционного процесса или органической патологии со стороны внутренних органов, тогда как вторичные представляют собой осложнение течения иных инфекционных заболеваний либо воспалительных процессов различной локализации. При первичных бактериальных гнойных менингитах входными воротами инфекции служат слизистые оболочки носоглотки и бронхиального дерева, где возможны колонизация, персистенция и репликация бактериальных возбудителей. Манифестации заболевания нередко предшествуют дентальные вмешательства либо перенесенная вирусная инфекция, выступающие в роли провоцирующих факторов [29].

Типы бактерий, вызывающих бактериальный менингит, различаются в зависимости от возрастной группы инфицированного человека. У детей в возрасте до трех месяцев (в т.ч. у новорожденных) основными возбудителями бактериального менингита являются *Streptococcus agalactiae* (B), *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (серотип IVb) [19,20,30], *Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp. (non B), *Enterobacter* spp. У детей в возрасте от 3-х месяцев до 5 лет наиболее часто менингиты вызывают *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) (в странах, где не проводится плановая иммунизация от гемофильной инфекции). У детей старше 5 лет и взрослых подавляющее число менингитов обусловлены *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus pneumoniae* (серотипы 6, 9, 14, 18 и 23). Риск заражения *Listeria monocytogenes* увеличивается у людей старше 50 лет [18,31]. При вторичных менингитах наиболее часто встречаются *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* [29].

Осложнения после бактериальных гнойных менингитов подразделяются на: интракраниальные (отек головного мозга, синдром неадекватной секреции антидиуретического гормона, субдуральный выпот, гипоталамическая дисфункция, энцефалит, эпендиматит, инфаркт, гидроцефалия, дислокационный синдром, синдромы вклинения) и общеинфекционные (септический шок, ДВС-синдром, синдром полиорганной недостаточности).

Также бактериальные гнойные менингиты классифицируются по характеру течения на: молниеносное, острое (до 4 недель), затяжное (до 3 мес), хроническое (более 3 мес), рецидивирующее и осложнённое. По тяжести течения, заболевания бактериальным гнойным менингитом делятся на средне-тяжёлое, тяжёлое и очень тяжёлое [29].

Рецидивирующее течение бактериального менингита этиологически обусловлено тремя основными группами факторов: персистирующими анатомическими дефектами (врожденного или приобретенного генеза), нарушениями функционирования иммунной системы, а также хроническими инфекционными очагами, локализованными в анатомических структурах, смежных с мозговыми оболочками.

Анатомические дефекты создают патологическое сообщение между внешней средой и центральной нервной системой, служащее входными воротами для возбудителей. Наиболее частой причиной данной группы является травматическое повреждение костей черепа, в особенности переломы, локализующиеся в области основания черепа, либо распространяющиеся на структуру придаточных пазух и пирамиды височных костей.

Согласно имеющимся данным, распределение этиологических факторов в структуре рецидивирующих менингитов выглядит следующим образом: анатомические аномалии составляют около 59% случаев; иммунодефицитные состояния (в частности, дефицит компонентов системы комплемента, создающий высокий риск рецидивов менингококковой этиологии) выявляются в 36% наблюдений; хронические инфекционно-воспалительные процессы в параменингеальных областях (например, хронический отит, синусит) являются причиной рецидивов в 5% случаев [32].

По данным «Глобального исследования бремени болезней» (GBD) 2019 года, в 2019 году во всем мире было зарегистрировано около 2,51 миллиона случаев менингита, а число летальных исходов составило 236 000. Это свидетельствует о значительном прогрессе в борьбе с заболеванием: количество смертей снизилось на 56% по сравнению с 1990 годом, когда регистрировалось 403 000–433 000 смертей. В странах Африки к югу от Сахары, в регионе, известном как «менингитный пояс» (простирается от Сенегала до Эфиопии), сохраняется высокий риск вспышек заболевания. Эпидемический сезон здесь длится с декабря по июнь, что совпадает с сухим и пыльным периодом года (период харматтана), который способствует распространению инфекции. Хотя наиболее крупные эпидемии характерны для «менингитного пояса» Африки, отдельные вспышки и спорадические случаи заболевания регистрируются и в других частях света. В странах Европы, Америки и Австралии основными возбудителями являются серогруппы В, С, W и Y [33,34].

Эпидемиология бактериальных гнойных менингитов характеризуется выраженной географической вариабельностью, обусловленной региональными особенностями, социально-экономическими условиями и уровнем охвата населения специфической иммунопрофилактикой против основных возбудителей. В экономически развитых странах заболеваемость варьирует в диапазоне 2–5 случаев на 100 тыс. населения, тогда как в государствах африканского «менингитного пояса», простирающегося от Сенегала и Гамбии на западе до Эфиопии на востоке, данный показатель достигает 40–100 и более случаев на 100 тыс. населения, что обусловлено высоким риском recurrent epidemics менингококковой инфекции [35,36].

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируется около 2,5 млн случаев бактериального менингита, из которых примерно 240 тыс. заканчиваются летально. При этом каждый шестой заболевший умирает, а каждый пятый из выживших сталкивается с тяжелыми долгосрочными осложнениями, включающими неврологические нарушения, снижение когнитивных функций и дефицит сенсорного восприятия [37].

В Российской Федерации в 2025 году отмечается неблагоприятная эпидемиологическая динамика. С начала года зарегистрировано более 1,2 тыс. случаев менингита, что вдвое превышает показатель за весь 2024 год (600 случаев). Летальность в 2024 году составляет около 16%, причем среди лиц старше 60 лет данный показатель превышает 30% [38]. Согласно данным Минздрава, за первые пять месяцев 2025 года из 1 266 зарегистрированных случаев генерализованных форм менингококковой инфекции (серотипы А, В и С) 948 пришлось на взрослых и лишь 318 – на детей. Детская заболеваемость бактериальным гнойным менингитом в Российской Федерации, по данным предыдущих лет, составляет 4–6 случаев на 100 тыс. детского населения. Однако в 2025 году отмечается снижение доли детей в структуре заболеваемости на фоне увеличения абсолютного числа случаев среди взрослых.

Острый бактериальный менингит

Наиболее распространенными причинами острого бактериального менингита являются *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), группа В *Streptococcus* (GBS) и *Listeria monocytogenes* (таблица 1.1.1.1). Эти организмы вызывали более 80% острых бактериальных менингитов у детей в 1970-х и 1980-х годах. В 1990 году была введена конъюгированная вакцина Hib. Она почти ликвидировала менингит Hib в странах, где она была внедрена, и снизила общую заболеваемость острым бактериальным менингитом на 55%. Внедрение семивалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV7) в 2000 году привело к 59% снижению

показателей пневмококкового менингита у детей младше 2 лет. Благодаря коллективному иммунитету вакцина также защитила неиммунизированных детей и взрослых. С 1998 по 2007 год общая заболеваемость бактериальным менингитом снизилась на 31% с 2,00 случаев на 100 000 населения до 1,38 случаев на 100 000 населения. Однако смертность от бактериального менингита оставалась значительной, а коэффициент летальности не изменился. Кроме того, начали расти показатели пневмококкового менингита от штаммов, не относящихся к серотипу PCV7, включая случаи менингита, вызванного лекарственно-устойчивыми штаммами, такими как серотип 19A. В 2010 году была введена вакцина PCV13 для борьбы с появляющимися инвазивными штаммами пневмококка. В настоящее время *S. pneumoniae* остается наиболее распространенной причиной острого бактериального менингита у детей старше 1 месяца. В развитых странах конъюгированные вакцины снизили заболеваемость бактериальным менингитом во всех возрастных группах, за исключением детей младше 2 месяцев. Успех вакцин сместил средний возраст заболевания менингитом с младше 5 лет до 42 лет. Тем не менее, самая высокая заболеваемость бактериальным менингитом остается среди детей младше 2 месяцев, в первую очередь потому, что патогены, вызывающие менингит у младенцев, отличаются от тех, которые вызывают инфекцию у детей старшего возраста (таблица 1.1.1.1). GBS вызывает от 50% до 60% случаев бактериального менингита среди новорожденных, *Escherichia coli* около 20% случаев и другие грамотрицательные палочки еще 10%. Эти организмы обычно приобретаются из мочеполового тракта матери. С 1996 года практика скрининга матери на GBS и использование интранатальных противомикробных препаратов стали рутинной практикой в развитых странах, что привело к снижению на 86% раннего начала заболевания GBS в Соединенных Штатах. Однако частота позднего начала заболевания не снизилась. Факторы риска острого бактериального менингита у новорожденных и детей старшего возраста приведены в [23].

Таблица 1.1.1.1. Приблизительный процент организмов, вызывающих бактериальный менингит у пациентов разного возраста.

Бактерия	Меньше 1 месяца	От 1 до 3 месяцев	От 3 до 35 месяцев	От 3 до 9 лет	От 10 до 18 лет
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1-4	14	45	47	21
<i>Neisseria meningitidis</i>	1-3	12	34	32	55
<i>Streptococcus</i> группы B	50-60	39	11	5	8
<i>Listeria monocytogenes</i>	2-7	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	20-30	-	-	-	-
Прочие бактерии	4-12	35	10	16	16

1.1.1.1. Менингококковый менингит

Менингококковый менингит является наиболее часто встречающейся формой бактериального менингита [19,20], вызываемого менингококком (*Neisseria meningitidis*) – видом грамотрицательных диплококков рода *Neisseria* [39]. Бактерии *N. meningitidis* обладают высоким разнообразием капсульных антигенных структур, серотипов, делясь на основные серогруппы А, В, С, X, Y, W-135 (Рис. 1.1.1.1.1) и дополнительные 29Е, Н, I, К, L, Z [40,41].

Также менингококки разделяют по антигенам клеточной стенки – на серогруппы. Во время эпидемических вспышек обычно циркулирует менингококки группы А. Основной токсин менингококков – полисахарид клеточной стенки [42].

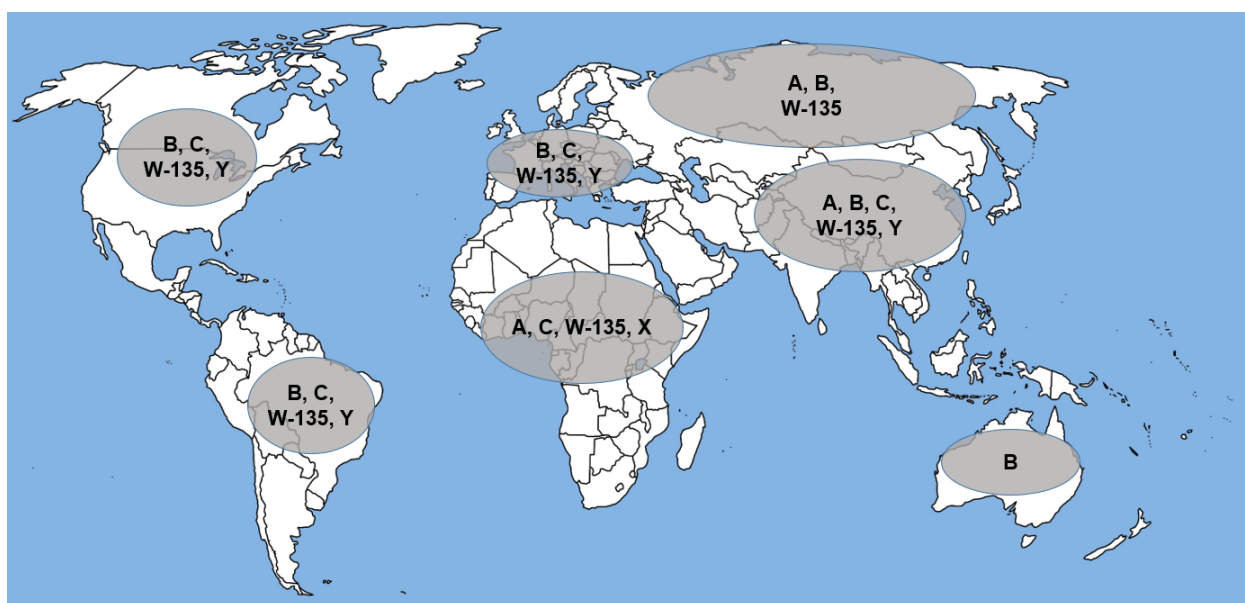


Рисунок 1.1.1.1.1. Карта встречаемости серотипов менингококков по данным ВОЗ на 2019 г. [38,41,43–48].

Острое инфекционное заболевание передается воздушно-капельным путем и сопровождается гнойным воспалением арахноидальной и мягкой оболочек мозга.

Менингококковый менингит относится к антропонозам (группа инфекционных и паразитарных заболеваний, возбудители которых способны паразитировать в естественных условиях только в организме человека и некоторых других высших приматов).

На данный момент менингококк остается наиболее распространенной причиной менингита в мире. Смертность от менингококковой инфекции в развивающихся странах достигает 10-15%. Заболеваемость менингитом в мире определяется в первую очередь эпидемиями в странах «менингитного пояса» [41].

1.1.1.2. Гемофильный менингит

Haemophilus influenzae

Гемофильная палочка (*H. influenzae*) – патогенные грамотрицательные бактерии [39]. На данный момент удалось поделить бактерии на 9 биотипов и на 6 серотипов (a-f). Самый частый возбудитель гемофильной инфекции – *H. influenzae* серотип b (Hib).

Hib вызывает тяжелую инфекцию у детей. Тем не менее в развитых странах мира, благодаря вакцинации, удалось снизить смертность детей от 30% до 5-10%. Однако гемофильная палочка типа b остается основной причиной инфекций нижних дыхательных путей у младенцев и детей в развивающихся странах, где вакцина широко не используется.

Haemophilus influenzae – грамотрицательная, неподвижная, неспорообразующая коккобацилла [49]. Колонизирует верхние дыхательные и мочеполовые пути, является естественной частью микрофлоры носоглотки. Для роста гемофилов требуются факторы, содержащиеся в эритроцитах: гемин (X-фактор) и никотинамидадениндинуклеотид (V-фактор). Некоторые штаммы имеют полисахаридную капсулу, по структурным различиям в которой выделяют 6 серогрупп (A-F). Капсула *H. influenzae* серогруппы A (Hia) представляет собой полимер глюкозы и рибита, соединенных фосфодиэфирными связями, капсула серогруппы B (Hib) – рибитолфосфат полирибозы. Капсула служит физическим барьером, препятствующим связыванию белков комплемента человека с поверхностью бактерии, что можно рассматривать как дополнительный патогенный фактор. Hib является наиболее вирулентной серогруппой из всех, за ней следует Hia, а затем другие. Как и прочие возбудители бактериального менингита, геномы практически всех штаммов *H. influenzae* содержат гены *iga*, кодирующие IgA1-протеазы [50], расщепляющие пептидные Pro-Ser или Pro-Thr связи шарнирного региона молекулы IgA1 человека, что и является важным патогенным фактором бактерии.

В целом *H. influenzae* обладает следующими факторами патогенности:

- Полисахаридная капсула;
- Пили;
- ЛОС и гликопептиды;
- IgA1-протеазы.

Количество больных, зараженных данным возбудителем, сильно варьируется в зависимости от регионов. В общем случае, в развитых странах наблюдается низкая смертность (3-5%), в свою очередь странах Африки высокая (20-30%). Общей тенденцией является то, что наибольшая часть случаев заболевания зафиксирована у маленьких детей до 5 лет, именно для данной категории людей *H. influenzae* является наиболее опасным

возбудителем.

Нетипируемая *H. influenzae* (NTHi) является патобионтом верхних дыхательных путей человека, обычно обнаруживаемым в носоглотке детей и взрослых [51,52]. NTHi часто выделяется у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и является наиболее распространенной бактериальной причиной острых обострений ХОБЛ, которые связаны со значительной заболеваемостью и смертностью [53,54]. Помимо того, что NTHi вызывает обострения, он присутствует в нижних дыхательных путях пациентов во время клинически стабильного состояния. Изменения в экспрессии IgA1-протеазы обусловлены изменениями в геномах во время персистирующей инфекции нетипируемой *H. influenzae* в периоды хронической обструктивной болезни легких [55]. Этот исключительно человеческий патоген развил механизмы и факторы вирулентности для поддержания персистирующей инфекции во враждебной среде нижних дыхательных путей человека в течение месяцев или лет [56]. Для NTHi IgA1-протеаза также является важным фактором вирулентности.

До вакцинации, *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) вызывал тяжелые инфекции у детей в возрасте до 5 лет: от 5 до 46 случаев на 100 000 детей в разных странах Европы и до 200 – в странах Африки. При этом смертность достигала 40%. В 2000 г. во всем мире 8,1 млн детей в возрасте от 0 до 5 лет перенесли гемофильную инфекцию. В 60% был диагностирован менингит, с 363 000 зафиксированных летальных исходов. В зависимости от региона, в России в период с 2005 до 2007 годов было выявлено от 5 до 57% случаев гнойных менингитов, вызванных Hib. При этом, летальность составляла от 5 до 15%. В свою очередь, до 35% переболевших детей имеют поражения центральной нервной системы, до 5–10% – плеврит, до 80% – эпиглоттит [57]. В 1985 году в США была одобрена первая вакцина против Hib. Эта вакцина была выполнена на основе капсульного полисахарида. Однако, эта вакцина оказалась неэффективна у детей младше 18 месяцев. Применение препаратов Пентаксим (Санофи Пастер, Франция) и Инфанрикс-Гекса (Глаксо Смит Кляйн, Бельгия), основанных на конъюгате капсульного полисахарида Hib с анатоксином столбняка, нетоксичным вариантом дифтерийного токсина и белком внешней мембраны менингококка серогруппы В, снижает уровень заболеваемости тяжелыми формами пневмонии в среднем на 20-25% [58]. Недостатком этих препаратов является то, что у 18% вакцинированных развились разнообразные осложнения, а у 33% был низкий уровень защитных антител. Хотя с 2013 года, конъюгированные вакцины начали использовать в 184 странах мира, но, тем не менее, в мире регистрируется до 199 000 смертей в год от Hib, что ставит данный патоген на третье место по летальности после пневмококковой и ротавирусной инфекций. На текущий момент, в реестре

Всемирной Организации Здравоохранения зарегистрированы три вакцины на основе капсульного полисахарида Hib, конъюгированного со столбнячным анатоксином. Это вакцина гемофильная тип В (ФБУН “Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии”, Россия), Акт-Хиб (Санофи Пастер, Франция) и Хиберикс (Глаксо Смит Кляйн, Бельгия) [58]. Для этих вакцин, эффективность варьируется от 95 до 100%, а приемлемый уровень протективных антител сохраняется на срок не менее 4 лет [2].

1.1.1.3. Пневмококковый (стрептококковый) менингит

Streptococcus pneumoniae

Пневмококки – вид условно-патогенных грамположительных бактерий. По антигенным свойствам полисахаридов разделяют 90 серотипов, но вызывают заболевание, в основном, серотипы 6-11 [59].

Streptococcus pneumoniae (пневмококк) является этиологическим агентом широкого спектра заболеваний, включая пневмонию, бактериемию, менингит, а также инфекции верхних дыхательных путей – острый средний отит, мастоидит и синусит. Пневмококк занимает ведущее положение в структуре возбудителей внебольничной пневмонии, бактериального менингита, сепсиса у пациентов после спленэктомии, а также гнойно-воспалительных заболеваний ЛОР-органов. Кроме того, *S. pneumoniae* способен вызывать конъюнктивиты, преимущественно в детской возрастной группе. *S. pneumoniae* представляет собой грамположительные, ланцетовидные кокки, располагающиеся попарно (диплококки) или короткими цепочками. Ланцетовидная морфология подразумевает овоидную форму с заостренными полюсами, что отличает их от типичных сферических кокков. На кровяном агаре колонии пневмококка окружены зоной неполного гемолиза (α -гемолиз). Дифференциально-диагностическими признаками, отличающими *S. pneumoniae* от представителей группы стрептококков *viridans*, являются чувствительность к лизису под действием желчных кислот (дезоксихолата) и подавление роста под влиянием оптохина (этилгидрокупрена гидрохлорида). На сегодняшний день идентифицировано более 85 серотипов *S. pneumoniae*, дифференцируемых по антигенной специфичности полисахаридной капсулы. Капсула является основным фактором вирулентности: она препятствует опсонизации и фагоцитозу, тем самым обуславливая инвазивный потенциал штамма. В присутствии специфических антител к капсульному полисахариду наблюдается феномен набухания капсулы (реакция подавления), используемый для серотипирования. Антитела, вырабатываемые после перенесенной инфекции (в манифестной или субклинической форме) или в ответ на введение

полисахаридной вакцины, обеспечивают опсонизацию и последующую элиминацию возбудителя. Капсульный антиген индуцирует преимущественно тимуснезависимый (Т-независимый) В-клеточный иммунный ответ. Другим важным поверхностным компонентом пневмококка является клеточный стеновой полисахарид, обозначаемый как С-субстанция. Данная структура обладает способностью взаимодействовать с С-реактивным белком (СРБ) – белком острой фазы, синтезируемым гепатоцитами. СРБ относится к β -глобулинам, что отличает его от антител, представляющих собой γ -глобулины. Концентрация СРБ в плазме при остром воспалительном процессе может возрасти в сотни и тысячи раз. В лабораторной диагностике определение уровня СРБ основано на его способности вступать в реакцию с С-полисахаридом *S. pneumoniae*. Важно подчеркнуть, что СРБ является неспецифическим маркером воспаления: его уровень повышается при инфекциях различной этиологии, а не только при пневмококковых. В клинической практике уровень СРБ рассматривается как более чувствительный индикатор кардиоваскулярного риска по сравнению с традиционным определением холестерина [60].

Ведущим фактором вирулентности *S. pneumoniae* является полисахаридная капсула, которая обуславливает инвазивность возбудителя за счет подавления фагоцитоза. Протективный иммунитет при пневмококковой инфекции носит преимущественно антикапсульный характер: специфические антитела, направленные против капсульных антигенов, обеспечивают опсонизацию и последующую элиминацию микроорганизма. Среди других структур, участвующих в патогенезе, также ключевая роль принадлежит липотейхоевой кислоте – компоненту клеточной стенки, который активирует систему комплемента по альтернативному пути и стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов. Данный механизм лежит в основе развития системного воспалительного ответа и, у пациентов с иммунодефицитными состояниями, может инициировать каскад реакций, приводящих к клинической картине септического шока. Дополнительным фактором вирулентности является пневмолизин – цитолитический токсин, обладающий гемолитической активностью и ответственный за формирование зоны α -гемолиза на кровяном агаре. Пневмолизин участвует в повреждении клеток хозяина, модуляции иммунного ответа и способствует проникновению возбудителя в глубже лежащие ткани. Важную роль в колонизации верхних дыхательных путей играет IgA1-протеаза – фермент, расщепляющий секреторный иммуноглобулин А (sIgA) в шарнирной области, что позволяет микроорганизму преодолевать мукозальный барьер и персистировать на поверхности слизистых оболочек [60].

Патогенез воспалительного процесса. После адгезии и инвазии возбудитель активно

размножается в тканях, инициируя локальную воспалительную реакцию. При проникновении в альвеолярное пространство развивается экссудативная фаза воспаления, характеризующаяся пропотеванием богатого белком экссудата, миграцией эритроцитов вследствие повышения сосудистой проницаемости и массивной инфильтрацией нейтрофилами. Совокупность этих процессов приводит к уплотнению легочной паренхимы (консолидации), клинически соответствующей стадии опеченения при крупозной пневмонии. На этапе реконвалесценции ключевую роль играют механизмы элиминации возбудителя и репарации тканей. Пневмококки подвергаются фагоцитозу преимущественно альвеолярными макрофагами и нейтрофилами. Мононуклеарные фагоциты (макрофаги) осуществляют клиренс клеточного детрита и остаточных структур микроорганизма, что способствует рассасыванию экссудата и восстановлению нормальной архитектоники легочной ткани [60].

Несмотря на более легкую форму протекания болезни, вызванную *S. pneumoniae*, число летальных исходов превышает аналогичные у других возбудителей. Зачастую, менингит подобного происхождения сопровождается очаговыми неврологическими признаками, особенно параличом черепных нервов. Помимо перечисленных выше общих групп, в зону риска пневмококкового менингита входят обладатели кохлеарных имплантатов, люди, получившие свежие травмы (дорожно-транспортные происшествия и т.д.). К факторам, располагающим к заболеванию также относят: иммуносупрессию, алкоголизм и хроническое заболевание легких. Данный вид менингита может последовать за любым нарушением целостности субарахноидального пространства, а главными путями распространения возбудителя в организме помимо крови могут служить непосредственно соседние ткани (инфицированные околоносовые пазухи, среднее ухо, легкие). Вызывает опасения рост резистентности *S. pneumoniae* к антибиотикам, так, на данный момент, процент бактерий, резистентных к пенициллину составляет 25-60%.

У человека, заболевания, вызываемые этим возбудителем, являются одними из самых распространенных в мире. Ежегодно от них умирает более миллиона человек, и более половины из них – это дети младше 5 лет. В России наблюдаемая статистика заболеваний для невакцинированного населения составляет около 300–700 случаев инфицирования на 100 000 населения. Схожие данные представлены в качестве результатов исследований за рубежом [61–63]. Среди бактериальных менингитов пневмококковый менингит характеризуется особой тяжестью протекания [57].

Для защиты от пневмококковой инфекции рекомендуются 4 вакцины: 3 конъюгированные PCV21 (CAPVAXIVE™), PCV20 (Pevnar20®) и PCV15 (Vaxneuvance®) и 1 полисахаридная PPSV23 (Pneumovax 23®) [64].

К недостаткам этих препаратов можно отнести потерю их защитных качеств из-за изменчивости пневмококков, вызванной пластичностью генома и изменчивости серотипа в целом. С другой стороны, бактерия *Streptococcus pneumoniae* характеризуется высокой способностью к приобретению антибиотикорезистивности, эти причины побуждают мировое сообщество вести исследования целью которых является создание вакцин способных защитить сразу от многих серотипов пневмококка [65,66].

Появление новых антибиотиков и вакцин не устранило проблему в полном объеме, и на текущий момент во всем мире у детей раннего возраста, пожилых людей и людей с ослабленной иммунной системой, пневмококки продолжают выступать в качестве возбудителей заболеваний. Этим обусловлена необходимость разработки новых вакцин. В частности, следует стремиться к замене многочисленных вакцин узкого спектра действия на меньшее количество поливалентных вакцин, способных обеспечивать универсальную защиту сразу от нескольких инфекционных агентов.

1.1.1.4. Прочие бактериальные менингиты

- Туберкулезный менингит
- Стафилококковый менингит
- Сифилитический асептический менингит
- Бруцеллезный менингит
- Лептоспирозный менингит
- Листерийный менингит
- Эшерихиозный менингит
- Клебсиеллезный менингит
- Протейный менингит
- Сальмонеллезный менингит
- Синегнойный менингит

Травма головы потенциально позволяет бактериям из полости носа проникать в менингеальное пространство. Аналогичным образом, устройства в мозге и мозговых оболочках, такие как церебральные шунты, экстравентрикулярные дренажи или резервуары Оммаи, несут повышенный риск менингита. В этих случаях люди с большей вероятностью будут инфицированы стафилококками, псевдомонадами и другими грамотрицательными бактериями [31]. Эти патогены также связаны с менингитом у людей с ослабленной иммунной системой [17]. Инфекция в области головы и шеи, такая как средний отит или

мастоидит , может привести к менингиту у небольшой доли людей [31].

В редких случаях *Enterococcus* spp. может быть причиной менингита, как внебольничного, так и внутрибольничного, обычно как вторичного результата травмы или хирургического вмешательства, или из-за кишечных заболеваний (например, стронгилоидоза) [67].

Туберкулезный менингит, вызываемый *Mycobacterium tuberculosis*, чаще встречается у людей из стран, в которых туберкулез является эндемичным, но также встречается у людей с проблемами иммунной системы, такими как СПИД [68].

1.1.2. Вирусный менингит

Вирусный менингит – это воспаление мягкой мозговой оболочки (лептоменингит), вызванное вирусной инфекцией. В клинической практике этот термин часто используется как синоним асептического менингита, хотя последний представляет собой более широкое понятие, включающее также неинфекционные причины (лекарственные реакции, системные заболевания), грибковые инфекции и, в редких случаях, другие микроорганизмы (например, *Borrelia burgdorferi* при болезни Лайма).

Ключевое патоморфологическое отличие вирусного менингита от бактериального заключается в том, что паренхима головного мозга обычно не поражается – поражение паренхимы характерно для вирусного энцефалита или менингоэнцефалита. Это объясняет, почему при изолированном вирусном менингите отсутствуют очаговые неврологические нарушения, судороги, делирий и спутанность сознания.

В большинстве случаев инфекционный процесс вызывается энтеровирусами [69–71] (в частности вирусами Коксаки и ЕСНО [72]), однако другие вирусы, такие как вирус простого герпеса (обычно 2-ого типа, реже 1-ого типа) [73], вирус ветряной оспы, вирус эпидемического паротита, ВИЧ, LCMV [70], арбовирусы (приобретенные от комара или другого насекомого) и вирус гриппа [74] также могут вызвать вирусный менингит.

На основании клинических симптомов вирусный менингит невозможно достоверно отличить от бактериального менингита, хотя вирусный менингит обычно протекает более благоприятно. При вирусном менингите в спинномозговой жидкости (СМЖ) не обнаруживаются бактерии. Поэтому для выявления заболевания часто требуется люмбальная пункция с анализом СМЖ [74,75].

1.1.3. Грибковый менингит

Грибковый (микотический) менингит – это воспаление мозговых оболочек,

вызванное грибковой инфекцией. В отличие от бактериального или вирусного менингита, эта форма характеризуется подострым или хроническим течением, слабой выраженностью классических менингеальных симптомов и поражает преимущественно иммунокомпromетированных пациентов. Среди больных СПИДом криптококковый менингит диагностируется в 6–13% случаев, а в эндемичных регионах диссеминация грибковой инфекции в 35% случаев сопровождается поражением мозговых оболочек

Причинами менингитов также могут выступать грибковые агенты. Наиболее частой формой грибкового менингита является криптококковый менингит, этиологическим фактором которого выступает *Cryptococcus neoformans*. К числу менее распространённых возбудителей относятся *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* и представители рода *Candida*. Развитию грибкового менингита способствуют определённые факторы риска, среди которых – терапия иммунодепрессантами (в частности, у реципиентов трансплантированных органов), ВИЧ-инфекция/СПИД, а также возрастное ослабление иммунитета. У лиц с сохранённой иммунной функцией данная патология встречается редко, однако возможна при использовании инъекционных препаратов, контаминированных грибковой микрофлорой. Клиническая манифестация грибкового менингита характеризуется постепенным началом. На момент постановки диагноза у пациентов, как правило, не менее нескольких недель отмечаются такие симптомы, как головная боль и лихорадка [76–80].

1.1.4. Паразитический менингит

Паразитический менингит – это воспаление мозговых оболочек, вызванное паразитическими организмами, включая простейших (протозоа) и гельминтов (паразитических червей). В отличие от бактериального или вирусного менингита, паразитарные формы встречаются реже, но характеризуются высокой летальностью и сложностью диагностики. Наиболее клинически значимой формой является эозинофильный менингит – состояние, при котором в спинномозговой жидкости (ликворе) наблюдается выраженное повышение количества эозинофилов, что служит ключевым диагностическим признаком паразитарной этиологии.

Наиболее распространёнными паразитами, вызывающими заболевание, являются *Angiostrongylus cantonensis*, *Gnathostoma spinigerum*, *Schistosoma*, а также цистицеркоз, токсокароз, байлисаскаридоз, парагонимоз и ряд более редких инфекций и неинфекционных состояний [81].

В редких случаях свободноживущие паразитические амёбы могут вызывать

неглерия, также называемый амёбным менингитом [22], тип менингоэнцефалита, при котором поражаются не только мозговые оболочки, но и мозговая ткань.

1.2. Менингококк (*Neisseria meningitidis*)

1.2.1. Общие сведения

Клинические описания менингита появились еще в 1880-х годах [82]. Первые данные о возбудителе, выделенном из спинномозговой жидкости больного, были опубликованы в 1884 г. в статье Marchiafava и Celli. Эта бактериальная культура была идентифицирована и описана спустя три года в работе Weichselbaum. Возбудитель заболевания, микроорганизм *Neisseria meningitidis*, преодолевая эпителиальный барьер носоглотки, попадает в кровоток, что приводит к системному заболеванию и может вызвать сепсис, а проникая через гематоэнцефалический барьер – приводит к токсическому отеку головного мозга – менингиту [2,83–85].

Менингококковой инфекцией называют острое инфекционное заболевание, вызываемое бактерией *N. meningitidis* (также называемой менингококком), протекающее с разнообразными клиническими проявлениями – от локализованных форм (бессимптомного носительства и назофарингита) до генерализованных форм (гнойного менингита, менингоэнцефалита и менингококцемии с поражением различных органов и систем). Являясь одной из наиболее распространенных причин бактериального менингита и сепсиса во многих регионах, *N. meningitidis* также может вызывать пневмонию и очаговые заболевания, такие как септический артрит, миокардит, иридоциклит. Известно, что это единственная бактерия, вызывающая крупные вспышки заболевания, в том числе в США [2,66,86–88].

Менингококковая инфекция встречается во всём мире в любое время года, однако чаще всего заболевают в конце зимы и начале весны, показатели заболеваемости варьируются в зависимости от серологической группы и региона. Уровень заболеваемости менингококковой инфекцией в 2020-2024 гг. по данным ВОЗ приведён в таблице 1.2.1.1.

Таблица 1.2.1.1. Уровень заболеваемости (зарегистрированные случаи) инвазивной менингококковой инфекцией, на 1 000 000 населения [89].

Регион	2024	2023	2022	2021	2020
Африка	19,8	2,6	26,6	58,1	40
Восточно-Средиземноморский регион	1	0,4	2,4	1,9	3,7
Европа	5,1	4,1	2,8	1,5	2,5
Америка	2,4	1,6	0,9	0,6	0,9
Юго-Восточная Азия	0,5	0,4	0,1	0,3	0

Западно-Тихоокеанский регион	0,2	0,3	0,2	0,2	0,5
------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----

Как правило, менингококки передаются от человека к человеку воздушно-капельным путём или через выделения из дыхательных путей как от людей с бессимптомным носительством, так и от людей с менингококковой инфекцией. Бактерии прикрепляются к клеткам слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки и размножаются в них, а у небольшой части людей (менее 1%) проникают в клетки слизистой оболочки и попадают в кровоток. Затем бактерии могут распространяться по крови, вызывая системное заболевание или сепсис [90], и проникать через гематоэнцефалический барьер в спинномозговую жидкость (СМЖ), вызывая менингит. Люди являются единственным естественным резервуаром менингококка. Считается, что это является результатом неспособности бактерии получать железо из других источников, кроме человеческого трансферрина и лактоферрина [91]. Менингококк может быть частью нормальной непатогенной флоры в носоглотке 8–25% взрослых [92], не вызывая заболеваний, и в меньшей степени его можно встретить в урогенитальном тракте и анальном канале [93]. Лишь у немногих людей развивается заболевание, которое может быть связано с генетическими, иммунными, социальными или физическими факторами. В окружающей среде менингококк неустойчив и быстро погибает вне организма человека.

Менингококковая инфекция может возникнуть в любом возрасте, однако чаще всего она встречается у младенцев и детей в возрасте до пяти лет. Подростки и молодые люди в возрасте 15–24 лет, контактировавшие с человеком, перенесшим эту болезнь, люди с ослабленным иммунитетом и те, кто путешествует по регионам мира, где распространена менингококковая инфекция, также подвержены повышенному риску заражения.

Симптомы схожи с симптомами других форм бактериального менингита и обычно включают высокую температуру, головную боль, рвоту, ригидность затылочных мышц и сыпь. Также могут наблюдаться чувствительность к свету, сонливость и спутанность сознания. Симптомы могут проявиться в период от 2 до 10 дней после заражения, но обычно в течение 3–4 дней. Заболевание может прогрессировать в тяжёлой форме, приводя к необратимому повреждению головного мозга, потере слуха, почечной недостаточности, потере рук или ног, или хроническим проблемам с нервной системой. Уровень смертности среди тех, у кого развивается менингококковая инфекция, составляет 10–15% в развитых странах и достигает 20% в развивающихся странах [82,94,95] даже при своевременном медицинском вмешательстве и может быть выше у людей с менингококцемией. Менингококковая инфекция может иметь долгосрочные последствия для организма, такие как потеря конечностей или повреждение головного мозга. Она также может привести к летальному исходу. Переболевшие могут столкнуться с различными последствиями, включая потерю слуха, слабость конечностей, проблемы со зрением и общением, судороги,

а также проблемы с памятью и речью [96].

Neisseria meningitidis (менингококк) – вид грамотрицательных бета-протеобактерий рода *Neisseria*, относящийся к диплококкам, размером 0,6-1,0 мкм, обладает хорошо выраженной полисахаридной капсулой, усиливающей его вирулентность за счет антифагоцитарного действия) [60,97]. Менингококк – облигатный аэроб, неподвижный, не имеет жгутиков, не образует спор, показывает положительный результат теста на фермент цитохром с оксидазой [98]. Он является аэробной грамотрицательной бактерией, близкородственной *N. gonorrhoeae* и несколькими типично непатогенными видами *Neisseria*, такими как *N. lactamica*. Менингококк считается прихотливым организмом, которому требуются определенная температура и углекислый газ, и лучше всего растет на шоколадном или кровяном агаре. Все виды *Neisseria* (включая *N. gonorrhoeae*) являются каталазо- и оксидазоположительными, хотя отдельные виды можно дифференцировать на основе биохимических свойств. Например, *N. meningitidis* может вырабатывать кислоту из глюкозы и мальтозы, но *N. gonorrhoeae* не способна метаболизировать мальтозу [85]. Эндотоксин *N. meningitidis* представлен липополисахаридом (ЛПС), похожим на имеющиеся у многих грамотрицательных палочек, но эндотоксин *N. gonorrhoeae* представлен липоолигосахаридом (ЛОС). Как ЛПС, так и ЛОС содержат липид А, но у ЛОС отсутствуют длинные повторяющиеся боковые цепочки, имеющиеся у ЛПС [60].

Белки внешней мембраны и полисахаридная капсула менингококка составляют основные поверхностные антигены организма. В зависимости от антигенных и химических свойств капсульного полисахарида, *N. meningitidis* подразделяют на 12, а по некоторым данным 13 серологических групп (А, В, С, D, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z, 29E) [60,85] из которых наиболее патогенными являются шесть: А, В, С, W-135, X и Y. Внутри каждой группы подтипы и генотипы различаются по своей вирулентности и тяжести заболевания, которое они вызывают [85]. Относительная значимость каждой серологической группы зависит от таких факторов, как географическое положение и возраст пациента. Некоторые штаммы не относятся к определенным группам и не образуют капсулу; эти штаммы чаще всего ассоциируются с бессимптомным носительством в носоглотке, а не с инвазивным заболеванием.

В различных регионах мира преобладают некоторые представители патогенных серогрупп, так, например, на Африканском континенте широко распространены серогруппы А (MenA), X(MenX), W(MenW), в странах юго-восточной Азии господствует MenX, группы В (MenB), С (MenC) и Y (MenY) закрепились в Европе и Северной Америке. Менингококк серогруппы W ответственен за эпидемии в Южной Америке [99].

1.2.2. Патогенность и вирулентность

Менингококк использует различные факторы вирулентности для облегчения своего выживания в хозяине.

Основным фактором патогенности *N. meningitidis* является полисахаридная капсула, окружающая внешнюю мембрану бактерии, которая позволяет патогену избегать фагоцитоза, комплемент-опосредованного лизиса [100,101]. С другой стороны, капсула препятствует адгезии бактерий к эпителиальным клеткам носоглотки, нарушая связывание адгезинов менингококка с рецепторами клеток организма. Однако, если *N. meningitidis* удается закрепиться в носоглотке, то она существует в виде микроколоний, напоминающих структуры биопленки [102–104]. Подобная структура *N. meningitidis* обеспечивает нишу, в которой клетки становятся более устойчивыми к антибактериальным агентам (антителам, антибиотикам) и другим защитным механизмам организма-хозяина. Инкапсулированные менингококки не могут генерировать биопленки на абиотических поверхностях [105].

Пили типа 4 (Т4Р) также являются фактором патогенности, необходимым для адгезии менингококка к слизистым мембранам носоглотки во время колонизации и взаимодействия с эндотелиальными клетками головного мозга для проникновения в мозговые оболочки [104,106]. Адгезии и колонизации менингококка также способствуют поверхностные белки опалесценции [85].

К другим факторами патогенности относятся гиалуронидазы и нейраминидазы и ЛОС во внешней мембранной стенке клеточной оболочки [106]. ЛОС аналогичен по своей функции липополисахаридному эндотоксину в других грамотрицательных бактериях, но не имеет О-антигенных повторов. Высвобождение эндотоксина ЛОС запускает воспалительный каскад, который вызывает признаки септического шока, наблюдаемые у пациентов с менингококкемией. Более высокие концентрации менингококкового ЛОС обнаруживаются при тяжелой менингококковой инфекции и коррелируют со смертностью [85].

Ещё одним из важнейших факторов вирулентности является специфическая сериновая IgA1-протеаза, расщепляющая как сывороточный, так и секреторный иммуноглобулины А типа 1 человека.

Слизистые оболочки хозяина, где колонизируются менингококки, содержат большое количество секреторного IgA, ограничивающего и устраняющего инфекционные агенты, выступая в качестве первой линии защиты организма. Специфические антитела IgA могут нейтрализовать и агглютинировать патогены, а также вызывать опсонофагоцитоз и респираторный взрыв полиморфноядерных нейтрофилов (ПМН) [107,108]. В 1975 году

было впервые описано, что менингококковый внеклеточный фермент, позже названный IgA1-протеазой (IgA1-специфической сериновой протеазой, IgA1P), способен разрушать человеческий IgA1 в шарнирной области, что защищает бактерии от действия Ig [106,109].

Важным условием колонизации для менингококка является продуцирование аутотранспортёров, участвующих в аутоагрегации. Среди 8 различных аутотранспортёров, именно IgA1-протеаза является еще одним важным фактором, обуславливающим патогенность бактерии. Экспериментально доказано наличие IgA1-протеаз в крови, цереброспинальной жидкости больных, инфицированных менингококком [110].

Поскольку менингококк обладает потенциалом быстро вызывать эпидемию, разработка стратегий профилактики против этого патогена важна для глобального общественного здравоохранения.

1.3. IgA1-протеазы

1.3.1. Общие сведения

Бактериальные IgA1-протеазы представляют собой группу протеолитических ферментов, способных к расщеплению сывороточного (IgA1) и в меньшей степени – димерного секреторного (sIgA1) иммуноглобулинов A1 человека и высших приматов. Было обнаружено, что IgA1-протеазу продуцируют несколько видов патогенных бактерий, включая *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis*. Было обнаружено, что эта группа протеолитических ферментов расщепляет специфические пролин-сериновые и пролин-треониновые пептидные связи в шарнирной области человеческого IgA1. Бактерии, заселяя слизистую оболочку, разрушают sIgA1, который присутствует на слизистой оболочке в значительном количестве и служит первым барьером защиты организма от инфекций. IgA1-протеазы являются важным фактором вирулентности, влияющим на колонизацию и инфицирование организма бактериями на слизистых оболочках [111]. Кроме того, разрушение sIgA1 «открывает ворота» в организм человека и для прочих инфекционных агентов. Нейтрализация IgA1-протеазы на этой стадии инвазии может стать препятствием для развития инфекции, так как затрудняет адгезию бактерий.

IgA1-протеазы классифицируются как сериновые, цистеиновые и металлозависимые, однако только для сериновых (Е.С. 3.4.21.72) и металлозависимых (Е.С. 3.4.24.13) были проведены биоинформатическая аннотация, присвоение соответствующих индексов семейств ферментов и структурная характеристика [112].

Металло-зависимые IgA1-протеазы относятся к семейству пептидаз M26 (по базе данных MEROPS) и группе MA(E). Наиболее изученными представителями являются:

- IgA1-протеаза *Streptococcus pneumoniae* (главный возбудитель пневмонии, менингита).
- IgA1-протеаза *Streptococcus sanguinis* (комменсал полости рта, связанный с эндокардитом).
- IgA1-протеаза *Gemella haemolysans* (оппортунистический патоген, вызывающий менингит и эндокардит у пожилых).

Интересно, что филогенетический анализ и сохранность структуры оперона указывают на то, что ген *iga*, кодирующий эти протеазы, был передан горизонтально от стрептококков к *G. haemolysans* в процессе эволюции. Существует также отдельное семейство M64, представленное, например, IgA-пептидазой *Clostridium ramosum*. Ключевое отличие M64 в том, что она расщепляет не только IgA1, но и подтип IgA2 (по сайту Val-Pro-Cys-Pro), в то время как ферменты семейства M26 строго специфичны к IgA1 [113–116].

Эти ферменты являются цинк-зависимыми металлопротеазами, то есть для каталитической активности им необходим ион цинка (Zn^{2+}) в активном центре.

Субстратная специфичность

Они обладают уникальной и крайне высокой специфичностью, не имея известных мишеней, кроме IgA1 человека. Фермент распознаёт и гидролизует пептидную связь Pro-|-Thr (в некоторых случаях Pro-|-Ser) в шарнирной области тяжёлой цепи иммуноглобулина. Интересно, что подтип IgA2 не расщепляется, так как имеет делецию в этой области.

Активный центр содержит консервативную аминокислотную последовательность HEXXH (например, HEMTH). Два гистидина (His) из этого мотива служат лигандами для связывания каталитического иона цинка. Третий лиганд цинка – глутаминовая кислота (Glu), расположенная С-концевой части от мотива. Глутаминовая кислота внутри мотива (HEEXXH) активирует молекулу воды, которая и осуществляет нуклеофильную атаку на пептидную связь субстрата.

Это очень крупные белки (около 200 кДа). Исследования с помощью криоэлектронной микроскопии (cryo-EM) выявили у них сложное доменное строение:

LPXTG-мотив: N-концевой сигнал для закрепления белка в клеточной стенке грамположительных бактерий с помощью сортазы.

G5-домен: предположительно участвует в адгезии к клеткам хозяина.

M26-протеазный домен: собственно каталитическая часть, которая в свою очередь делится на N-концевой (NTD), средний (MD) и C-концевой (CTD) домены (см. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q59947/>, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q54875/>) [114,115,117,118].

Долгое время механизм распознавания субстрата этими гигантскими молекулами оставался загадкой. В 2020–2022 годах с помощью крио-ЭМ были получены структуры фермента в комплексе с субстратом, что пролило свет на этот процесс.

Был открыт механизм, названный «индуцированным затвором» (induced-fit gating mechanism). Свободное состояние («Закрыт» или «Открыт частично»): у разных видов исходное положение «затвора» (который представляет собой подвижный домен NTD2) отличается. У *S. pneumoniae* в отсутствие субстрата он находится в «закрытом» положении, тогда как у *G. haemolysans* — в более открытом. Связывание субстрата («Открытие»): при связывании шарнирной области IgA1 происходит конформационный сдвиг. NTD2-домен смещается на расстояние до 10 Åнгрстрем (нанометров), открывая доступ субстрату к активному центру. Расщепление: после того как субстрат занял правильное положение, происходит гидролиз.

Хотя исходное состояние ферментов разных бактерий может различаться, конечный механизм «открытия» ворот при контакте с мишенью является консервативным для всего семейства грамположительных металло-зависимых IgA1-протеаз [115,119–122].

Напротив, сериновые IgA1-протеазы представляют собой фактор вирулентности, продуцируемый преимущественно грамотрицательными патогенами, колонизирующими слизистые оболочки человека, такими как *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Haemophilus influenzae* [123]. В отличие от металлопротеаз семейства M26, характерных для грамположительных бактерий, сериновые IgA1-протеазы секретируются в растворимой форме и относятся к семейству S6 по классификации MEROPS [114,117,124].

Генетическая организация

Генетическая организация синтеза сериновых IgA1-протеаз – это прекрасный пример бактериальной эволюционной адаптации. У разных видов бактерий эти гены имеют уникальные особенности, определяющие их распространение, регуляцию и роль в патогенности.

У патогенных нейссерий (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*) ген *iga* встроен в консервативный участок хромосомы, расположенный между генами *comA* и *trpB*. Примечательно, что транскрипция *iga* и соседних генов организована в виде дивергентных единиц: гены *comL* и *comA* транскрибируются в одном направлении, тогда как гены *iga*, *trpB* и *ksgA* – в противоположном. В областях терминаторов этих транскрипционных единиц

была обнаружена последовательность, отвечающая за поглощение ДНК (DUS – DNA Uptake Sequence), которая критически важна для естественной трансформации у нейссерий. Это напрямую указывает на механизм горизонтального переноса *iga* [125].

Ген *iga* является отличительной чертой патогенных нейссерий. Исследования показывают, что общий предок *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis* приобрел этот ген, после чего он был сохранен в процессе эволюции. У близкородственных комменсальных (непатогенных) видов, таких как *N. lactamica*, ген *iga* отсутствует, а на его месте обнаружена короткая последовательность из 13 пар оснований. Существуют также доказательства того, что некоторые виды *H. influenzae* приобрели второй ген *igaB* путем горизонтального переноса от *N. meningitidis*. Этот процесс сопровождается крупной (~20 т.п.н.) инверсией в геноме [50,125].

В отличие от нейссерий, у которых обычно присутствует одна копия *iga*, у *H. influenzae* встречаются как однокопийные, так и многокопийные варианты. Некоторые штаммы непитуемой *H. influenzae* могут нести два гена: *iga* и *igaB* [50]. Исследования с использованием Southern-блоттинга показали, что множественные копии *iga* (например, у штаммов серотипа f) коррелируют с продукцией разных типов протеаз (тип 1 и тип 2), что расширяет спектр возможностей бактерии по расщеплению иммуноглобулинов [126].

Ген *iga* демонстрирует высокий уровень полиморфизма, который лежит в основе классификации протеаз на типы 1 и 2, различающиеся по сайту расщепления IgA1. Напротив, у *Neisseria gonorrhoeae* гены, кодирующие протеазу 1 типа (*iga1*), генетически мономорфны – их рестрикционные карты идентичны у разных штаммов. Напротив, гены протеазы 2 типа (*iga2*) демонстрируют значительный полиморфизм, проявляющийся в вариативности сайтов рестрикции [127].

Генетическое разнообразие *iga* усиливается за счет горизонтального переноса и рекомбинации между разными штаммами. Это приводит к образованию мозаичных генов, состоящих из фрагментов, гомологичных различным аллелям. У *H. influenzae* полиморфизм может затрагивать не только каталитический центр, но и удаленные от активного сайта участки «пассажирского» домена, которые, как было показано, влияют на общую стабильность и активность фермента [128,129].

Ген *iga*, кодирующий сериновую IgA1-протеазу в виде белка-предшественника массой 169 кДа, локализован в хромосоме бактерии. У некоторых штаммов *H. influenzae* обнаружены множественные копии генов (*igaA1*, *igaA2*, *igaB1*, *igaB2*), что обеспечивает вариативность экспрессии и, предположительно, адаптацию к различным условиям персистенции в организме хозяина. Экспрессия может динамически регулироваться: например, изменение экспрессии гена *igaB2* у нетипируемых *H. influenzae* происходит

посредством slipped-strand mispairing (сдвига рамки считывания при репликации) в мононуклеотидных повторах [130,131].

Секреция через систему автотранспортера V типа

Продукция сериновой IgA1-протеазы представляет собой сложный многостадийный процесс, включающий синтез длинного белкового предшественника, его транслокацию через две мембраны грамотрицательной бактерии посредством автотранспортерного механизма и последующее аутокаталитическое отщепление. Этот путь обеспечивает эффективную секрецию активной протеазы во внеклеточную среду, где она может расщеплять IgA1 и другие субстраты, способствуя уклонению бактерий от иммунного ответа хозяина.

IgA1-протеазы семейства S6 относятся к автотранспортерам V типа (Type V secretion system). Это означает, что белок самостоятельно опосредует свой транспорт через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий. Процесс включает следующие этапы:

Транслокация через внутреннюю мембрану: белок-предшественник транспортируется через цитоплазматическую мембрану посредством Sec-транслокона в развернутом виде.

Периплазматический промежуточный этап: в периплазме белок существует в развернутом или частично свернутом состоянии. Важно отметить, что образование дисульфидных связей в пассажирском домене под действием периплазматической оксидоредуктазы DsbA может блокировать дальнейшую транслокацию. Это подтверждает необходимость поддержания неструктурированной конформации пассажирского домена на данном этапе.

Интеграция β -домена во внешнюю мембрану: С-концевой β -домен встраивается во внешнюю мембрану, формируя β -баррель, который служит транспортным каналом.

Транслокация пассажирского домена: α -домен (зрелая протеаза) проходит через сформированный β -баррель и экспонируется на поверхности бактериальной клетки.

Протеолитическое отщепление: после выхода пассажирского домена на поверхность часто происходит его аутокаталитическое отщепление от β -домена, в результате чего зрелая протеаза высвобождается во внеклеточную среду. У *Neisseriae* протеаза секретируется в растворимой форме, что отличает их от грамположительных металлопротеаз, которые остаются ассоциированными с клеточной стенкой [114,117,124,132–135].

Сериновые IgA1-протеазы грамотрицательных бактерий относятся к автотранспортерам и экспрессируются в виде полноразмерных предшественников, содержащих три структурно-функциональных домена: N-концевой сигнальный пептид, пассажирский домен и С-концевой транслокаторный домен (TD) [130,136,137] (Рис. 1.3.1).

Пассажирский домен IgA1-протеазы, расположенный между сигнальным пептидом и транслокаторным доменом, структурно организован в два субдомена – N-концевого каталитического и C-концевого α -пептида, связанных между собой γ -пептидом. Транслокаторный домен состоит из N-концевого линкерного пептида и C-концевого β -кора.

Сигнальный пептид направляет его к внутренней мембране бактерии для транспорта белка в периплазматическое пространство, после чего он отщепляется и остаётся во внутренней мембране. TD формирует во внешней мембране канал, через который пассажирский домен переносится во внеклеточное пространство.

На внешней мембране бактерии IgA1-протеаза способна к аутокаталитическому процессингу в специфических сайтах расщепления (PAPSP, PPSP, PPAР). Эти сайты локализованы на границах между протеазным доменом и γ -пептидом, γ -пептидом и α -пептидом, а также α -пептидом и линкерным пептидом. В отдельных случаях весь пассажирский домен, совместно с линкерным пептидом, может отщепляться с помощью протеазы NalP (Рис. 1.3.1) [137,138].

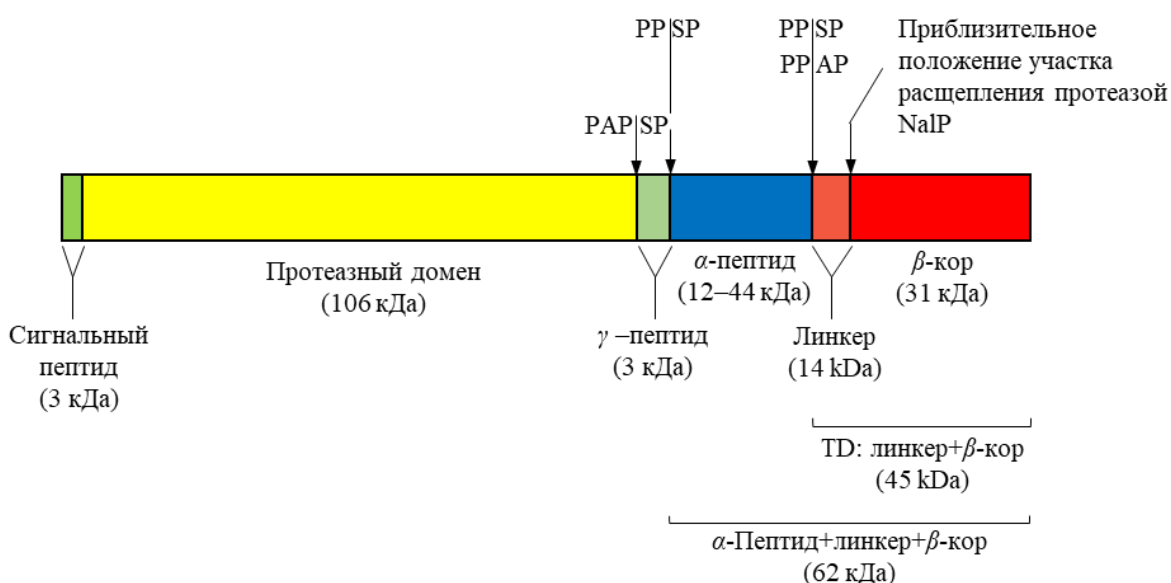


Рисунок 1.3.1. Доменная организация полноразмерной менингококковой IgA1-протеазы.

IgA1-протеаза катализирует сайт-специфичный протеолиз человеческого иммуноглобулина A1. Локализация гидролиза – последовательность TPPTSPSTPPTSPS в шарнирной области, гомологичная известным сайтам аутокаталитического процессинга, что обеспечивает селективное расщепление связи между антиген-распознающими (Fab) и эффекторными (Fc) доменами [109]. Данный мотив отсутствует в иммуноглобулине A2, и поэтому IgA1-протеаза его не затрагивает [139,140].

Протеолиз иммуноглобулинов А1 приводит к ингибированию способности данных антител к агглютинации патогенов, что, в свою очередь, нарушает механическое удаление бактерий из носоглотки.

Также IgA1-протеаза имеет и альтернативные субстраты, которые содержат мишени, гомологичные сайтам аутокаталитического расщепления. Она гидролизует лизосомально-ассоциированный мембранный белок LAMP-1, что обеспечивает бактериям выживание внутри эпителиальных клеток и возможность трансцитоза через поляризованный эпителиальный барьер [141–143]. Помимо этого, спектр субстратов IgA1-протеазы включает везикулярный мембранный белок синаптобrevin-II в хромаффинных клетках и хорионический гонадотропин человека, однако физиологическая значимость их протеолиза остается неясной [144,145].

Для зрелых IgA1-протеаз *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и части штаммов *H. influenzae* свойственна значительная степень идентичности последовательностей [8].

В работе Kilian et al. [146] показано, что внеклеточные штаммы *H. influenzae* и *S. pneumoniae* секретируют протеазу, которая избирательно гидролизует человеческий IgA1 миеломного типа, не проявляя активности в отношении IgA2, IgM человека, а также секреторных иммуноглобулинов свиней и крупного рогатого скота. При этом ни один из исследованных непатогенных штаммов *Haemophilus* не обладал способностью к продукции IgA1-протеазы. Полученные данные позволяют заключить, что IgA1-протеаза является значимым фактором вирулентности и его продукция играет ключевую роль в патогенезе вызываемых этими микроорганизмами заболеваний.

IgA1-протеазы *H. influenzae* отличаются значительным антигенным полиморфизмом. Предполагается, что этот полиморфизм возникает в результате горизонтального переноса гена и последующей рекомбинации, что обеспечивает уклонение от иммунной системы. Следствием такой вариабельности является широкий разброс протеолитической активности среди изолятов NTHi, достигающий максимума у штаммов, выделенных от пациентов с манифестными формами инфекции [147,148]. Существует четыре типа бактериальных сериновых IgA1-протеаз: IgA-A1, IgA-A2, IgA-B1 и IgA-B2. В *H. influenzae* представлены все четыре типа, а в *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* – только IgA-B1 и IgA-B2. (см. Рис. 1.3.2)



Рисунок 1.3.2. Диаграмма, показывающая аминокислотную последовательность шарнирной области α -цепи человеческого иммуноглобулина (Ig) A1 и участки расщепления четырьмя типами IgA1-протеазы *Haemophilus influenzae* [148].

В работе [149] методом рентгено-структурного анализа была получена трехмерная структура IgA1-протеазы из *H. influenzae* штамм ATCC 51907 / DSM 11121 / KW20 / Rd длиной 989 аминокислотных остатков. Изображение фермента приведено на рисунке 1.3.3. Подобная третичная структура характерна для всех типов данного фермента из *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae*.



Рисунок 1.3.3. Структура протеазы IgA1 *Haemophilus influenzae*, где цветовая диаграмма указывает направление по первичной структуре от синего в N-концевой части к красному в C-концевой части молекулы.

Эта структура, представлена в Protein Data Bank под кодом 3H09, была получена методом рентгеновской кристаллографии с разрешением 1.75 Å – что является исключительно высоким разрешением для столь крупного белка [119,120,149,150].

Бета-спиральный домен характеризуется складчатой структурой, в ядре которой локализованы гидрофобные аминокислотные остатки, а на поверхности – остатки серина, треонина и аспарагина. Основная функция данного домена заключается в дистанцировании N-концевого каталитического домена от бактериальной мембраны. N-концевой домен имеет глобулярную структуру и содержит каталитическую триаду, обеспечивающую протеазную активность. В области, соответствующей химотрипсиноподобной укладке, присутствуют уникальные петлевые структуры, которые, вероятно, определяют субстратную специфичность фермента [149].

Структура активного центра и распознавание субстрата. Активный центр протеазного домена оптимально адаптирован для связывания остатков пролина, характерных для сайтов расщепления в молекуле IgA1. Небольшой домен 2 образует уникальную петлю (петля D, loop D), которая отстоит от стержня β-спирали, образуя Y-образную форму антитела и нависает над активным центром подобно крышке (lid).

Механизм связывания и катализа. Данные рентгеноструктурного анализа комплекса человеческого IgA1 и IgA1-протеазы демонстрируют, что Fc-домен иммуноглобулина связывается в полости, образованной доменом 2 и протеазным доменом, что указывает на ключевую роль этого домена в субстратной специфичности. Домен 2 обладает петлёй, расположенной над активным центром, которая функционирует в качестве подвижной «крышки», находящейся в закрытой конформации в отсутствие субстрата. Связывание Fc-домена IgA1 в просвете между доменом 2 присоединенным к β-спиральной цепи и N-концевым протеазным доменом индуцирует переход этой крышки в стабильную открытую конформацию. Данное конформационное изменение обеспечивает доступ шарнирного региона IgA1 к каталитическому центру, инициируя процесс распознавания и протеолитического расщепления. Описанный механизм лежит в основе высокой субстратной специфичности фермента.

1.3.2. IgA1-протеаза и ее фрагменты как основа для создания противоменингококковой вакцины

Активность рекомбинантной пневмококковой IgA1-протеазы была продемонстрирована в исследовании Wani et al. [151]. Там же были выявлены специфические ингибиторы активности фермента, препятствующие колонизации

слизистой оболочки пневмококком. При этом, мутантная форма фермента, не обладающая ферментативной активностью, рассматривалась как действующее вещество вакцины.

IgA1-протеаза пневмококков связывается с поверхностью бактериальной клетки при помощи мембранного N-концевого якоря [152]. В этой же работе были описаны получение и свойства трех фрагментов IgA1-протеазы, один из которых содержит аминокислоты N-концевого участка. Все полученные мутанты были ферментативно неактивны. Антигенные свойства рекомбинантных полипептидов были протестированы на сыворотках пациентов, больных пневмонией различной этиологии. В сыворотках пяти пациентов из девяти были обнаружены антитела к фрагменту IgA1-протеазы (1032–1964 а.о.), у семи пациентов – к фрагменту IgA1-протеазы (708–1964 а.о.). Во всех сыворотках обнаруживались антитела, специфические к полноразмерной IgA1-протеазе, и это доказывает, что данный фермент является основным антигеном *S. pneumoniae* в патогенезе у человека. Эти фрагменты, подобно IgA1-протеазе, являются поверхностными белками. Они присутствуют практически во всех серотипах пневмококка. По результатам исследования, авторы пришли к выводу, что данные рекомбинантные белки могут быть использованы как кандидатные противопневмококковые вакцины.

N-концевые фрагменты IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы А, содержащие 40–104 а.о. [153] были использованы как пептиды-носители углеводных компонентов клеточных стенок микроорганизмов *Neisseria*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* и *Haemophilus*. Однако, поливалентные композиции конъюгатов этих фрагментов с полисахаридом менингококка серогруппы С получить не удалось. Как следствие, они обеспечивали защиту только от менингококка серогруппы С.

Компьютерный анализ расположения потенциальных Т-клеточных эпитопов в трех белках менингококка серогруппы В – TspA, AutA и IgA1-протеазе – позволил выявить шесть девятичленных Т-клеточных эпитопов [154]. На основе данных эпитопов, авторы предлагали проектировать вакцину против менингококков серогруппы В, однако данная работа несла чисто теоретический характер и не содержала экспериментальных данных. Также, авторами не были рассмотрены вопросы гомологии IgA1-протеаз между штаммами и серогруппами менингококка.

В целом, ряд авторов предполагает возможность применения IgA1-протеазы в вакцинах, основываясь на том факте, что она является одним из факторов вирулентности бактерий [4,154].

Исследование антигенного состава и сходство IgA1-протеаз серинового типа и металлопротеаз из различных микробов, патогенность которых обусловлена IgA1-протеазой, показало высокое сходство эпитопов IgA1-протеаз из *N. meningitidis* и

N. gonorrhoeae, что позволяет рассматривать их в качестве компонентов потенциальной вакцины широкого спектра действия. Сходство указанных эпитопов с IgA1-металлопротеазами *S. pneumoniae* оказалось незначительным [2,13,155–157].

Нашим коллективом ведётся исследование по проектированию противоменингококковой вакцины на основе зрелой IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы В штамма Н44/76. На начальном этапе работы, ключевым требованием к вакцине являлось создание вакцины, обеспечивающей универсальную защиту против всех штаммов серогруппы В.

Было установлено, что в ответ на введение препарата IgA1-протеазы мыши линии BALB/с отвечают индукцией специфических к нему антител и формированием невосприимчивости к менингококковой инфекции, вызываемой заражением вирулентными штаммами менингококков всех основных серогрупп – А, В и С.

Этот результат послужил отправной точкой для цикла исследований, целью которых было определение спектра патогенов, защиту от которых можно обеспечить вакцинацией IgA1-протеазой. Тот факт, что зрелый фермент обладает протеолитической активностью, и тем самым способен угнетать иммунную систему, потребовал изучения в роли пролекарства мутантную, неактивную рекомбинантную молекулу зрелого фермента. Мутантная форма, не обладая ферментативной активностью, проявляла протективные свойства в отношении менингококковой инфекции, вызываемой менингококками серогрупп А, В и С, защищая мышей от летального заражения живой вирулентной культурой гетерологичных серогрупп менингококка.

Большая молекулярная масса (порядка 109 кДа), а также высокая иммунологическая нагрузка на организм являются существенным препятствием к использованию зрелого мутантного фермента в качестве протективного антигена.

На основе аминокислотной последовательности IgA1-протеазы *N. meningitidis* серогруппы В предложен ряд химерных белков различной структуры и молекулярной массы. Все предложенные белки были синтезированы, очищены и испытаны на мышинной модели. Среди них четыре в схожей степени вызывают образование специфических антител к IgA1-протеазе и обладают протективными свойствами в отношении менингококков. Наличие в сыворотках иммунизированных мышей антител, выявляемых методом цельноклеточного ИФА, свидетельствует о присутствии IgA1-протеазы на поверхности этих микробов. Была показана способность специфических антител связываться с поверхностью патогена. На основании чего было сделано предположение о том, что протективные свойства антигенов на основе IgA1-протеазы и ее аналогов реализуются не только вследствие нарушения адгезии микробов через слизистую оболочку, но и путем

подавления патогена внутри организма [158].

Для выбора укороченных молекул нами был проведён подробный расчет предсказания расположения Т- и В-клеточных эпитопов в молекуле зрелого фермента. В частности, углублённый анализ В-клеточных эпитопов требовал построения моделей третичных структур всех исследуемых молекул.

Для выбранного в качестве основного прототипа протективного антигена белка, IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы В штамма H44/76, была показана серия IgA1-протеаз, обладающих с ним сходством по первичной структуре около 85% и наличествующих в организмах *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и ряде штаммов *H. influenzae*. В работе Karlinsky et al. [8] методом BLAST показано высокое сходство между первичной структурой данного фермента с гипотетическими последовательностями зрелых IgA1-протеаз из *N. meningitidis* (у 1060 из 1061 рассмотренного штамма), *N. Gonorrhoeae* (у всех 602 рассмотренных штаммов) и *H. influenzae* (у не менее 137 из 521 рассмотренного штамма). Для этих ферментов высокой консервативностью обладают участки последовательности, соответствующие фрагментам 28–84, 146–193, 253–539, 567–628, 639–795 и 811–1004 рассматриваемого фермента, с идентичностью не менее 85%. Авторы делают вывод о высоком уровне идентичности среди рассматриваемых IgA1-протеаз и правильности выбора данных белков в качестве основы для проектирования монокомпонентной вакцины, обеспечивающей универсальную защиту против любых штаммов (и, соответственно, серогрупп) *N. meningitidis*. И, соответственно, при проектировании укороченных белков для действующего вещества вакцины, интерес могут представлять наиболее консервативные участки рассматриваемых белков. В частности, авторы отмечают высокую консервативность С-концевого участка выбранного белка. Однако, для N-концевого участка следует добавить, что два промежутка, прилегающих к активному центру и не показавших себя консервативными для всех рассмотренных штаммов в рамках подобного подхода – на самом деле являются консервативными при рассмотрении их как представителей двух кластеров – соответствующих типам 1 и 2 по специфичности расщепления IgA1. Таким образом, авторы рассматривают потенциальное использование N-концевого участка белка в вакцине как имеющего более высокую эффективность против патогенов с данным типом IgA1-протеазы.

Расположение участков, схожих и различных среди данных белков из разных штаммов, на поверхности модели третичной структуры, также было рассмотрено. Для вышеуказанной совокупности белков, были рассмотрены кластеры молекул (зрелых IgA1-протеаз), для представителей которых были построены модели третичной структуры, также как и для выбранной IgA1-протеазы. Нами было показано высокое сходство

предсказанных третичных структур, что позволило выдвинуть предположение о том, что дальнейшее рассмотрение данной совокупности белков может быть сведено к рассмотрению модели IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы В штамма H44/76. В результате, нами при помощи ряда программ была проведена серия расчётов по предсказанию расположения В-эпитопов на поверхности рассматриваемого фермента, а также укороченных белков, спроектированных на его основе. Опираясь на сравнение этих моделей, нами было показано, какие участки укороченных белков сохраняют укладку, характерную для соответствующих им по первичной структуре участков зрелого фермента.

С помощью предложенных белковых фрагментов фермента показана важная роль эпитопов, расположенных в N-концевом участке IgA1-протеазы, для сохранения основных свойств вакцинного пролекарства [159,160]. Эти белки защищали мышей от заражения живой вирулентной культурой менингококков основных эпидемических серогрупп (А, В и С) и обладали характерной для белков способностью к формированию иммунологической памяти [161–163].

Роль клеточного и гуморального факторов в формировании иммунитета была показана в опытах острого заражения животных менингококком серогруппы В. Иммунизированных животных защищали как иммунные лимфоциты, так и специфические антитела, которые обладали способностью связываться с IgA1-протеазой менингококка [161].

Анализ популяций Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4⁺ и CD8⁺, и В-лимфоцитов, несущих маркеры CD19⁺, в крови и селезенке на момент заражения менингококками показал, что механизм защиты зависит от структуры иммуногена и обусловлен разными популяциями лимфоцитов [161].

Авторы публикаций [12,13] показали, что для защиты животных от заболеваний, вызываемых пневмококками *S. suis* серотипа 2 может быть использована стрептококковая IgA1-металлопротеиназа. Это позволило рассматривать данный фермент и его фрагменты в качестве протективного поверхностного антигена.

Кроме того, Kotelnikova et al. [162] показали, что иммунизация животных IgA1-протеазой *N. meningitidis* и короткими белками на её основе формирует иммунологическую память и защиту животных от гибели после заражения как менингококковыми, так и пневмококковыми микроорганизмами. Также, в некоторых сыворотках крови кроликов, иммунизированных убитой культурой *S. pneumoniae*, были обнаружены протективные антитела к IgA1-протеазе *N. meningitidis* и ее фрагментам.

Данные результаты интересны с той точки зрения, что IgA1-протеаза из *S. pneumoniae* является металлопротеазой, и кардинально отличается по первичной

структуре от сериновых IgA1-протеаз, секретируемых *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*. Протективная активность менингококковой IgA1-протеазы и ее аналогов при инфицировании животных *S. pneumoniae* может объясняться наличием у этих сериновых IgA1-протеаз эпитопов, близких эпитопам поверхностных белков пневмококков. Также, секретируемые IgA1-протеазы могут иметь несколько мишеней и, таким образом, разными способами вмешиваться в метаболизм и иммунный ответ хозяина [164–166].

На мышинной модели был осуществлён скрининг эффективности вакцинных композиций с различными адъювантами, по результатам которого в качестве наиболее эффективного метода доставки антигена был предложен липосомный метод. Формирование липосомных везикул осуществлялось на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анализ внутриклеточного транспорта липосомального антигена показывает, что после фагоцитоза макрофагами липосомальный антиген легко выходит из эндосом в цитоплазму макрофагов. Предполагается, что липосомальный антиген может проникать либо в аппарат Гольджи, либо в эндоплазматический ретикулум и таким образом взаимодействовать с молекулами МНС I и II.

1.4. Вакцины

1.4.1. Общие сведения

Профилактика и лечение инфекционных заболеваний, основанные на иммунологических принципах, стали главным средством снижения детской смертности, улучшения качества жизни всех возрастных групп населения, достижения активного здоровья и увеличения продолжительности жизни людей. Поствакцинальный иммунитет обладает двумя уникальными свойствами: специфичностью и иммунологической памятью. Благодаря этому он создает прочную и длительную защиту против инфекций.

Вакцина – это медицинский или ветеринарный препарат, предназначенный для создания в организме приобретенного иммунитета к конкретному антигену возбудителя инфекционного заболевания.

Вакцина изготавливается из ослабленных или убитых микроорганизмов, из продуктов их жизнедеятельности или из их антигенов, полученных генно-инженерным или химическим путем.

Хотя в абсолютном большинстве случаев вакцина бесполезна при уже развившемся заболевании, вакцинация имеет некоторые преимущества перед медикаментозным

лечением по нескольким ключевым параметрам:

- Вакцинация формирует специфический иммунитет до контакта с патогеном, предотвращая само заболевание. Медикаменты же применяются после заражения (или развития симптомов), когда патоген уже нанес ущерб организму. С точки зрения эпидемиологии, «предотвратить» выгоднее, чем «лечить» – это снижает бремя болезни на популяцию.

- Для многих инфекций (полиомиелит, корь, столбняк, ВПЧ, менингит) не существует этиотропного лечения – антибиотики или противовирусные препараты либо бесполезны (вирусы), либо необратимые повреждения уже произошли. Например, при столбняке антитоксин нейтрализует только свободный токсин, но не исправляет поражение нервов. Вакцинация же полностью предотвращает заболевание.

- Вакцинация защищает не только привитого, но и снижает циркуляцию возбудителя, защищая непривитых (по медицинским показаниям – младенцы, иммунодефицитные). Медикаментозное лечение, даже успешное, обычно не прерывает цепочку передачи инфекции на популяционном уровне (например, антибиотики при туберкулезе помогают больному, но не предотвращают новые случаи у контактных).

- Массовая вакцинация против бактериальных инфекций резко сокращает потребность в антибиотиках, замедляя селекцию резистентных штаммов. Лечение же, наоборот, является движущей силой резистентности.

Как следствие, на сегодня успешность применения вакцин против инфекционных заболеваний признана во всем мире. В последние десятилетия существенно увеличилось количество разработанных новых вакцин, что привело к заметному снижению заболеваемости или даже полному избавлению от более чем десятка серьезных инфекций, таких как коклюш, дифтерия, оспа, холера, краснуха, корь, полиомиелит и некоторые другие.

1.4.2. Виды вакцин

Вакцинопрофилактика рассматривается в качестве одного из фундаментальных разделов вакцинологии, аккумулирующего комплекс регламентированных мер по масштабному применению иммунобиологических препаратов для формирования популяционного поствакцинального иммунитета. Данный подход выступает в роли наиболее доступного и экономически целесообразного инструмента контроля эпидемического процесса, позволяющего минимизировать показатели заболеваемости и летальности, а также достичь устойчивого улучшения медико-демографических

показателей. Показательным результатом реализации массовой плановой иммунизации является эрадикация натуральной оспы в глобальном масштабе, что подтверждается ликвидацией последнего природного очага (26 октября 1977 г., Сомали) [167].

На текущий момент, наиболее распространенный подход к разработке вакцин направлен на создание препаратов против конкретных патогенов. Для обеспечения защиты населения от разных видов постоянно мигрирующих и мутирующих патогенных микроорганизмов, необходима комплексная вакцинация населения, предполагающая многократное введение разных компонентов применяемых вакцинных препаратов. Создание, тестирование и производство таких составов являются дорогими и трудоемкими, что существенно влияет на стоимость производства вакцин. Дороговизна производства затрудняет доступ к вакцинам в большинстве развивающихся стран, а также в целом усложняет всеобщую иммунизацию населения.

Таким образом, проектирование однокомпонентных вакцин, предназначенных для одновременной защиты от нескольких возбудителей, обладающих общей антигенной детерминантой, является перспективной задачей биотехнологии.

Типы применяемых вакцин

По уровню технологичности и эффективности, в современной вакцинопрофилактике условно выделяют три поколения вакцинных препаратов (см. Рис. 1.4.1.1).

Вакцины 1-го поколения

Живые вакцины

Живые вакцины производят из живых микроорганизмов с пониженной вирулентностью. Большинство таких вакцин способствуют выработке длительно сохраняющегося на высоком уровне иммунитета. Живыми являются вакцины против гриппа, кори, эпидемического паротита, желтой лихорадки и др.

Инактивированные (убитые) вакцины

Инактивированные (убитые) вакцины получают путем полного обезвреживания бактерий и вирусов с сохранением их иммуногенных свойств.

Вакцины 2-го поколения

Рекомбинантные вакцины

Рекомбинантные вакцины относятся к новому поколению иммунных препаратов, произведенных посредством встраивания антигена вируса в геном дрожжевых или бактериальных клеток. Представителем данной группы является вакцина против вирусного гепатита В.

Субъединичные вакцины

Субъединичные вакцины содержат только поверхностные антигены, что позволяет

уменьшить в вакцине содержание белка и, следовательно, снизить ее аллергенность. К субъединичным вакцинам относятся вакцины против гриппа, пневмококковой, менингококковой, гемофильной инфекций и др.

Вакцины 3-го поколения

Вакцины на основе вирусоподобных частиц

Вирусоподобные частицы VLPS – это пустые частицы вирусов, состоящие из основных структурных белков, имитирующие организацию и конформацию нативных вирусов. На сегодняшний день сконструирован ряд VLP-вакцин (например, против ВИЧ, коронавирусов), которые вызывают образование вируснейтрализующих антител и стимулируют Т-клеточный цитотоксический ответ.

ДНК-вакцины

ДНК-вакцины создаются на основе технологии, с помощью которой накопление протективного антигена происходит в организме прививаемого. При этом ДНК-конструкция, которая кодирует синтез протективного антигена, встраивается в вектор, в качестве которого выступают плазмиды, фаги, вирусы, липосомы либо эукариотические клетки. Вектор со встроенной ДНК вводится в организм вакцинируемого, в котором происходит наработка протективного антигена.

Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин применяют: включение иммуностимулирующих нуклеотидных последовательностей в ДНК-конструкцию, адьюванты, усовершенствованные методы доставки (в частности, с использованием липосом).

РНК-вакцины

По своему принципу РНК-вакцины подобна ДНК-вакцинам, однако обладают рядом отличий. При использовании мРНК нет проблем с иммунным ответом на вектор, который часто препятствует повторному введению других вакцин. Кроме того, мРНК не может интегрироваться в геном клетки организма. Для создания РНК-вакцин применяются два основных подхода: а) использование нереплицирующейся мРНК, кодирующей, как правило, только один антиген; б) получение самоамплифицирующегося РНК-репликона из одноцепочечных (+/-)РНК-вирусов, в геноме которых структурные гены заменены на гены, кодирующие необходимые антигены и РНК-полимеразу. Вакцины на основе мРНК получают путем транскрипции *in vitro* из линейной ДНК-матрицы, в качестве которой выступает плазида, с использованием различных РНК-полимераз бактериофагов.

Синтетические пептидные вакцины

Синтетические пептидные вакцины – препараты, содержащие синтезированные или выделенные нуклеиновые кислоты или полипептидные последовательности, образующие

антигенные детерминанты, распознаваемые нейтрализующими антителами. Непременные компоненты таких вакцин – сам антиген, высокомолекулярный носитель и адъювант (повышающий иммуногенность вакцин). Введение синтетических вакцин в комбинации с адъювантами и иммуномодуляторами особенно эффективно для пациентов с нарушениями иммунного статуса [168].



Рисунок 1.4.2.1. Схематическое изображение типов и поколений вакцин [168].

Будущее вакцин

В последние годы появились новые платформы вакцин, включая вакцины на основе нуклеиновых кислот (например, мРНК) в составе наночастиц или вакцин на основе вирусных векторов, которые применяются для создания вакцин против таких вирусов как коронавирусная инфекция COVID-19. В вакцинах на основе нуклеиновых кислот в качестве антигена используется ДНК или РНК, представляющие собой небольшой участок вирусного гена, например, поверхностного белка. В случае мРНК необходимо использовать инкапсулирующую систему доставки, поскольку РНК очень нестабильна и недолговечна в организме. К этому классу относятся такие вакцины как Pfizer/BioNTech, Moderna и другие вакцины против COVID-19. Исследования вакцин на основе нуклеиновых кислот (как РНК, так и ДНК) продолжаются уже многие десятилетия. Однако только недавно усилия по созданию РНК-вакцины увенчались успехом и позволили создать множество чрезвычайно

успешных мРНК-вакцин против COVID-19, однако в настоящее время ещё не существует эффективной ДНК-вакцины.

При использовании системы вирусного вектора часть целевого вируса включается в геном вируса-носителя, который безвреден и не способен реплицироваться в организме пациента. В качестве вектора или носителя могут быть использованы аденовирусы (человеческого или животного происхождения), дикий тип которых вызывает простуду, корь, коровью оспу. Примеры вакцин этого типа включают вакцину Ervebo® от Эболы компании Merck, которая представляет собой аттенуированную рекомбинантную вакцину против вируса везикулярного стоматита, вакцины AstraZeneca и Johnson & Johnson против COVID-19, в которых используется вирусный вектор аденовируса шимпанзе, в вакцинах Sputnik V и GamEvac-Combi против COVID-19 и лихорадки Эбола соответственно используется аденовирус человека, а в вакцине против оспы Imvanex® от Bavarian Nordic среди прочих векторов используется модифицированный вектор Vaccinia Ankara [169].

1.4.2.1. Вакцины против менингококкового менингита

Вакцины против менингококка серогрупп А, С, Y, W-135

Исследования по созданию профилактических прививок от возбудителей менингита ведутся с 20 века и по сей день. Действие первых (начиная с 1970-х годов) противоменингококковых вакцин, таких как MPSV4 (Menomune), было основано на капсульных полисахаридах патогенов. Являясь поливалентными вакцинами, они обеспечивали защиту людей от менингококков А, С, Y, W-135. Однако было показано, что эти вакцины эффективны только для взрослых пациентов, и не формируют иммунитет у детей до 1 года. Более того, полисахаридные вакцины являются тимус-независимыми и не приводят к формированию иммунологической памяти, так как не затрагивают механизмы клеточного иммунитета, и, как результат, не обеспечивается продолжительное защитное действие вакцины. Эффективность таких вакцин основана на образовании узкоспецифических антител к капсульному полисахариду только конкретной серогруппы менингококка. Ввиду данных причин простые полисахаридные вакцины не используют для массовой вакцинации [170].

Данные недостатки полисахаридных вакцин в отношении младенцев были преодолены в конце 1990-х годов посредством разработки вакцины следующего поколения из капсульных полисахаридов, конъюгированных с белковыми антигенами ковалентной связью. Преимущество этих вакцин заключается в их способности с помощью белковой компоненты индуцировать тимус-зависимый ответ, что улучшило первичный иммунный

ответ (особенно у детей и подростков) и формирование иммунологической памяти, а также в способности уменьшать количество бактерионосителей и, таким образом, предотвращать распространение инфекции. Первая конъюгированная противоменингококковая вакцина была представлена еще в 1999 году и обеспечивала защиту против серогруппы С. Среди конъюгированных вакцин существенной важностью обладают квадريفалентные вакцины, предназначенные для профилактики инфекций, вызванных менингококками серогрупп А, С, W-135 и Y. Первая конъюгированная менингококковая вакцина в США, MenACWY-D (Menactra), способная обеспечить защиту людей возрастной группы от 9 месяцев до 55 лет, была лицензирована в 2005 году. В 2010 году получила лицензию вакцина MenACWY-CRM (Menveo), а в 2020 – MenACWY-TT (MenQuadfi). Эти вакцины спроектированы на основе капсульных полисахаридов, конъюгированных с дифтерийным анатоксином. Они эффективно действуют на людей всех возрастов, включая детей в возрасте до 2 месяцев [66,171].

Были также предприняты попытки создания конъюгированной вакцины на основе белка столбнячного анатоксина. На стадии ранних клинических испытаний она показала слабую иммуногенность, а также индуцирование аутоиммунных реакций, что приостановило исследования в данном направлении. Но, тем не менее, в 2012 году была одобрена вакцина, конъюгированная со столбнячным анатоксином – MenACWY-TT (Nimenrix).

Конъюгированные вакцины показали не менее сильный иммунный ответ, чем полисахаридные вакцины, но оказались пригодными к массовой вакцинации и в первые годы использования значительно снизили бессимптомное носительство менингококка. Однако после лицензирования MenACWY-D (Menactra), обнаружались побочные эффекты в виде синдрома Гийена-Барре. Тем не менее, в связи с незначительным риском (1,5 на 1000000), вакцина успешно применяется и по сей день.

Еще одна конъюгированная вакцина против менингококка серогруппы А, MenAfriVac (PsA-TT), была выпущена в рамках проекта вакцинации против менингита для сокращения эпидемий в «Африканском менингитном поясе», где господствует данная серогруппа. Массовая вакцинация дала хороший результат, однако при цене MenAfriVac около 40 долларов на человека возникает вопрос о создании менее дорогих альтернатив [172].

Существенным недостатком данных вакцинных препаратов является отсутствие защиты против серогруппы В.

Вакцины против менингококка серогруппы В

Использованию вышеописанного подхода к разработке вакцин против серогруппы В препятствовал тот факт, что капсульный полисахарид менингококка этой серогруппы обладает высоким сродством с ганглиозидами эмбриональных тканей человека. Использование такой вакцины на младенцах чревато возникновением аутоиммунных процессов [173]. При этом, в некоторых европейских странах доля вклада менингококка серогруппы В в общее число возбудителей менингококковой инфекции достигает 64% [174].

Наибольшую сложность в создании вакцин от менингококковой инфекции составляют особенности менингококков серогруппы В. Все серогруппы менингококка используют молекулярную мимикрию, включая в состав капсулы аналог сиаловой кислоты, что повышает сопротивляемость белкам комплемента человека и ослабляет фагоцитоз. В капсуле менингококка серогруппы В содержится гомополимер $\alpha(2-8)$ -сиаловой кислоты, идентичный структуре молекул адгезии нейронных клеток человека. Это приводит к очень слабому иммунному ответу. Для того, чтобы обойти данный аспект, внимание было уделено внешним мембранным белкам, благодаря чему к 1989 году исследователи из Гаваны разработали кубинскую вакцину против менингококка серологических групп В и С, VA-MENGOС-BC (Finlay Institute, Havana, Cuba), которая стала первой в мире вакциной против менингококковой инфекции серологической группы В. Её эффективность в 83% была продемонстрирована в проспективном, рандомизированном, двойном слепом плацебо-контролируемом полевом исследовании. При производстве вакцины впервые была использована технология везикул или протеолипосом [175–177]. Последующие вакцины, использующие тот же принцип, были не только моновалентными, но и штамм-специфичными, что делало их непригодными для массовой вакцинации.

Основанный на белках наружной мембраны (OMV) вакцинный препарат против менингококка серогруппы В применяется в Норвегии, Новой Зеландии, Кубе и в странах Южной Америки. В частности, применение в Новой Зеландии вакцины MeNZB, показало эффективность в снижении уровня заболеваемости во время эпидемии, вызванной *N. meningitidis* серогруппы В [178].

Разработка вакцин, основанных на белках внешней мембраны *N. meningitidis* и обеспечивающих универсальную защиту против всех штаммов менингококка серогруппы В, затруднено из-за высокой вариабельности этих белков.

Первая многокомпонентная вакцина широкого спектра действия против менингококка серогруппы В 4CMenB (Bexsero) (Bexsero, Novartis Vaccines, Италия), была одобрена ЕМА в 2013 году для профилактики во всех возрастных группах, а также FDA США в январе 2015 года для использования у подростков [86]. Эта многокомпонентная

вакцина была спроектирована на основе трех поверхностных белков, обнаруженных при секвенировании бактериального генома, а также белков недавно возникшего эпидемического штамма менингококка [179–181]. Вторая вакцина против MenB, MenB-FHbp (Trumenba, Wyeth Pharmaceuticals, США), созданная на основе белкового антигена, также была одобрена в США для подростков. Вакцина 4CMenB (Bexsero) также одобрена для использования в Европе, Канаде и Австралии. Обе вакцины содержат белок, связывающий липопротеиновый фактор H (fHbp) [86], и обладают более широким спектром действия, чем вакцины на основе OMV [66,180].

Вакцины от менингококка серогруппы X

На данный момент, не существует лицензированных вакцин против менингококка серогруппы X [26] – только против A, B, C, W-135 и Y.

Вакцины против менингококка серогрупп A, B, C, W и Y

Недавно для использования в США были одобрены две пятивалентные вакцины, предназначенные для защиты от менингококков серологических групп A, B, C, W и Y. В октябре 2023 года была одобрена конъюгированная вакцина MenABCWY (Penbraya), состоящая из компонентов ранее лицензированных менингококковых вакцин – MenB-FHbp (Trumenba) и MenACWY-TT (Nimenrix). В феврале 2025 года была одобрена вакцина MenABCWY-CRM (Penmenvu), которая также объединяет в одну вакцину две хорошо зарекомендовавшие себя вакцины против менингококка, производимые компанией GSK – вакцину 4CMenB (Bexsero) (вакцина против менингококка серогруппы B) и MenACWY-CRM (Menveo) (конъюгированная с дифтерийным анатоксином вакцина против менингококка серогрупп A, C, Y и W-135). Обе вакцины одобрены для использования у людей в возрасте от 10 до 25 лет [182–187].

В целом, не существует универсальных зарегистрированных вакцин, обеспечивающих защиту от всех наиболее патогенных серогрупп *N. meningitidis*. Поливалентные вакцины дают более значительный эффект для массовой вакцинации, нежели моновакцины. Вместе с тем, они, зачастую, являются дорогими или демонстрируют немалое количество побочных эффектов. Совместное использование конъюгированных вакцин и вакцин от серогруппы B дает слишком большую иммунную нагрузку, что не позволяет использовать их совместно в массовой вакцинации.

Таким образом, для профилактики заболеваний, вызванных менингококками, органы здравоохранения используют ряд вакцин против соответствующих конкретных серогрупп, причём эти вакцины требуют многократных инъекций, что значительно увеличивает иммунную нагрузку на организм, особенно у детей раннего возраста.

2. Материалы и методы

2.1. Штаммы *E. coli* и *N. meningitidis*. Клинические материалы

Для клонирования и получения плазмидной ДНК использовался штамм *Escherichia coli* DH5-Alpha или XL-1, или TOP10. Для получения биомассы рекомбинантных белков использовался штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) (*E. coli* B F- *dcm ompT hsdS (rB - mB -) gal λ (DE3)*).

N. meningitidis серогруппы А (штамм А208), серогруппы В (штамм Н44/76) и серогруппы С (штамм С0638), получены из Научного центра экспертизы средств медицинского применения Минздрава России; *S. pneumoniae* серотипов 3, 14 и 19А – из лаборатории микробиологии Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей Минздрава России.

2.2. Методы генной инженерии

2.2.1. Основные реактивы

Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), ЭДТА, Na₂HPO₄·7H₂O, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, KCl, MgCl₂, АТФ, (NH₄)₂SO₄, FeSO₄·7H₂O, MgSO₄, MnCl₂, CaCO₃, NaHCO₃, Triton X-100, Na₂CO₃, борная кислота, бромистый этидий, β-меркаптоэтанол, Tween-20, БСА, дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), глюкоза, циклогексан, лимонная кислота, уксусная кислота, трифторуксусная кислота, ацетонитрил, сахароза, канамицин, имидазол (получены из Sigma Aldrich, США); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия, мочеви́на, агар, пептон, триптон, дрожжевой экстракт (BD, США); изопропил-β-D-1- тиогалактопиранозид ИПТГ (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.2. Ферменты

Термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза Taq (Евроген, Россия) и Encyclo (Евроген, Россия); щелочная фосфатаза (Thermo Fisher Scientific, США); РНКаза А (Thermo Fisher Scientific, США); эндонуклеазы рестрикции (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.3. Маркеры молекулярных весов

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.4. Основные растворы

Все растворы готовились на особо чистой воде из установки Milli-Q (Millipore, США). Растворы для инъекций подвергались фильтрации с использованием стерильных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм.

PBS: 8,0 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,15 г/л Na₂HPO₄, 0,2 г/л KH₂PO₄, pH 7,2.

PBST: PBS, 0,1% Tween-20.

10xTBE: 0,89 М Трис, 0,89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8,0.

TE: 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

2.2.5. Среды для культивирования *E. coli* и *N. meningitidis*

LB: 10 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

LB-агар: LB, 18 г/л агара.

2xYT: 16 г/л пептона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl.

2xYT-агар: 2xYT, 18 г/л агара.

SOB: 20 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄.

SOC: SOB, 50 мМ глюкоза.

TSA-F: казеиновый пептон (бычий) 15 г/л, соевый пептон 5 г/л, NaCl 5 г/л, агар 15 г/л, pH 7,3.

Растворы антибиотиков: водный раствор натриевой соли ампициллина (Синтез, Россия) с концентрацией 100 мг/мл (1000X), водный раствор сульфата канамицина (Sigma, США) 100 мг/мл (1000X).

2.2.6. Приготовление компетентных клеток *E. coli* и трансформация плазмидной ДНК

Культуру *E. coli* из одиночной колонии вносили в 5 мл питательной среды 2xYT и выращивали при 37 °С в течение ночи. Ночную культуру разводили в 100 раз в растворе 2xYT и растили при 37 °С до достижения оптической плотности OD₆₀₀=0,6. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 3 мин при 4 °С. Осадок ресуспендировали в 500 мкл охлажденного на льду 0,07 М CaCl₂ и инкубировали в ледяной бане в течение 30 мин. Затем клетки осаждали центрифугированием при тех же условиях и осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,07 М CaCl₂.

2.2.7. Выделение плазмидной ДНК

Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 5 мл среды 2xYT с добавлением антибиотика и растили при 37 °С и перемешивании 200 об/мин, в течение 18-24 часов. По окончании инкубации биомассу осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 10 минут. Выделение и последующую очистку плазмидной ДНК проводили с использованием коммерческих наборов, основанных на принципе колоночной хроматографии (производство «Биолабмикс», Россия). Оценку качества полученной плазмидной ДНК осуществляли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле, приготовленном на однократном буфере TBE с добавлением бромистого этидия (конечная концентрация 1 мкг/мл). Перед нанесением образцы смешивали с буфером для загрузки (5:1), содержащим 10 mM Трис-НСl (рН 7,6), 0,03% бромфенолового синего, 0,03% ксиленцианола, 60% глицерина и 60 mM ЭДТА. Электрофоретическое разделение проводили в буфере TBE при напряжении 140 В. По завершении электрофореза визуализацию ДНК в геле осуществляли в ультрафиолетовом свете (длина волны 312 нм) с помощью трансиллюминатора (КвантМ-312, Россия).

2.2.8. Создание генетических конструкций, кодирующих фрагменты IgA1-протеазы

Белки АЕ, 4, 9 и 10

Здесь и далее последовательность нуклеотидов приведена в направлении 5'-3'.

Для клонирования последовательности ДНК, кодирующей фрагмент А²⁸-Р¹⁰⁰⁴ IgA1-протеазы в векторе рЕТ-31(a+), ген *iga* амплифицировали по стандартному протоколу ПЦР при использовании в качестве матрицы геномной ДНК *N. meningitidis* штамма Н44/76. При использовании олигонуклеотидов: GACAGCCATATGGCATTTGGTCAGAGACGATGTC (IgA1-Nde-28) и GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT (IgA1-Xho-1004) (прямого и обратного праймеров соответственно), получали фрагмент длиной приблизительно 3000 п.о. Целевой ПЦР-продукт обрабатывали рестриктазами NdeI и XhoI и клонировали в вектор рЕТ-28b(+) (Novagen) при использовании уникальных сайтов рестрикции NcoI и XhoI таким образом, чтобы продуцируемый белок содержал His-метку в С-концевой области. Для клонирования последовательности ДНК, кодирующей фрагмент Е¹³⁵-Н³²⁸ IgA1-протеазы в векторе рЕТ-28b(+), ген *iga* амплифицировали по стандартному протоколу ПЦР при использовании в качестве матрицы геномной ДНК плазмиду рЕТ31-IgA1-1004. При использовании олигонуклеотидов GAACCAAATAAAAATTGGCATCASC (IgA1-E135) и GCGCTCGAGATGATGTTCTCCATTACSTTTGA (IgA1-H328-Xho) (прямого и обратного праймеров соответственно) получали фрагмент ДНК длиной приблизительно

600 п.о. Целевой ПЦР-продукт обрабатывали рестриктазой XhoI и клонировали в вектор pET-28b(+) (Novagen) с использованием уникальных сайтов рестрикции NcoI (затупленный) и XhoI таким образом, чтобы продуцируемый белок содержал His-метку в С-концевой области. Последовательности ДНК, кодирующие фрагменты W³²⁹-H⁶²² и H⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴ IgA1-протеазы, клонировали в вектор pET-28b(+), как описано выше, с использованием олигонуклеотидов: TGGAACATTA CTTTGGCACAAA(IgA1-W329) и GCGCTCGAGGTGGTTCATCGCGTTTTCTTG (IgA1-H622-Xho) (прямого и обратного праймеров соответственно) и CATTTGACTGGCGACAGCCAA (IgA1-H835) и GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT (IgA1-P1004-Xho) (прямого и обратного праймеров соответственно).

Белки 3 и 8

Для клонирования последовательности ДНК, кодирующей фрагмент W¹⁴⁰-K⁸³³ IgA1-протеазы, в вектор pET-28(b+) ген *iga* был амплифицирован по стандартному протоколу ПЦР с использованием ДНК pET-31-IgA1-1004 в качестве матрицы. С использованием олигонуклеотидов IgA1-W140—TGGCATCACGGAATCAAGGTC и IgA1-K833-Xho—GCGCTCGAGTTTGCTATGTTGGTTTAGGCTGA (прямой и обратный праймеры) был получен фрагмент ДНК длиной около 2100 п.н. Целевой продукт ПЦР обрабатывали рестриктазой XhoI и клонировали в вектор pET-28b(+) (Novagen, Дармштадт, Германия) с использованием уникальных сайтов рестрикции NcoI (затупленный) и XhoI таким образом, чтобы полученный белок содержал His-таг в С-концевой области. Клонирование фрагмента W³²⁹-P¹⁰⁰⁴ IgA1-протеазы (рекомбинантный белок MW³²⁹-P¹⁰⁰⁴-LEN₆) в вектор pET-28(b+) проводили, как описано выше, с использованием олигонуклеотидов IgA1-W329—TGGAACATTA CTTTGGCACAAA и IgA1-Xho-1004—GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT.

Белки 11 и 13

Для получения нуклеотидной последовательности (белка 11), используют метод мегапраймеров. Для этого конструируют специфические праймеры f1, f2, f3, f4 (f1 – прямой – TGGCATCACGGAATCAAGGTC, f2 – обратный – CСAТTCGGAТТТТGACTTGCCAATGATGTTCTCCATTA CСТТТGAT, f3 – обратный – TGATТGATТТТGAGCGTGTGGTAGTCGTTATТТТCTGTTACACCGT, f4 – обратный – GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT. Праймер f2 кодирует фрагмент нуклеотидной последовательности (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/GU190729.1>) полноразмерной IgA протеазы *N. meningitidis* серогруппы В Н44/76 с делецией нуклеотидов, кодирующих аминокислотную последовательность Trp³²⁹-Val⁴¹¹, праймер f3 кодирует фрагмент нуклеотидной последовательности IgA1-протеазы с делецией остатков

Trp⁶⁰⁵-Gln⁸⁶⁵. В праймер f4 для последующего лигирования с вектором pET-28(a+) вводят последовательность сайта узнавания рестриктазы XhoI, имеющейся в полилинкере вектора. Строение праймера f4, не содержащего терминирующих кодонов, позволяет получать рекомбинантный белок, модифицированный в С-концевой области гексагистидиновой меткой. Амплификацию фрагмента гена рекомбинантного белка проводят в три этапа методом ПЦР, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК pET31-IgA1-1004, описанную выше. На первом этапе проводят амплификацию фрагмента этого гена, используя праймеры f1 и f2, в результате получают фрагмент ДНК длиной около 590 п.о. Полученный фрагмент ДНК выделяют из агарозного геля и используют в качестве первого праймера на втором этапе ПЦР, в качестве второго праймера второго этапа ПЦР используют праймер f3. При этом получают фрагмент ДНК около 1170 п.о. На третьем этапе ПЦР используют в качестве праймеров фрагмент ПЦР, полученный на втором этапе, и праймер f4. В результате получают целевой фрагмент ДНК около 1570 п.о. Целевой фрагмент ДНК обрабатывают рестриктазой XhoI и клонируют в вектор pET28(a+) (Novagen, кат. №69864-3), при использовании сайта рестрикции NcoI (затупленного) и XhoI таким образом, чтобы продуцируемый белок содержал гексагистидиновую метку в С-концевой области. Амплификацию фрагментов нуклеиновой кислоты проводят по стандартному протоколу за 25 циклов ПЦР. Полученная плазмидная ДНК названа pET28-IgA1-11-3.

Для получения нуклеотидной последовательности рекомбинантного белка (13), используют метод мегапраймеров. Для этого конструируют специфические праймеры f1, f4, f5 (f1 – прямой – TGGCATCACGGAAATCAAGGTC, f4 – обратный – GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT, f5 – обратный – ATGATTGATTTTGAGCGTGTGGTATTGCCAAGAGTTTTTTTGATAGCC). Праймер f5 кодирует фрагмент нуклеотидной последовательности (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/GU190729.1>) IgA1-протеазы *N. meningitidis* H44/76 с делецией нуклеотидов, кодирующих аминокислотную последовательность Glu³⁰⁰-Gln⁸⁶⁵. В праймер f4 для последующего лигирования с вектором pET-28(a+) вводят последовательность сайта узнавания рестриктазы XhoI, имеющейся в полилинкере вектора. Строение праймера f4, не содержащего терминирующих кодонов, позволяет получать белок, модифицированный в С-концевой области гексагистидиновой меткой. Амплификацию фрагмента гена проводят в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК pET31-IgA1-1004, описанную выше. На первом этапе проводят реакцию амплификации фрагмента гена, используя праймеры f1 и f5, в результате получают фрагмент ДНК длиной около 480 п.о. Полученный фрагмент ДНК выделяют из агарозного

геля и используют в качестве первого праймера на втором этапе ПЦР, в качестве второго праймера на втором этапе ПЦР используют праймер f4. Получают целевой фрагмент ДНК около 900 п.о. Целевой фрагмент обрабатывают рестриктазой XhoI и клонируют в вектор pET28(a+) (Novagen, кат. №69864-3), при использовании сайта рестрикции NcoI (затушенного) и XhoI таким образом, чтобы продуцируемый белок содержал гексагистидиновую метку в С-концевой области. Амплификацию фрагментов нуклеиновой кислоты проводят по стандартному протоколу за 25 циклов ПЦР. Температуру отжига праймеров подбирают экспериментально. Обработку ПЦР-фрагмента и вектора рестриктазами, лигирование и трансформацию компетентных клеток TOP10 проводят по стандартным процедурам. Полученная плазмидная ДНК названа pET28-IgA1-13-1.

Получение плазмид для липосом pcDNA-IgA-11-3

Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок IgA-11-3 (M + Trp¹⁴⁰-His³²⁸ + Trp⁴¹²-Asp⁶⁰⁴ + Tyr⁸⁶⁶-Pro¹⁰⁰⁴LEH₆) была получена с использованием ПЦР. Были сконструированы праймеры IgA1-W140-HindIII – GCGAAGCTTATGTGGCATCACGGAAATCAAG и IgA1-P1004-XbaI – CGCTCTAGATCAAGGCGGTGCGACGACGATATT, на 5'-концах праймеров были введены последовательности сайтов узнавания рестриктаз HindIII и XbaI, соответственно. В качестве матрицы использовали полученную ранее плазмиду pET28-IgA-11-3, кодирующую целевой белок. ПЦР продукт, кодирующий белок IgA-11-3, был обработан рестриктазами HindIII и XbaI и клонирован в вектор pcDNA3.1 (Invitrogen, США), обработанный теми же рестриктазами. Обработку ПЦР-фрагмента и вектора рестриктазами, лигирование и трансформацию компетентных клеток TOP10 проводили по стандартным процедурам. Полученные плазмидные ДНК были названы pcDNA-IgA1-11-3.

Секвенирование всех полученных ДНК подтвердило соответствие целевым структурам.

Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью термоциклера T100 (BioRad, США). Для проведения ПЦР готовили смесь следующего состава: однократный буфер для Taq-полимеразы (Евроген, Россия), 10 пмоль каждого праймера (Евроген, Россия), 0,2 мМ смеси четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (Thermo Fisher Scientific, США), 1-2 ед. Taq-полимеразы (Евроген, Россия), 0,1-0,2 мкг матричной ДНК, деионизованная вода из установки Milli-Q (Millipore, США) до финального объема реакционной смеси 20 мкл.

Амплификацию ДНК проводили по следующей схеме: предварительная денатурация 94 °С, 1 мин, 1 цикл. Денатурация 94 °С, 15 сек. отжиг праймеров X °С (рассчитывалась исходя из последовательности праймеров), 30 сек. Элонгация 72 °С, Y сек (рассчитывалась исходя из длины ампликона с учетом скорости элонгации ≈1000 пар/мин).

Количество: 25-30 циклов. Финальная элонгация 72 °С, 5 мин.

Рестрикцию и лигирование фрагментов ДНК проводили стандартными методиками. Рестрикцию ПЦР-продуктов и плазмид проводили в течение одного часа при температуре 37 °С в буферном растворе CutSmart (New England Biolabs США), содержащем 50 мМ ацетата калия, 20 мМ Трис-ацетата, 10 мМ ацетата магния 100 мкг/мл БСА, рН 7,9. При рестрикции плазмидной ДНК, в последние 10 минут при той же температуре инкубации добавляли щелочную фосфатазу до конечной концентрации 1 мкг/мл.

Для лигирования фрагментов ДНК использовали T4 ДНК-лигазу (Thermo Fisher Scientific, США). Лигирование проводили в объеме 20 мкл, при молярном соотношении вектора к вставке 1:5, в буферном растворе, содержащем 40 мМ Tris-HCl, 25 мМ MgCl₂, 25 мМ DTT, 1,25 мМ АТР, рН 7,8, в течение часа при температуре 22 °С. Затем в лигазную смесь добавляли 1/10 объема тРНК (соосадиителя), обрабатывали равным объемом смеси 1:1 фенол-хлороформа, и переосаждали водную фазу 3 объемами 96% этанола. Центрифугировали 10 минут 16000 g при комнатной температуре, промывали осадок 70% спиртом, затем растворяли в 10 мкл воды.

2.2.9. Трансформация компетентных клеток

Для проведения трансформации к размороженной на льду аликвоте компетентных клеток (100 мкл) добавляли плазмидную ДНК или очищенную лигазную смесь в количестве 0,01-0,2 мкг, и инкубировали 20-40 мин во льду. Затем прогревали при 42 °С в течение 1,5 мин, охлаждали 1-2 мин во льду, добавляли 500 мкл тёплой среды SOC и инкубировали 45-60 мин при 37 °С. Далее клеточную суспензию высевали на чашки Петри, содержащие агаризованную селективную среду LB с антибиотиком, и помещали в термостат на 37 °С на 14-16 часов. Наличие плазмиды с необходимым геном в колонии проверяли с помощью ПЦР. Для этого в микропробирки разносили по 10 мкл воды MQ, после чего отдельные бактериальные колонии (в количестве 10-20 штук) переносили с использованием предварительно автоклавированных стерильных зубочисток на свежую размеченную чашку и в соответствующую пронумерованную пробирку. В каждую пробирку вносилось по 10 мкл предварительно приготовленной двукратной смеси для проведения ПЦР. Далее в амплификаторе осуществляли 25 циклов ПЦР-амплификации, после чего продукты полимеразной цепной реакции анализировали с использованием электрофореза в агарозном геле.

2.2.10. Приготовление музейного штамма

Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 10 мл среды 2xYT с соответствующим селективирующим антибиотиком (100 мкг/мл ампициллина или 25 мкг/мл

канамицина) и растили при 37 °С и перемешивании 220-250 об/мин в течение ночи. Из отдельной колонии бактерий выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 15%, замораживали и хранили при температуре -80 °С. Штамм из музея рассеивали истощающим штрихом на чашку Петри, содержащую среду 2хУТ-агар и инкубировали при 37 °С в течение 14-16 часов.

2.3. Методы работы с белками

2.3.1. Белковый электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по стандартной методике Леммли. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бис-акриламид (соотношение 29:1), 0,1% ДСН, 0,125 М Трис-НСl, рН 6,8; разделяющий гель – 8-10% смеси акриламид-бис- акриламид (соотношение 29:1), 0,1% ДСН, 0,375 М Трис-НСl, рН 8,9. Для полимеризации сначала добавляли TEMED до концентрации $5 \times 10^{-5}\%$, а затем персульфат аммония до концентрации $1,5 \times 10^{-4}\%$. Для проведения нативного ПААГ-электрофореза использовали буферные растворы без ДСН. Двукратный буфер нанесения образцов: 4% ДСН, 0,25 М Трис-НСl, рН 6,8; 4 мМ ЭДТА-Na, рН 8,0, 10% глицерина, 0,25 мг/мл бромфенолового синего; (для проведения электрофореза в восстанавливающих условиях добавляли 5% меркаптоэтанола; для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН). Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис-НСl 6,5 г/л, рН 8,3 (для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН рН 7,4). Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 15 минут при 95 °С, наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 25 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля. По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250.

Разделяющий гель 5 минут инкубировали в горячем растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в горячий раствор следующего состава: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0,3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0,45 г/л пятиводного сульфата меди. Затем гель многократно отмывали в горячем растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты, до полного исчезновения фонового окрашивания.

2.3.2. Получение рекомбинантных белков

По 10 мл соответствующего инокулята ночной культуры клеток вносили в 1 л жидкой среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, и выращивали клетки при +37 °С на качалке при 200 об./мин до оптической плотности, равной 0,8 при 600 нм. Затем добавляли индуктор изопропилтиогалактопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали инкубацию клеток при +37 °С на качалке в течение 4 ч. Для сбора клеток центрифугировали 1 л культуры каждого вида штамма-продуцента (10 мин, 3,5 тыс. об./мин) и осажденные клетки суспендировали в семикратном объеме буферного раствора (20 мМ Tris-HCl, 0,15 М NaCl, 0,002% лизоцим pH 8,5). Для получения телец включения суспензию клеток пятикратно обрабатывали ультразвуком в ледяной бане, затем центрифугировали при +4 °С, 20 000 g в течение 1 ч. Присутствие целевых белков в осадках и супернатантах контролировали электрофорезом в 10% ДСН-ПААГ.

Согласно результатам электрофоретического анализа целевые белки, формируют нерастворимые тельца включения (ТВ) независимо от температурных условий индукции культуры и типа буфера, использованного при разрушении клеток. Осадок, содержащий ТВ после центрифугирования, промывали буферным раствором 60 мл 20 мМ Трис-HCl, 1% Triton X-100, 0,1% ДСН, pH 8,5 и центрифугировали 40 мин 10000 g. Вновь полученный осадок промывали буферным раствором 60 мл 20 мМ Трис-HCl, 1 М NaCl и центрифугировали 40 мин, 10000 g. Выход отмытых ТВ рекомбинантных белков – приблизительно 0,64 г. Отмытые осадки ТВ рекомбинантных белков использовали для проведения хроматографии на Ni-агарозе в денатурирующих условиях.

Очистка растворенных телец включения рекомбинантных белков с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-агарозном сорбенте, ТВ выделенные из 2 г клеток *E. coli* BL21(DE3), растворяли в 100 мл 50 мМ Трис-HCl буферного раствора, содержащего 8 М мочевины, 0,15 М хлористый натрий и 0,02 М имидазол, pH 9,0. После центрифугирования и фильтрования раствор белка наносили на предупакованную колонку с Ni-агарозой (2×5 мл NiTrap™ Chelating HP, Cytiva, США), уравновешенную исходным буферным раствором. Для уравновешивания сорбент промывали 50 мл исходного буферного раствора. Связавшиеся белки элюировали имидазолом в градиенте концентрации от 20 до 400 мМ в исходном буферном растворе, объем градиента 70 мл (35×35). Фракции, содержащие очищенные белки, объединяли и использовали на стадии рефолдинга и очистки на Q-сефарозе.

Ренатурация и очистка рекомбинантного белков на Q-сефарозе Объединенный элюат рекомбинантных белков, полученный после хроматографии на Ni-агарозе

(концентрация белка 0,4 мг/мл), подвергали ступенчатому диализу, постепенно снижая концентрацию мочевины до значения 1,5 М в 20 мМ Трис-НСl буферном растворе, содержащем 0,15 М хлористый натрий, рН 7,8. Полученный раствор центрифугировали (30 мин, 5000 g), фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм и наносили на предупакованную колонку с Q-сефарозой (5 мл ×2 HiTrap™ Q FF, Cytiva, США), уравновешенную в 20 мМ Трис-НСl буферном растворе, содержащем 0,15 М хлористый натрий и 1,5 М мочевины, рН 7,8.

Целевой белки, не связавшиеся с сорбентом, собирали единой фракцией и подвергали очистке на обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка Delta-Pak™ HPI C4, 300 Å, 5 мкм, Waters, США) в условиях возрастающего градиента ацетонитрила в 0,1% растворе трифторуксусной кислоты. Хроматографически чистые рекомбинантные белки высушивали в сублимационной сушилке. Чистоту белковых фракций определяли по результатам электрофореза в ПААГ. Белки фильтровали через стерильную мембрану с размером пор 0,22 мкм и высушивали в сублимационной сушильной установке. Очищенные белки хранили при температуре -25 °С.

2.4. Биоинформатические методы

2.4.1. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности для входных данных

Нуклеотидные последовательности кодирующего гена полноразмерной IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы В штамма H44/76 (IgA1pr1) представлены на сайте National Center for Biotechnology Information (NCBI) [188] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под кодами NCBI Reference Sequence (RefSeq) [189]: NC_017516.1 с 1574334 по 1579040 и NCBI Reference Sequence: NZ_AEQZ01000045.1 с 47053 по 42347, данные о первичной структуре данного белка представлены под кодами NCBI Reference Sequence: WP_002221261.1 и GenBank [190]: ADC80147.1.

Были использованы базы данных RefSeq: refseq_protein и refseq_genomes. Кроме того, нуклеотидные последовательности из геномов ряда (см. Приложение А) штаммов *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* были получены из European Nucleotide Archive [191] (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>, доступ 10 июня 2020 г.).

2.4.2. Основные списки штаммов

Для рассмотрения были взяты представленные в разделе “Proteomes” на Universal Protein Resource [118] (<https://www.uniprot.org/>, доступ 30 марта – 3 апреля 2020 г.) штаммы, протеомы которых были указаны как “not-excluded” (“не исключенные”): 1061 штамм

N. meningitidis, 602 штамма *N. gonorrhoeae* и 536 штаммов *H. influenzae*.

2.4.3. BLAST

В этой работе были использованы две программы из семейства BLAST [192,193] в интерфейсе веб-сайта National Center for Biotechnology Information: BLASTP и TBLASTN (доступ в течение 2020 г., BLASTP distance trees перестроены для дополнительных рисунков S1–S3 6 июня 2022 г.). Параметр «Max target sequences» всегда устанавливался на максимально доступное значение (5000 или 20000). Все параметры, которые не упомянуты специально, использовались со значениями по умолчанию.

Всего в рамках данного исследования были проведены следующие расчёты BLAST.

BLASTP (с «filter low complexity regions») по базе данных refseq_protein:

- IgA1pr1 в штаммах *N. meningitidis*;
- IgA1pr1_28-1004 отдельно в штаммах *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*.

BLASTP (без «filter low complexity regions») IgA1pr1_28-1004 совместно в штаммах *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*, по базе данных refseq_protein; результаты для последовательностей со степенью идентичности не менее 80% при полном покрытии были проанализированы в программе Jalview [194–196]: после предварительного выравнивания при помощи программы MAFFT [197] (с параметрами по умолчанию), для последовательности 28-1004 и отдельных её участков (85-145, 194-252, 28-311 и 540-566) была удалена избыточность (remove redundancy).

TBLASTN (без «filter low complexity regions»):

- IgA1pr1 в штаммах *N. meningitidis*, по базе данных refseq_genomes и геномам отдельных штаммов;
- IgA1pr1_28-1004 а) в штаммах *N. meningitidis*, по базе данных refseq_genomes и геномам отдельных штаммов; б) в штаммах *N. gonorrhoeae*, по базе данных refseq_genomes и геномам отдельных штаммов; в) в штаммах *H. influenzae*, по базе данных refseq_genomes;
- Фрагмент IgA1pr1 1-1004 совместно в штаммах *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*, по базе данных refseq_genomes;
- Фрагменты IgA1pr1 28-84, 85-145, 146-193, 194-252, 253-539, 540-566, 567-1004, 567-628, 639-795, 811-1004 отдельно в штаммах *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae* по базе данных refseq_genomes.

2.4.4. Предсказание расположения Т-клеточных эпитопов

Расчеты для прогнозирования расположения МНС-II Т-клеточных эпитопов в первичной структуре фрагмента A²⁸-P¹⁰⁰⁴ IgA1-протеазы ADC80147.1 для организмов человека и мыши BALB/c проводились на IEDB Analysis Resource [198] (<https://www.iedb.org/>, доступ 22 февраля 2023 г.) с использованием программы «T Cell Epitopes – MHC Binding Prediction/Peptide binding to MHC class II molecules» методом «IEDB recommended 2.22» [199–202]. Параметры расчетов включают длину пептида 15 а.о., аллели H2-IA_d и H2-IE_d для мышей и «Full HLA reference set» [203,204] для человека. Для организма человека списки пар «эпитоп-аллель» в вариантах «ранг ≤ 10» и «ранг ≤ 20» были сформированы в списки, соответствующие участкам аминокислотной последовательности A²⁸-P¹⁰⁰⁴, которые необходимо рассматривать и использовать в качестве входных данных для программы «Population Coverage» [205], представленной на веб-сайте IEDB:

- Через онлайн-сервер (доступ 3 апреля 2023 г.) для аминокислотных последовательностей IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴, ее фрагментов E¹³⁵-H³²⁸, W³²⁹-H⁶²², H⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴, W¹⁴⁰-K⁸³³, W³²⁹-P¹⁰⁰⁴ и потенциальных слитых структур (W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴), (W¹⁴⁰-Q²⁹⁹)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴);
- Использование скачиваемой версии программы (версия 3.0.2) – отдельно для каждого эпитопа, расположенного в цепи A²⁸-P¹⁰⁰⁴.

В качестве рассматриваемых географических регионов были выбраны мир в целом, Россия и следующие регионы: Европа, Вест-Индия, Восточная Азия, Северо-Восточная Азия, Южная Азия, Юго-Восточная Азия, Юго-Западная Азия, Восточная Африка, Западная Африка, Центральная Африка, Северная Африка, Северная Америка, Центральная Америка, Южная Америка и Океания. Результаты расчетов в программе Population Coverage исключают аллели HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB4*01:01 и HLA-DRB5*01:01.

2.4.5. Моделирование трехмерных структур

Для IgA1-протеазы из *N. meningitidis* серогруппы В штамма H44/76 (GenBank: ADC80147.1) в полноразмерной форме, в зрелой форме A²⁸-P¹⁰⁰⁴ и в рекомбинантной форме MA²⁸-P¹⁰⁰⁴-LEH₆, а также для рекомбинантных белков, созданных на основе фрагментов первичной структуры этого фермента, с формулами: ME¹³⁵-H³²⁸-LEH₆, MW³²⁹-H⁶²²-LEH₆, MH⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴-LEH₆, MW¹⁴⁰-K⁸³³-LEH₆, MW³²⁹-P¹⁰⁰⁴-LEH₆, M(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEH₆ и M(W¹⁴⁰-Q²⁹⁹)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEH₆ модели трехмерных структур строили в программе AlphaFold2 [206] с использованием ColabFold

v1.5.2 [207] (информация о шаблоне не используется; для всех белков, кроме полноразмерного, верхняя ранговая структура релаксируется с использованием AMBER). Анализ качества полученных моделей проводился с помощью встроенных инструментов AlphaFold2 (predicted Local Distance Difference Test, pLDDT). Программа Swiss PDBViewer 4.1.0 [208] использовалась для наложения и сопоставления (по RMSD между атомами C α) участков моделей.

2.4.6. Предсказание расположения В-клеточных эпитопов

Расположение В-клеточных эпитопов было предсказано на основе данных о третичной структуре фрагмента A²⁸-P¹⁰⁰⁴ модели полноразмерной IgA1-протеазы ADC80147.1, построенной с использованием метода AlphaFold2, описанного в разделе 2.1.3, для линейных и конформационных В-клеточных эпитопов с использованием ElliPro [209] (на онлайн-сервере IEDB), а для конформационных В-эпитопов – методами DiscoTope 2.0 [210] (на онлайн-серверах IEDB и DTU Health Tech, <https://www.healthtech.dtu.dk/>) и SEPPA 2.0 [211] (секретизируемый антиген, в организмах Homo и Mus, на онлайн-сервере лаборатории Cao Zhiwei (<http://www.badd-cao.net/seppa2/index.php>) (доступ 13 марта 2023 г. ко всем серверам, использованным в данном разделе). Параметры, не перечисленные здесь, установлены по умолчанию.

2.5. Иммунологические методы исследований

2.5.1. Определение иммунологической активности рекомбинантных белков

Иммуногенную активность и защитное действие рекомбинантных белков оценивали на самках мышей линии BALB/c (16–18 г) в возрасте 6–7 недель, полученных из питомника Филиала ИБХ РАН (г. Пущино, Московская область). Содержание мышей осуществляли по протоколу IACUC («ИБХ 58а», 15 мая 2015 г.).

Иммунизацию мышей проводили внутривенно в ретроорбитальный синус двукратно в дозе 0,002 г/кг исследуемого белка в концентрации 0,2 мг/мл с интервалом 45 дней без использования адъювантов или других наполнителей. В разные сроки после иммунизации из ретроорбитального синуса с помощью капилляра забирали 100 мкл крови. Размер экспериментальной группы составил 10 животных для каждого белка.

Во всех экспериментах результаты, полученные для рекомбинантных белков, сравнивали с результатами для MA²⁸-P¹⁰⁰⁴-LEN₆ в качестве референтного антигена.

Наличие специфических антител к MA²⁸-P¹⁰⁰⁴-LEN₆ оценивали с помощью

твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА). 0,1 мл MA²⁸-P¹⁰⁰⁴-LEH₆ в Na-карбонатном буферном растворе (20 mM Na₂CO₃, 20 mM NaHCO₃, pH 9,6) в концентрации 20 мкг/мл связывали с лунками 96-луночного планшета Nunc Maxisorp (ThermoFisher, USA) и инкубировали в течение 16 ч при 4 °С. Затем в лунки с антигеном добавляли 150 мкл блокирующего раствора (0,1% казеина в PBST 0,1%), и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. Лунки промывали четыре раза фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1% Tween-20 PBST. Затем в лунки добавляли по 0,1 мл образцов сыворотки в двойных разведениях в блокирующем буферном растворе, начиная с разведения 1:10. После инкубации планшета в течение 1 ч при 37 °С растворы сыворотки удаляли, промывали четыре раза раствором PBST и в каждую лунку добавляли 0,1 мл раствора конъюгата пероксидазы хрена – антитела козы к общим иммуноглобулинам мыши IgA или IgG. В каждую лунку добавляли 0,1 мл раствора (50% ортофенилендиамина в цитратном буферном растворе, pH 5, содержащем 0,014% перекиси водорода) и инкубировали в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,3 М H₂SO₄. Оптическую плотность определяли при длине волны 492 нм с использованием микропланшетного ридера Thermo Scientific Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific, США).

Титры антител рассчитывали из оптических плотностей, измеренных для сывороток иммунизированных мышей, по сравнению с соответствующими значениями, полученными при титровании сывороток неиммунизированных животных.

2.5.2. Определение протективной активности рекомбинантных белков

Для заражения животных использовали живые вирулентные культуры менингококков серогрупп А (штамм А208), В (штамм Н44/76) или С (штамм С0638) в дозе $0,25 \times 10^6$ микробных клеток (м.к.). Уровень бактериемии у инфицированных мышей оценивали через 4 ч после заражения.

Микробную культуру выращивали на плотной питательной среде Tryptase Soy Agar (TSA-F) с 5% сыворотки крови телят при температуре +37 °С, в атмосфере 5–10% CO₂ и высокой влажности (98%). После инкубации колонии смывали с поверхности питательной среды изотоническим раствором NaCl и готовили суспензию с концентрацией 1×10^9 м.к./мл, что соответствует оптической плотности 0,23 при длине волны 610 нм на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer Kinetic (Eppendorf, Германия). Затем полученную суспензию микробов разводили раствором декстрана железа (Sigma, США), pH 7,2, при температуре +37 °С до концентрации $0,5 \times 10^6$ м.к./мл из расчета 1,6 мг/мл железа.

Заражение мышей микробной суспензией проводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. Через четыре часа после заражения из ретроорбитального синуса мышей с помощью капилляра индивидуально собирали 10 мкл крови. Методом серийных разведений в круглодонных 96-луночных пластиковых планшетах полученную кровь разводили изотоническим раствором NaCl в 1125 раз и по 50 мкл полученного раствора засеивали в 12-луночные планшеты с плотной питательной средой TSA-F с 5% сыворотки крови телят. Планшеты с микробным посевом инкубировали при температуре +37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 18 ч. После окончания инкубации в каждом образце крови подсчитывали количество колониеобразующих клеток (КОЕ) и рассчитывали среднее количество КОЕ в группе.

Активность введенных мышам белков оценивали по уровню бактериемии (количество КОЕ в крови) у иммунизированных животных после заражения в сравнении с этими показателями в контрольной группе (неиммунизированные мыши).

Протективную активность белков оценивали по уровню бактериемии у иммунизированных мышей в сравнении с контрольными (не иммунизированными) мышами по следующей формуле: $100\% \times (1 - \text{КОЕ}_{\text{эксперимент}}/\text{КОЕ}_{\text{контроль}})$. Статистическую обработку результатов проводили в программе OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, США), используя статистику ANOVA с критерием Бонферрони (One-Way ANOVA для анализа титра антител и Two-Way ANOVA для анализа протективности).

2.6. Липосомные препараты

Фосфолипид, дипальмитойл фосфатидилхолин (DPPC) растворяли в циклогексане, для образования прозрачного раствора. Раствор удаляли вакуумной сушкой для получения сухого порошка. Порошок гидратировали при 60-65 °C в (50-1000 мМ), раствором лимонной кислоты и взбалтывали в течение часа для получения неоднородных многоламнарных пузырьков. Размер полученных пузырьков уменьшали микрофлюидизатором высокого давления для получения липосом. Образец полученных липосом разбавляли в 200 раз 0,9% раствором NaCl и выявлялся с помощью НаноZS (динамическое светорассеяние). Экстралипосомальный буферный раствор удаляли посредством ультрафильтрационного аппарата для образования динамического трансмембранного градиента.

Раствор белка 11 с концентрацией (4 мг/мл), а также смеси белка 11 и соответствующей ему ДНК (12 мг/мл) добавляли в пустые липосомы при соответствующем массовом соотношении липосомы/антиген 1:3 для получения частиц 200 нм, загрузку лекарственным препаратом проводили при 25 °C. После инкубации в течение часа и

активном перемешивании (vortex) смесь подвергалась лиофилизации

Для приготовления образцов использовали метод гидратации тонкой пленки. В пластиковую пробирку добавляли необходимое количество DPPC. Полученную смесь растворяли в циклогексане, затем растворитель выпаривали в потоке воздуха. После выпаривания образец может содержать небольшое количество («следы») растворителя, это может повлиять на результаты экспериментального исследования. Поэтому для полного удаления растворителя образцы помещали в лиофилизатор (установка для сублимационной сушки) на 24 часа. Приготовленная и высушенная на дне пробирки пленка из исследуемых компонент, гидратировалась при добавлении необходимого количества стерильной воды для инъекций. При гидратировании система тщательно перемешивалась с помощью шейкера (вортекса), далее производили 3-4 цикла замораживания-оттаивания. Для достижения большей однородности системы и организации малых мультиламеллярных липосом использовали дополнительные стадии постобработки, включая обработку ультразвуком в течение 20. В результате для исследования, были приготовлены следующие образцы: суспензия липосом из фосфатидилхолина (ФХ) (содержание липида в воде составило 50 вес. %).

3. Результаты

3.1. BLAST

3.1.1. 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 распространённости 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*.

Для решения первой задачи требовалось, используя подход, способный выявить наличие или отсутствие данной последовательности в геноме каждого рассматриваемого штамма, выбрать ограниченный список штаммов *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae* с достоверно известными геномами. Этот список должен был иметь достаточно широкий охват, чтобы обеспечить репрезентативность разнообразия интересующих нас протеомов. В качестве совокупности штаммов, подлежащих исследованию, использовались те, чьи протеомы не были исключены из базы данных UniprotKB [118] для микроорганизмов *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae* (см. раздел Proteomes в Universal Protein Resource (<https://www.uniprot.org/>)). Данный источник сочетает высокое качество информации с широким охватом штаммов. Также, для этих штаммов указана представленность их геномов в базе данных RefSeq [189], что позволило проведение дальнейшего исследования с использованием этой базы данных.

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) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [192,193] для получения данных о последовательностях из базы данных RefSeq.

3.1.2. 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 [166]. Для двух последних белков характерно 34–40% идентичности первичных структур и отсутствие протяженных схожих 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. 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 (см. Табл. 3.1.2.1). Это может быть связано как с артефактами секвенирования, так и с мутациями, приводящими к сдвигу рамки считывания. Хотя количественные оценки степени идентичности по первичной структуре для таких фрагментов ненадежны, визуальный анализ выравниваний подтверждает их практически полное соответствие полноразмерным аналогам.

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 секреторируемой части зрелого фермента [9,111,137].

Таблица 3.1.2.1. Результаты TBLASTN для 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*.

Фрагментированность данных	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
Не фрагментированы	979	75,59%-100,00%	1013	87,20%-100,00%	590	87,10%-88,51%	124	85,21%-93,58%
Фрагментированы в рамках одного идентификатора последовательности Genbank	68	68,70%-100,00%*	39	85,63%-100,00%*	11	83,97%-97,89%*	12	79,33%-93,54%*
Фрагментированы в различных идентификаторах последовательностей Genbank	13	68,83%-100,00%*	8	88,74%-100,00%*	1	76,58%-94,58%*	1	91,08%*

* Для фрагментированных данных значения степени идентичности являются локальными и из-за возможного включения избыточных областей в сравнение менее точными.

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

3.1.3.1. Зрелый фермент

Зрелая IgA1-протеаза (AE_28–1004), первичная структура которой была использована нами (см. Рис. 3.1.3.1.1) в качестве входных данных для TBLASTN, стала основой для поиска подобных белков, кодируемых в геномах *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*. Кроме трёх вышеназванных микроорганизмов данный фермент никакой другой организм не продуцирует. Был проведён подробный анализ белков, гомологичных зрелой AE_28–1004, закодированных в геномах каждого из трех вышеназванных микроорганизмов.

ALVRDDVDYQIFRDFEAENKGFVVGATDLSVKNKQGQNI GNALSNVPMIDFSVADVNRRTLTVI
 DPQYAVSVKHVKGDEISYYGHHNGHLDVSNDENEYRSVAQNDYEPNKNWHHGNQGRLEDYNMAR
 LNKFVTEVAPIAPTSAGGGVETYKDKNRFSEFVRVGAGTQFEYNSRYNMTELSRAYRYAIAIGTP
 YQDVNVTSNLNQEGLIGFGDNSKHHSPKLEKVL SQNAL TNYAVLGDSGSPLFAYDKQEKRWVF
 LGAYDYWAGYQKNSWQEWNIYKKEFADKIKQRDNAGTIKNGEHHWNI TFGTNSKIGSTAVRLA
 GNEKDANNGQNVTFEDNGTLVLDQNI NQGAGGLFFKGDYTVKGINNDITWLGAGIDVTDGKKVV
 WQVKPNPNDRLAKIGKGTLEINGTG V NQGQLKVG DGTVILNQQADADKKVQAFS QVGIVSGRGT
 LVLNSSNQINPDNLYFGFRGGRLDANGNDLTFEHIRNVDEGARIVNHNTSHASTITLTGKSLIT
 NPNSLSVHSIQNDYDEDDYSYYRPRRPI PQGKDL YKKNYRYALKSGGSVNAPMPENGV TENN
 DWVFMGYTQEEAKKNAMNHKNNQRI SGFSGFFGEENGKGHNGALNLFNGKSAQNRFL LTGGTN
 LNGKISVTQGNVLLSGRPTPHARDFVNKSSARKDAHFSKNNEVVFEDDWINRTFKAAEIAVNQS
 ASFSSGRNVSNITANITATDNAKVN LGYKNGDEVCVRS DYTGYVTCNTGNLSDKALNSFGATQI
 NGNVNLNQNAALVLGKAALWGQIQGQGN SRVSLNQH SKWHLTGDSQVHNLSLADSHIHLNNASD
 AQSANQYHTLKINHLSGNGHFHYLTHLAENLGDKVLVKESASGHYQLHVQDKTGEPNQEGLNLF
 DASSVQDRSRLSVSLANNHVLDL GALRYTIKTENGI TRLYN PYAENRRRVKPVPS PATNTASQAQ
 TDSAQIAKPQNI VVAPP

Рисунок 3.1.3.1.1. Аминокислотная последовательность IgA1-протеазы из *Neisseria meningitidis* штамм H44/76 на участке A²⁸-P¹⁰⁰⁴
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_002221261.1?report=fasta&from=28&to=1004.

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. Для фрагментированных данных наблюдается похожая картина (см. Табл. 3.1.2.1).

При помощи TBLASTN, в геномах всех 602 рассмотренных нами штаммов *N. gonorrhoeae* были обнаружены гены IgA1-протеазы AE_28–1004. Из них 590 демонстрируют не фрагментированные данные со степенью идентичности первичной структуры в интервале от 87,10% до 88,51% при полном покрытии последовательности (см. Табл. 3.1.2.1). Дополнительно, BLASTP продемонстрировал 34–40% степени идентичности по первичной структуре для белков App, не обладающих длинными участками, высоко идентичными AE_28–1004, вследствие чего мы не рассматриваем их в качестве объектов дальнейшего исследования.

BLASTP в *H. influenzae* показывает намного более разнообразную картину. 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). Присутствуют также белки Nap, обладающие низкой степенью идентичности относительно AE_28–1004 и не имеющие длинных схожих с ней участков. TBLASTN 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. 3.1.2.1). Для фрагментированных данных наблюдалась схожая картина.

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 [8]) вне зависимости от серогруппы и штамма производящего её организма, она рассматривается нами в качестве основы для проектирования действующего вещества потенциальной противоменингококковой вакцины.

N. gonorrhoeae и часть штаммов *H. influenzae* также продуцируют данный фактор вирулентности со степенью идентичности по первичной структуре на участке A²⁸-P¹⁰⁰⁴ более 85% [8], что позволяет рассматривать возможность обеспечения защиты проектируемой вакциной и от этих патогенов.

Основным препятствием при использовании этого фермента 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.

3.1.3.2. 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 AE_28–1004 – 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 приходятся 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*

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 соответствующих участков	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%
	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%

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

Участок 28-311 (согласно базе данных семейств белков, доменов белков и функциональных участков InterPro, здесь расположен «Peptidase family S6 domain», под индексом IPR030396) демонстрирует два варианта кластеризованных последовательностей, что хорошо согласуется с литературными данными о двух сайт-специфических типах IgA1-протеаз из *Neisseria 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 [10]. В перспективе, может представлять интерес и потенциальная двухкомпонентная вакцина с участками, характерными для обоих типов фермента. Таким образом, в дополнение к участкам, высоко консервативным во всех штаммах *Neisseria meningitidis*, при проектировании протективного антигена мы не отвергаем и участки 85-145 и 194-252. Участок 540-566 (по той же нумерации) показал себя в большем количестве вариантов, что является дополнительным критерием против использования данного участка.

3.2. Эпитопы

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 [3,8].

Для дальнейших расчётов по предсказанию расположения эпитопов, мы используем в качестве шаблона для входных данных IgA1-протеазу из *N. meningitidis* серогруппы В штамма H44/76. Она относится к типу 1 по расщеплению IgA1 (как было упомянуто выше, данные IgA1-протеазы также способны расщеплять IgG3, что делает производящие их штаммы менингококка более эпидемиологически опасными, чем производящие IgA1-протеазу типа 2). Высокая степень идентичности первичной структуры вышеописанных IgA1-протеаз позволяет разбить их множество на два класса эквивалентности по типу расщепления IgA1, и для нас был оптимален выбор представителя из IgA1-протеаз 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 протяжёнными 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 (<http://www.badd-cao.net/index.html>), содержащий программный пакет SEPPA. При выборе между SEPPA 2.0 (<http://www.badd-cao.net/seppa2/index.php>) [211] и SEPPA 3.0 (<http://www.badd-cao.net/seppa3/index.html>) [212] выбор был сделан в пользу первого, поскольку последний не различает эпитопы организмов человека и мыши.

3.2.1. Распределение Т-клеточных эпитопов в первичной структуре IgA1-протеазы

В результате расчётов в программе «Т Cell Epitopes – MHC Binding Prediction/Peptide binding to MHC class II molecules» методом «IEDB recommended 2.22» для первичной структуры IgA1-протеазы A²⁸-P¹⁰⁰⁴ из *N. meningitidis* серогруппы В штамма H44/76 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. 3.2.1.1. 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.

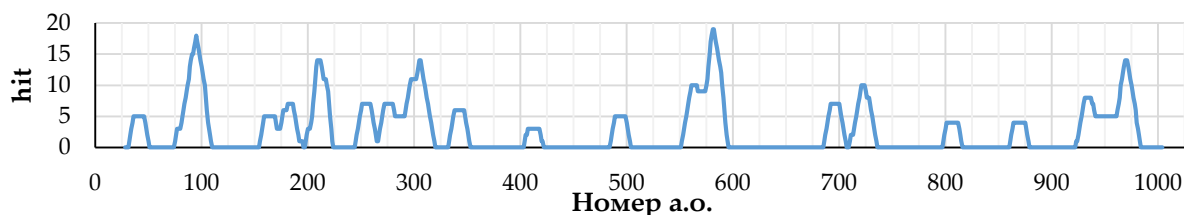


Рисунок 3.2.1.1. Количество (hit) предсказанных комбинаций «эпитоп-аллель» на цепи A²⁸-P¹⁰⁰⁴, в которых участвует данный аминокислотный остаток (для комбинации МНС-II Т-клеточных эпитопов с аллелями мыши BALB/c; ранг ≤ 20).

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. 3.2.1.2.

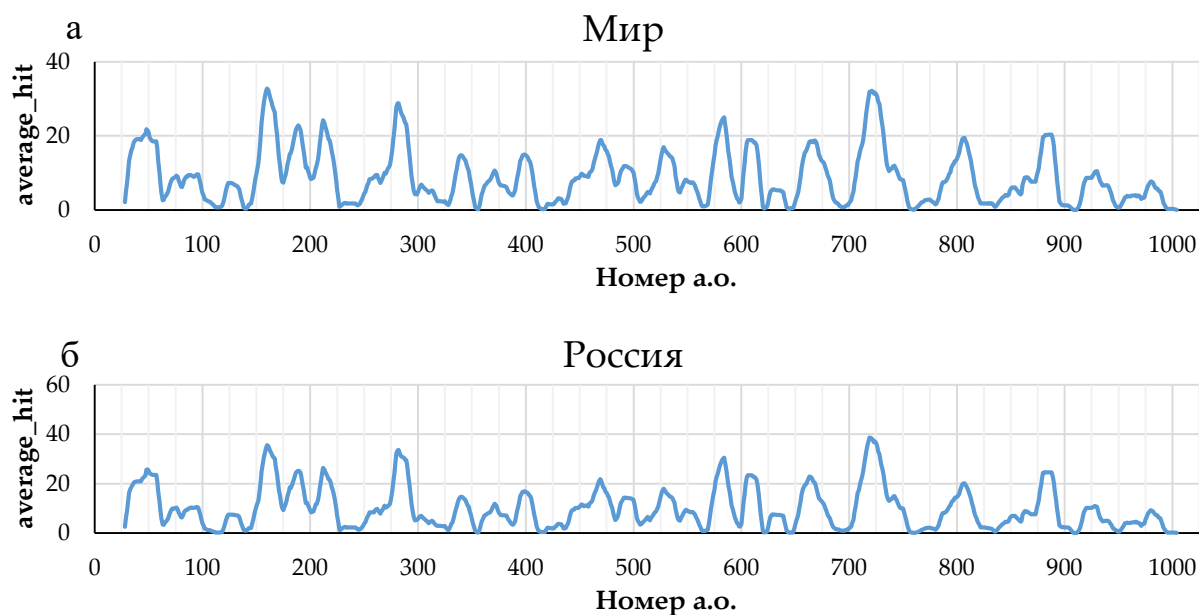


Рисунок 3.2.1.2. Суммарное значение среднего количества (*average_hit*) предсказанных комбинаций “эпитоп-аллель” на цепи $A^{28}-P^{1004}$, в которых участвует данный аминокислотный остаток (для комбинации МНС-II Т-клеточных эпитопов с аллелями человека; ранг ≤ 20) для всего мира (а) и для России (б).

Результаты предсказания МНС-II Т-клеточных эпитопов для мышей хорошо согласуются с протективными свойствами рекомбинантных белков ME¹³⁵-H³²⁸-LEN₆ и MH⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴-LEN₆, но не объясняют отсутствие иммуногенных и протективных свойств белка MW³²⁹-H⁶²²-LEN₆ [160]. Прогнозируемое распределение МНС-II Т-клеточных эпитопов для людей гораздо более однородно, чем для мышей (см. Рис. 3.2.1.1 и 3.2.1.2), что затрудняет использование этих данных для выбора крупных фрагментов (более 100 а.о.) протеазы, однако позволяет локально оптимизировать границы фрагментов, выбранных иным методом.

3.2.2. Распределение конформационных В-клеточных эпитопов в третичной структуре IgA1-протеазы

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 трёх моделей (зрелого фермента, либо участков $A^{28}-P^{1004}$ его рекомбинантной формы и полноразмерной формы), построенных с помощью AlphaFold2 (обладающей наилучшими прогностическими показателями по предсказанию трехмерных структур белковых молекул согласно CASP14 [206]). Сопоставление этих моделей приведено на Рис. 3.2.2.1. Оно осуществлялось попарным наложением моделей по α -атомам, для каждой пары высчитывалось среднеквадратическое отклонение (RMSD) в

расположении этих атомов. Значение RMSD для пары $A^{28-P^{1004}}$ и $MA^{28-P^{1004}}-LEN_6$ составляло $0,79 \text{ \AA}$, для пары полноразмерной формы и $MA^{28-P^{1004}}-LEN_6$ – $0,51 \text{ \AA}$, а для пары полноразмерной формы и $A^{28-P^{1004}}$ – $0,99 \text{ \AA}$. Этот результат показал эквивалентность всех трёх моделей, что позволило в дальнейших расчетах конформационных эпитопов обходиться только одной из них. А именно, участком $A^{28-P^{1004}}$ модели полноразмерной формы IgA1-протеазы, поскольку она имеет более удобное для данных расчётов расположение гибкой цепи на участке 967-1004.

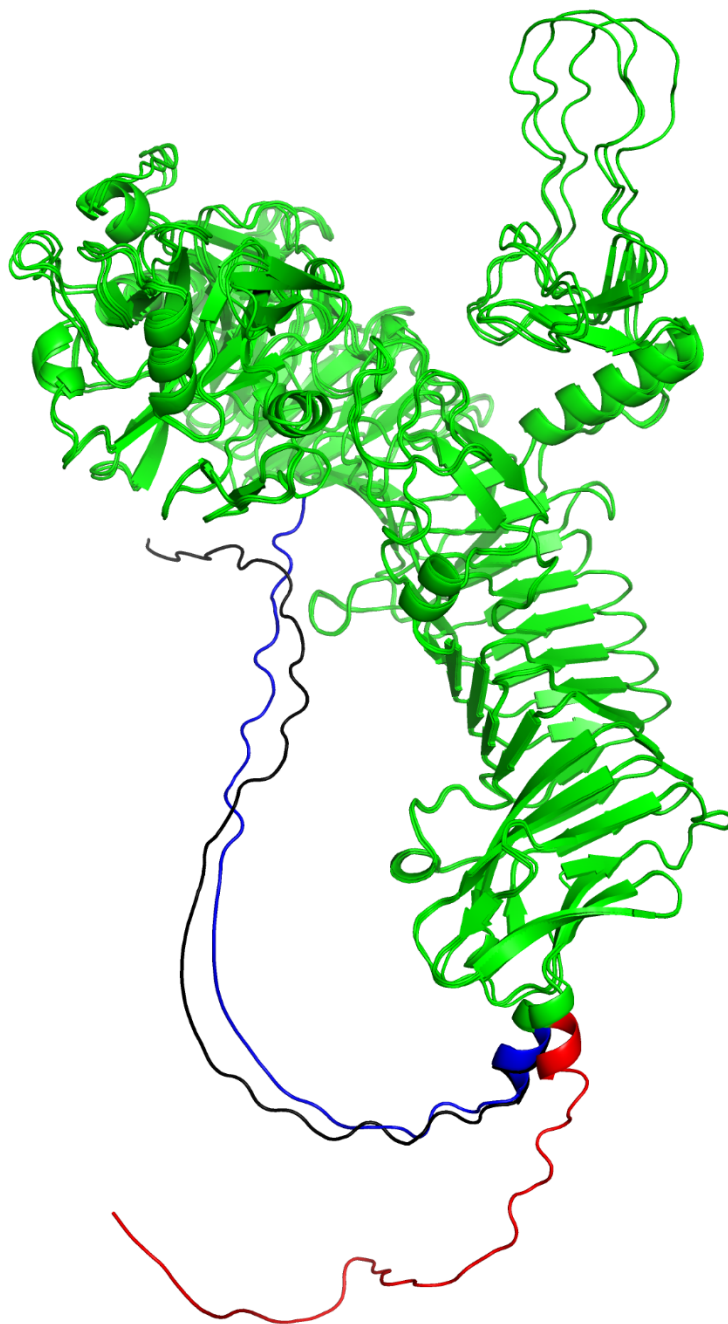


Рисунок 3.2.2.1. Наложение области 28-966 3D-моделей IgA1-протеазы, построенных в AlphaFold2. Модели белков $A^{28-P^{1004}}$ и $MA^{28-P^{1004}}-LEN_6$ наложены на модель белка ADC80147.1 (показана область $A^{28-P^{1004}}$) в области 28-966. Наложенные области

окрашены в зеленый цвет. Не наложенные области окрашены в красный (ADC80147.1), синий ($A^{28}-P^{1004}$) и черный ($MA^{28}-P^{1004}-LEH_6$).

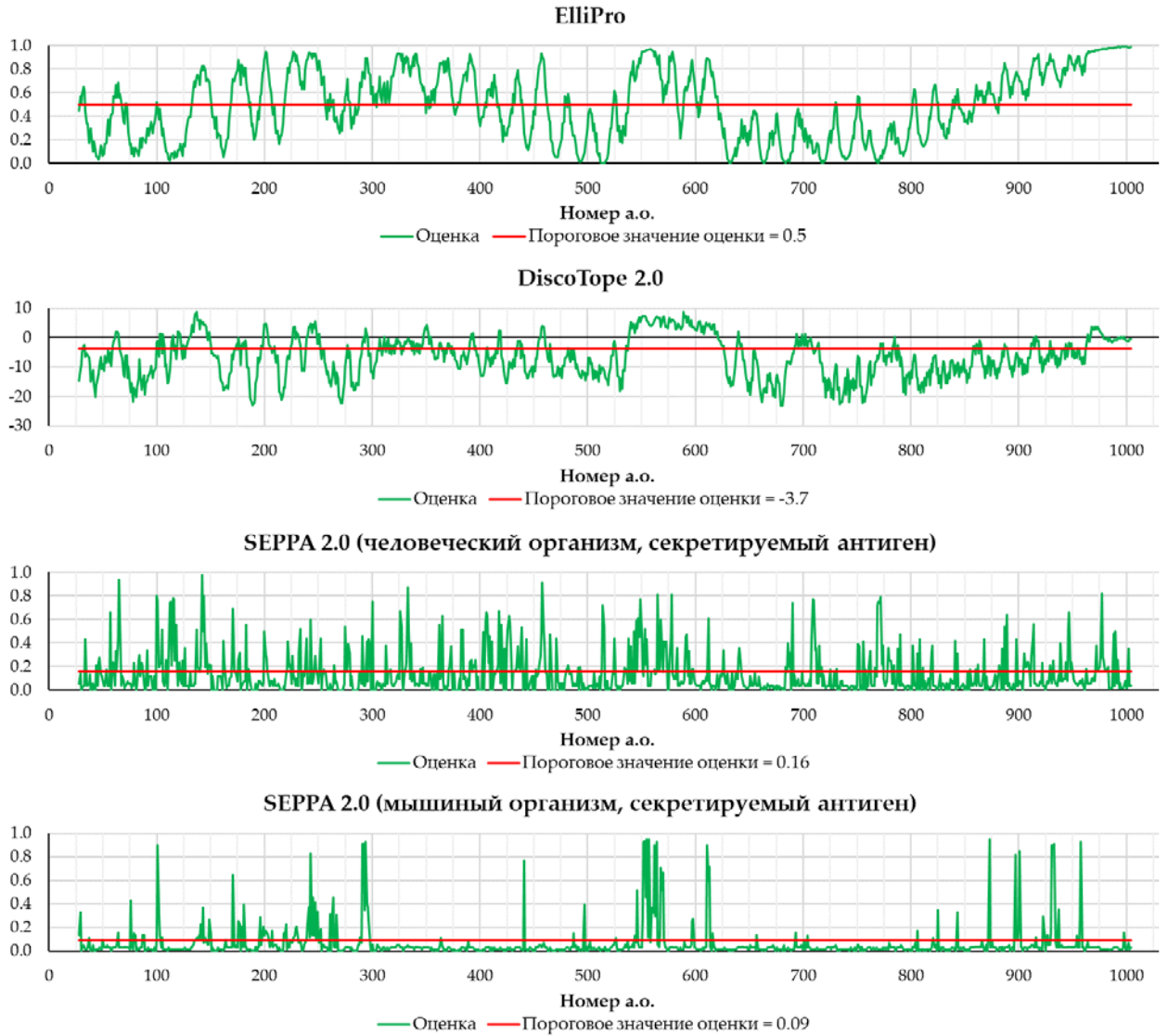


Рисунок 3.2.2.2. Двумерные диаграммы распределения аминокислотных остатков, включенных в предсказанные конформационные B-клеточные эпитопы на поверхности участка $A^{28}-P^{1004}$ IgA1-протеазы, с пороговыми значениями (thresholds) по умолчанию.

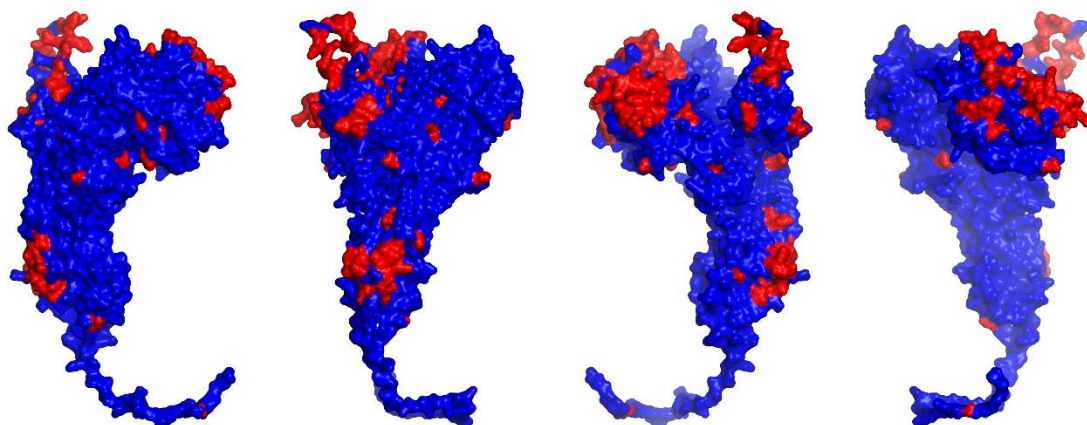


Рисунок 3.2.2.3. Распределение аминокислотных остатков, включенных в конформационные В-клеточные эпитопы, предсказанные в SEPPA 2.0 (для секретируемого антигена, с порогами по умолчанию) для поверхности области $A^{28}-P^{1004}$ IgA1-протеазы ADC80147.1, в организме человека. Аминокислотные остатки, принадлежащие эпитопам, обозначены на модели 3D структуры красным цветом.

Результаты расчетов в программах ElliPro и DiscoTope 2.0, продемонстрировали высокое сходство (см. Рис. 3.2.2.2). Для программы SEPPA 2.0, учитывающей вид организма-хозяина, картины распределения эпитопов для человека и мыши различались; трёхмерная картина распределения данных эпитопов приведена на Рис. 3.2.2.3. 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, приведённые в виде 2D-диаграмм, подходят для стратегического выбора фрагментов $A^{28}-P^{1004}$, 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 $E^{135}-N^{328}$, $W^{329}-N^{622}$ и $N^{835}-P^{1004}$, и практически отсутствуют в интервале $K^{623}-W^{834}$. Последний интервал с этой точки зрения не выглядит многообещающим.

3.2.3. 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 трёх наиболее перспективных участках, расположенных приблизительно в первой, второй и четвёртой 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. 3.2.3.1.

Таблица 3.2.3.1. Свойства IgA1-протеазы MA²⁸-P¹⁰⁰⁴-LEH₆ и рекомбинантных белков, созданных на основе её фрагментов.

Белок	Длина, а.о.	Молекулярная масса, Да ¹	pI ^{1,2}
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

¹Значения получены с помощью <https://www.protparam.net/index.html> [213];

²На основе значений pKa из работы Bjellqvist et al. [214].

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. 3.2.3.1). Результаты наложения представлены в виде RMSD в Табл. 3.2.3.2.

Таблица 3.2.3.2. RMSD (по атомам Ca) между wybranными участками моделей третичной структуры исследуемых рекомбинантных белков.

Белок	Нумерация белка	Участок наложения	RMSD [Å] между участками наложения M(A ²⁸ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆ (protein 1) и укороченных белков
M(E ¹³⁵ -H ³²⁸)-LEH ₆	Белок 9	Gly ¹⁴³ -Asp ³¹⁶	1,37
M(W ³²⁹ -H ⁶²²)-LEH ₆	Белок 10	Gln ³⁵⁷ -Thr ⁵³³	0,36
		Arg ⁵⁶⁶ -Ala ⁶¹⁵	0,23
M(H ⁸³⁵ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆	Белок 4	His ⁸³⁵ -Ala ⁹⁶⁶	0,52
M(W ¹⁴⁰ -K ⁸³³)-LEH ₆	Белок 8	Gly ¹⁴³ -Thr ⁵³³	0,90
		Arg ⁵⁶⁶ -Ala ⁶¹⁵	0,23
		Phe ⁶²⁸ -Lys ⁸³³	0,61
M(W ³²⁹ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆	Белок 3	Gln ³⁵⁷ -Thr ⁵³³	0,29
		Arg ⁵⁶⁶ -Ala ⁶¹⁵	0,26
		Phe ⁶²⁸ -Ala ⁹⁶⁶	0,47
M(W ¹⁴⁰ -H ³²⁸)-(W ⁴¹² -D ⁶⁰⁴)-(Y ⁸⁶⁶ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆	Белок 11	Gln ¹⁴⁵ -Asp ³¹⁶	1,37
		Trp ⁴¹² -Thr ⁵³³	0,47
		Tyr ⁸⁶⁶ -Ala ⁹⁶⁶	0,34
M(W ¹⁴⁰ -Q ²⁹⁹)-(Y ⁸⁶⁶ -P ¹⁰⁰⁴)-LEH ₆	Белок 13	Phe ¹⁶⁶ -Tyr ²⁸⁷	2,71
		Tyr ⁸⁶⁶ -Ala ⁹⁶⁶	0,38

Модель N-концевой части белка 13 (RMSD = 2,71 Å), согласно pLDDT, не является достаточно надежной, и к полученным с её помощью результатам следует относиться с осторожностью. Для всех рассматриваемых участков, имеющих достоверные модели третичной структуры, значения RMSD не превышают 1,37 Å (Рис. 3.2.3.1, Табл. 3.2.3.2). Таким образом, все достоверные участки построенных нами моделей укороченных белков сохраняют третичную структуру, характерную для соответствующих участков зрелой IgA1-протеазы.

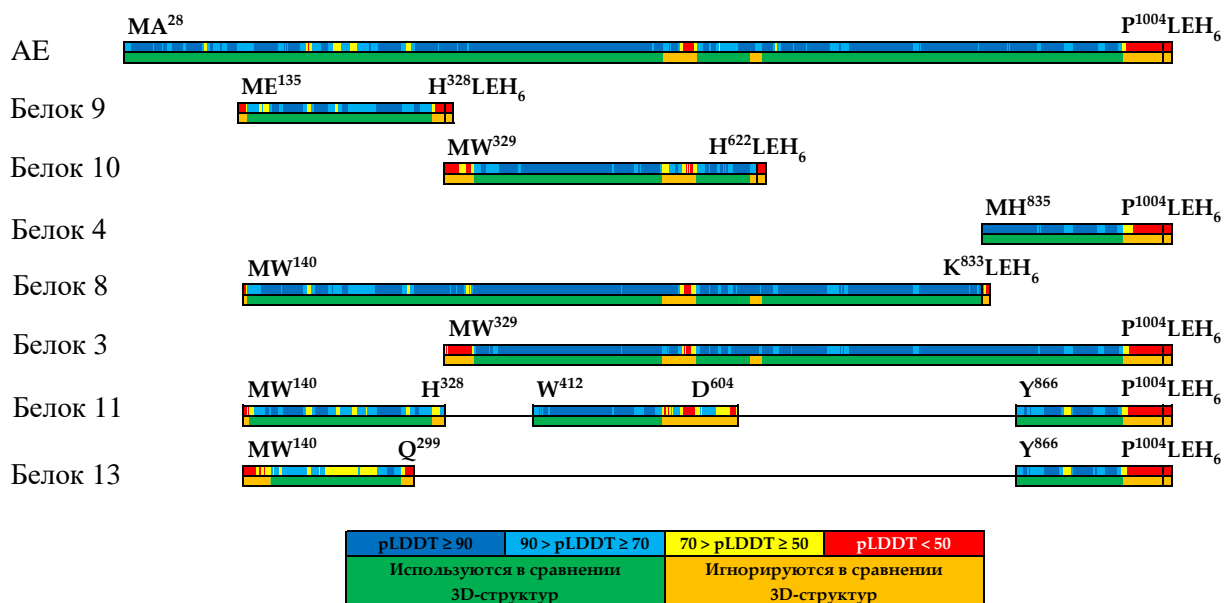


Рисунок 3.2.3.1. Двухуровневое схематическое изображение исследуемых белков, выровненных по первичной структуре. Верхние половины схематических изображений белков окрашены в соответствии со значениями $pLDDT$: синий для $pLDDT \geq 90$ (высокая точность), голубой для $90 > pLDDT \geq 70$ (средняя точность для боковых цепей, хорошая точность для основной цепи), желтый для $70 > pLDDT \geq 50$ (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 [215]). Нижние половины окрашены в зелёный и оранжевый цвета, при этом области, выбранные для сопоставления на основе RMSD, окрашены в зелёный цвет.

3.3. Нарботка, 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. Индукцию белков осуществляли при +37 °C на качалке при 200 об/мин, в течение 4 часов, в присутствии индуктора (IPTG) в концентрации 5 мМ. Белки индуцировались внутри клеток и в результате суперэкспрессии формировали нерастворимые агрегаты – тельца включения (ТВ). Для предварительной очистки белковые осадки, содержащие ТВ, промывались буферными растворами, содержащими детергенты Triton X-100 и/или ДСН, а также раствором, содержащим 1 М NaCl. Для выделения и очистки рекомбинантных белков из отмытых ТВ использовали металл-аффинную хроматографию на никелевом сорбенте с помощью предупакованной хроматографической колонки. Элюцию целевого белка с аффинного сорбента осуществляли в условиях линейного градиента концентрации имидазола от 0 до 500 мМ. Фракцию, содержащую максимальное количество целевого белка, подвергали дальнейшей очистке.

Для осуществления данной процедуры применяли буферные растворы ТВ с большим количеством хаотропного агента (8 М мочевины), что повлекло за собой необходимость его удаления из состава финальных растворов для инъекций.

Удаление хаотропного агента осуществляли трёхступенчатым диализом со снижением концентрации мочевины по схеме: от 8 М до 6 М, от 6 М до 4 М и от 4 М до 2 М. В растворе, содержащем 2 М мочевины, проводили дополнительную очистку белков на хроматографической колонке с ионообменным сорбентом Q-сефарозой FF, при этом целевой белок элюировался со свободным объёмом колонки. Финальную очистку и одновременное удаление мочевины осуществляли на обращённо-фазовой C4 ВЭЖХ колонке в линейном градиенте ацетонитрила. Целевые белки на этапе очистки с помощью ВЭЖХ собирали единым пиком.

Была разработана единая методика выделения и очистки созданных нами новых рекомбинантных белков в растворимой форме. Общая схема очистки полученных белков приведена на Рис. 3.3.1.

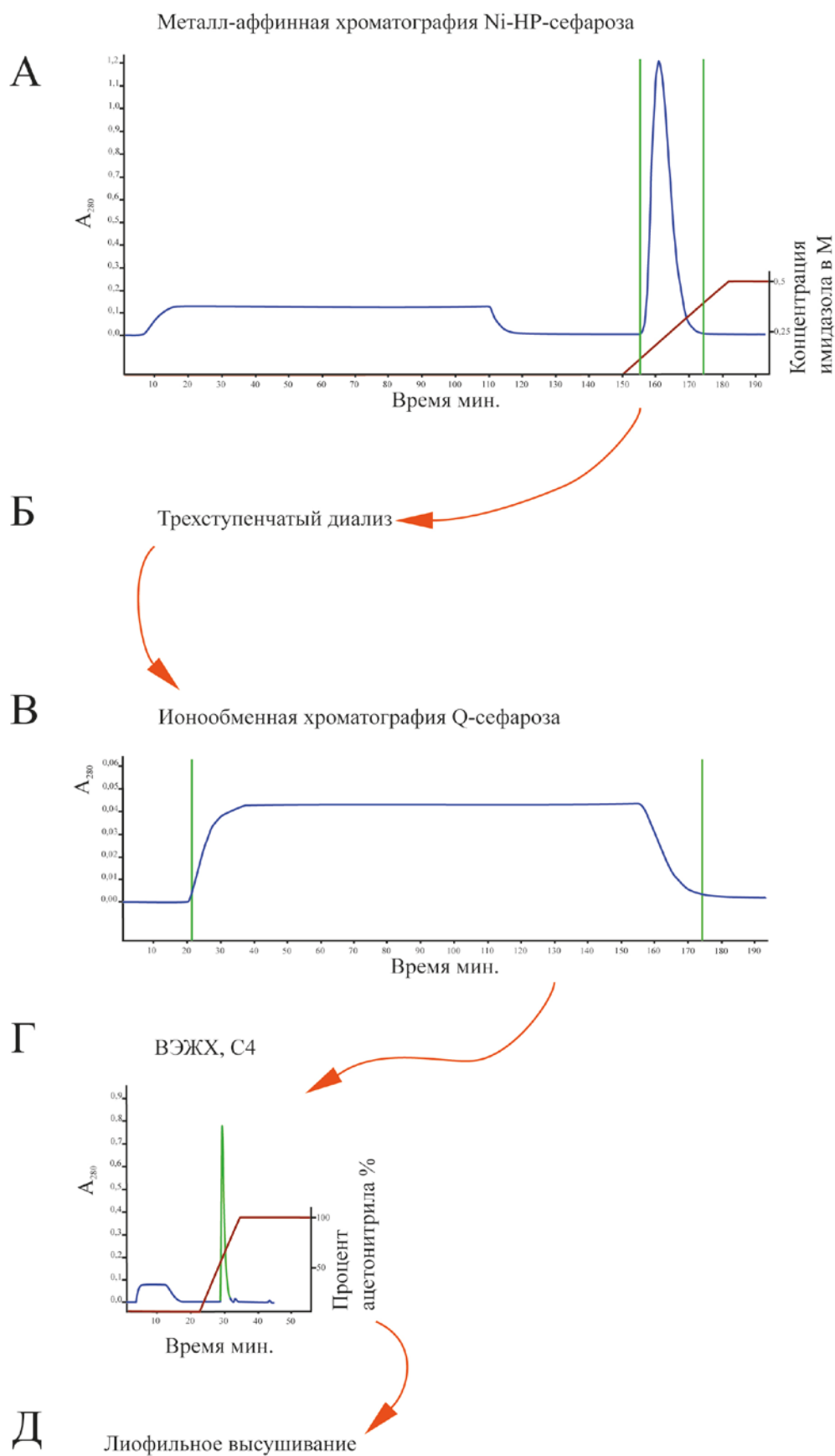


Рисунок 3.3.1. Схема единого процесса очистки белковых препаратов со следующими стадиями: А) металл-аффинная хроматография в градиенте имидазола, Б) снижение концентрации мочевины с 8 до 2 М посредством ступенчатого диализа, В) анионообменная очистка, Г) очистка на обращенно-фазовой ВЭЖХ колонне в градиенте ацетонитрила и

Д) высушивание готового препарата на лиофильной сушильной установке.

В рамках данной схемы очистки различными являются только значения величины рН, которые выбираются согласно расчётному значению рI для каждого белка индивидуально и сохраняется таковым 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. 3.3.2). Полученные препараты хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C .

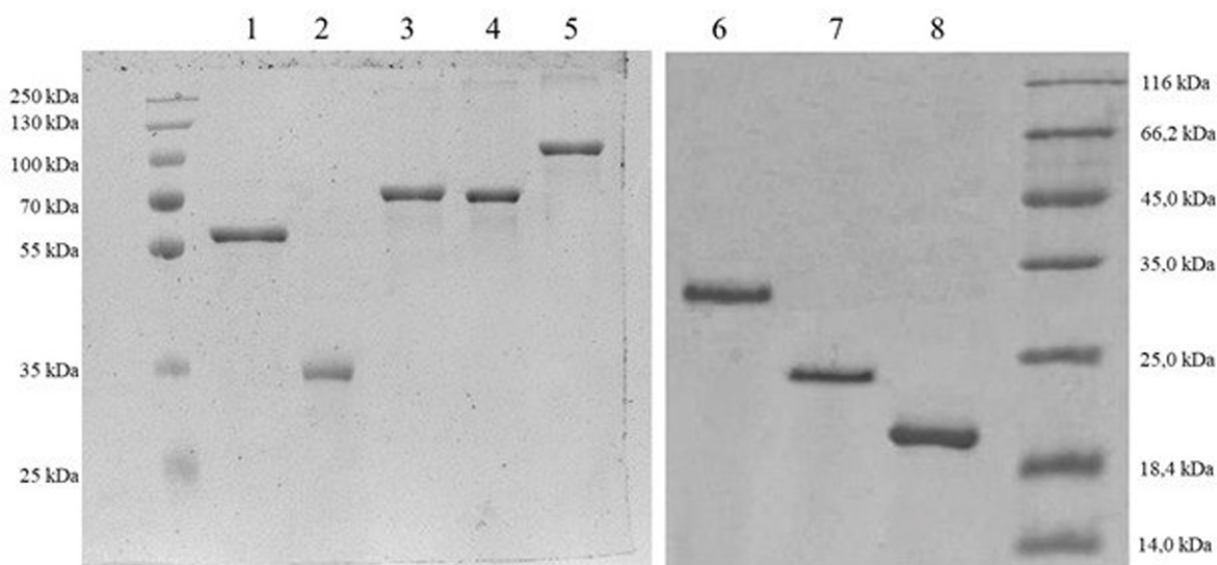


Рисунок 3.3.2. Электрофоретический анализ белков методом ДСН-ПААГ (10% полиакриламидный гель, восстанавливающие условия), где под номерами: 1 – белок 11, 2 – белок 13, 3 – белок 8, 4 – белок 3, 5 – белок АЕ, 6 – белок 10, 7 – белок 9, 8 – белок 4.

3.4. 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. 3.4.1.

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, $p < 0,001$).

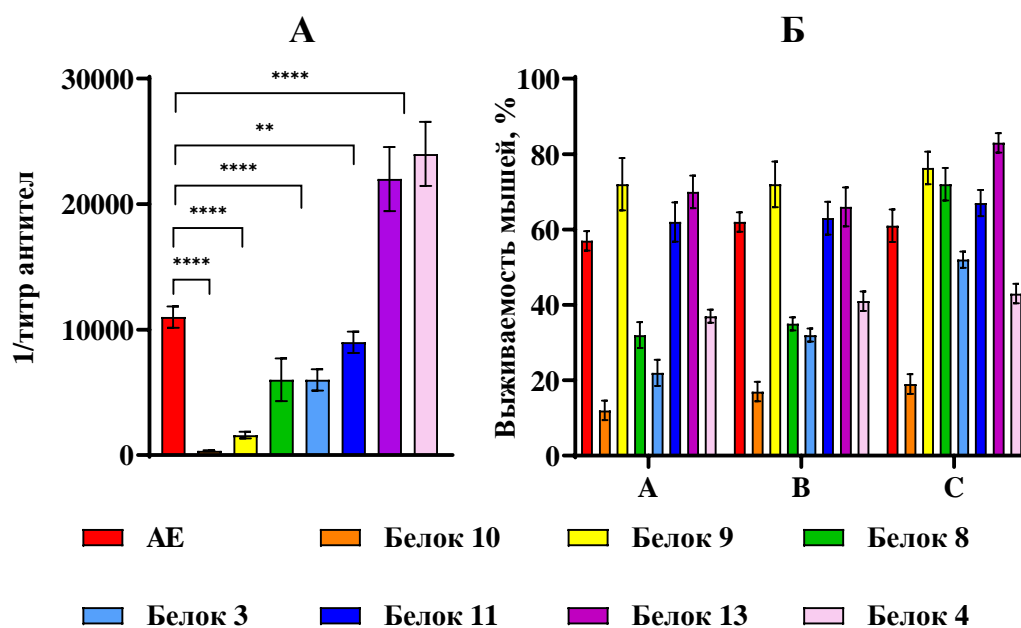


Рисунок 3.4.1. Иммуногенные и протективные свойства исследуемых белков (А) Уровень антител к белку АЕ, 1/титр; (Б) степень защиты от серогрупп *N. meningitidis*, %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

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 $35\pm 2\%$, $32\pm 2\%$ и $62\pm 3\%$ 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 $M(E^{135}-H^{328})-LEN_6$ ($(1,6\pm 0,3) \times 10^3/\text{титр}$) 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 $10^3/\text{титр}$: 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 C-концевой областей белка АЕ, приводит к значительному увеличению титра антител в сыворотке крови животных по сравнению с иммунизацией белком АЕ (титр антител $10^3/\text{титр}$: 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* трёх 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. 3.4.1) и белок АЕ. Мышей заражали летальной дозой *H. influenzae* серотип b (Hib) штаммы 1095 и 45-2. Результаты биологических испытаний четырёх препаратов приведены на рисунке 3.4.2

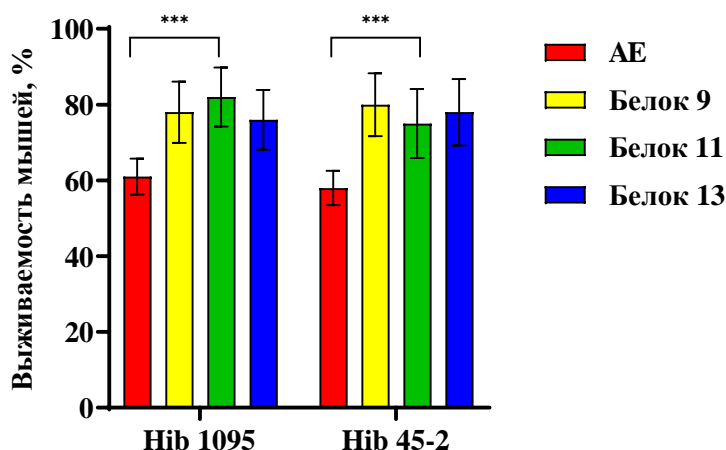


Рисунок 3.4.2. Протективные свойства препаратов белков 9, 11, 13 и АЕ от (Hib) штаммы 1095 и 45-2, в %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

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 значимо ($p < 0,001$) 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 распространённые патогенные серотипы. Иммунизация мышей препаратами на основе менингококковой IgA1-протеазы проявила выраженный защитный эффект при прямом инфицировании живой культурой (Рис. 3.4.3).

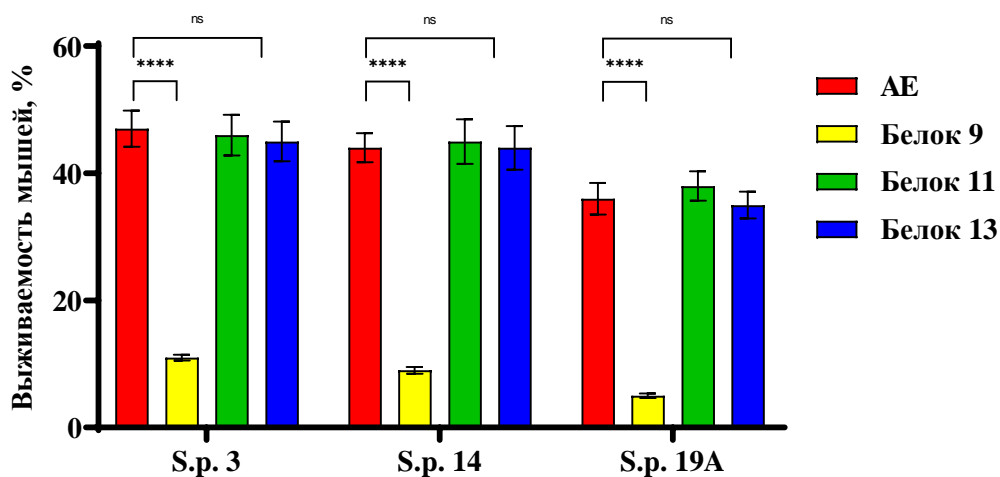


Рисунок 3.4.3. Протективные свойства препаратов белков 9, 11, 13 и АЕ от *S. pneumoniae* серотипов 3, 14 и 19А, в %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

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 трёхмерной 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: $M(W^{140}\text{-H}^{328})\text{-}(W^{412}\text{-D}^{604})\text{-}(Y^{866}\text{-P}^{1004})\text{-LEH}_6$ и $M(W^{140}\text{-Q}^{299})\text{-}(Y^{866}\text{-P}^{1004})\text{-LEH}_6$, соответственно.

3.5. 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 $MA^{28}\text{-P}^{1004}\text{LEH}_6$ с мол. массой 109 кДа и белок 11 общей формулы $M(W^{140}\text{-H}^{328})\text{-}(W^{412}\text{-D}^{604})\text{-}(Y^{866}\text{-P}^{1004})\text{-LEH}_6$, состоящий из трёх соединенных в единую полипептидную цепь фрагментов первичной структуры IgA1-протеазы, а также кодирующая белок 11 в клетках эукариот плазмидная ДНК рсDNA-IgA-11-3 в векторе рсDNA3.1.

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 рсDNA-IgA-11-3 и без ДНК в составе полученных нами ранее липосом на основе дипальмитоил фосфатидилхолина (DPPC) (Табл. 3.5.1).

Таблица 3.5.1. Состав протективных композиций.

Шифр группы	Состав препарата
L	Липосомы
Белок 11 + L	Белок 11 + липосомы
Белок 11 + L + D	Белок 11 + липосомы + ДНК рсDNA-IgA-11-3
Белок 11 + Alhydrogel	Белок 11 + гидроокись алюминия
Белок 11 + ur	Белок 11 + мочевина
АЕ	Белок АЕ – $MA^{28}\text{-P}^{1004}\text{LEH}_6$

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. 3.5.1.

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).

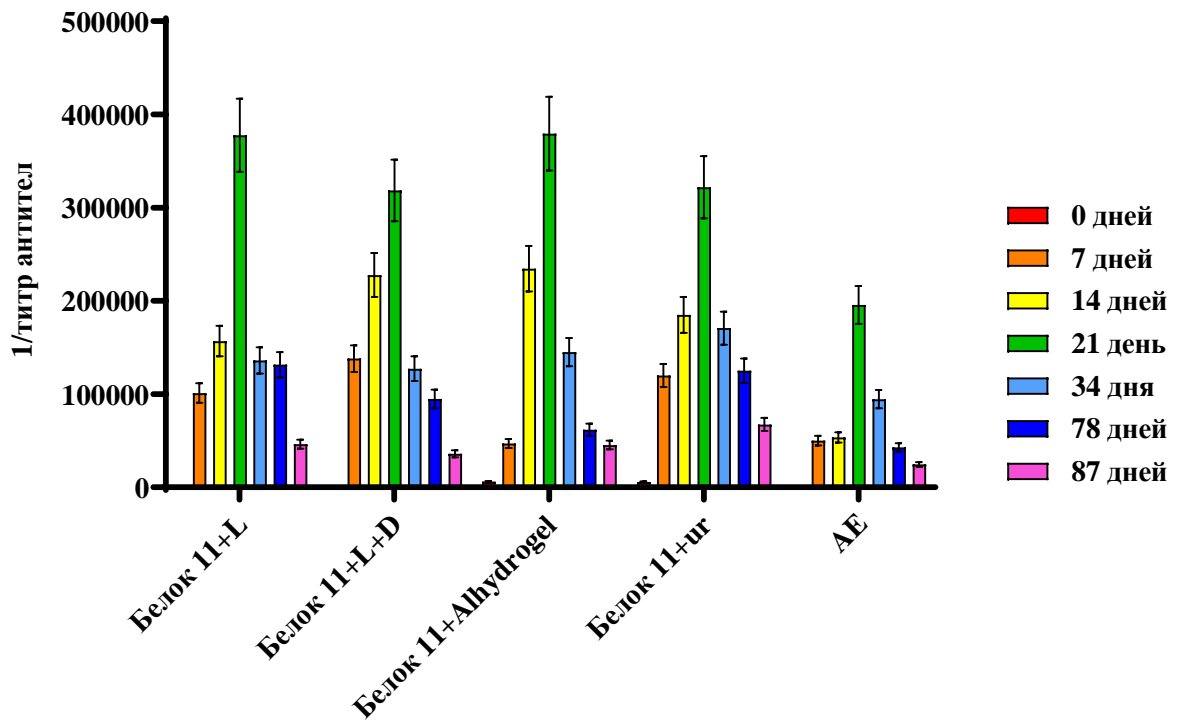


Рисунок 3.5.1. Уровень антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных исследованными препаратами.

Наибольший уровень антител наблюдался в сыворотке мышей, иммунизированных препаратом (Белок 11 + L) с белком 11, включённым 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 адъюванта.

Обратный титр антител у этих препаратов составил $(3,2 \pm 0,8) \times 10^5$. Наконец, самый низкий титр антител наблюдался при внутривнутрибрюшинном введении ничем не защищённого 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 внутривнутрибрюшинного заражения. Контролем служили не иммунизированные животные или животные, получившие чистые липосомы по той же схеме (Рис. 3.5.2).

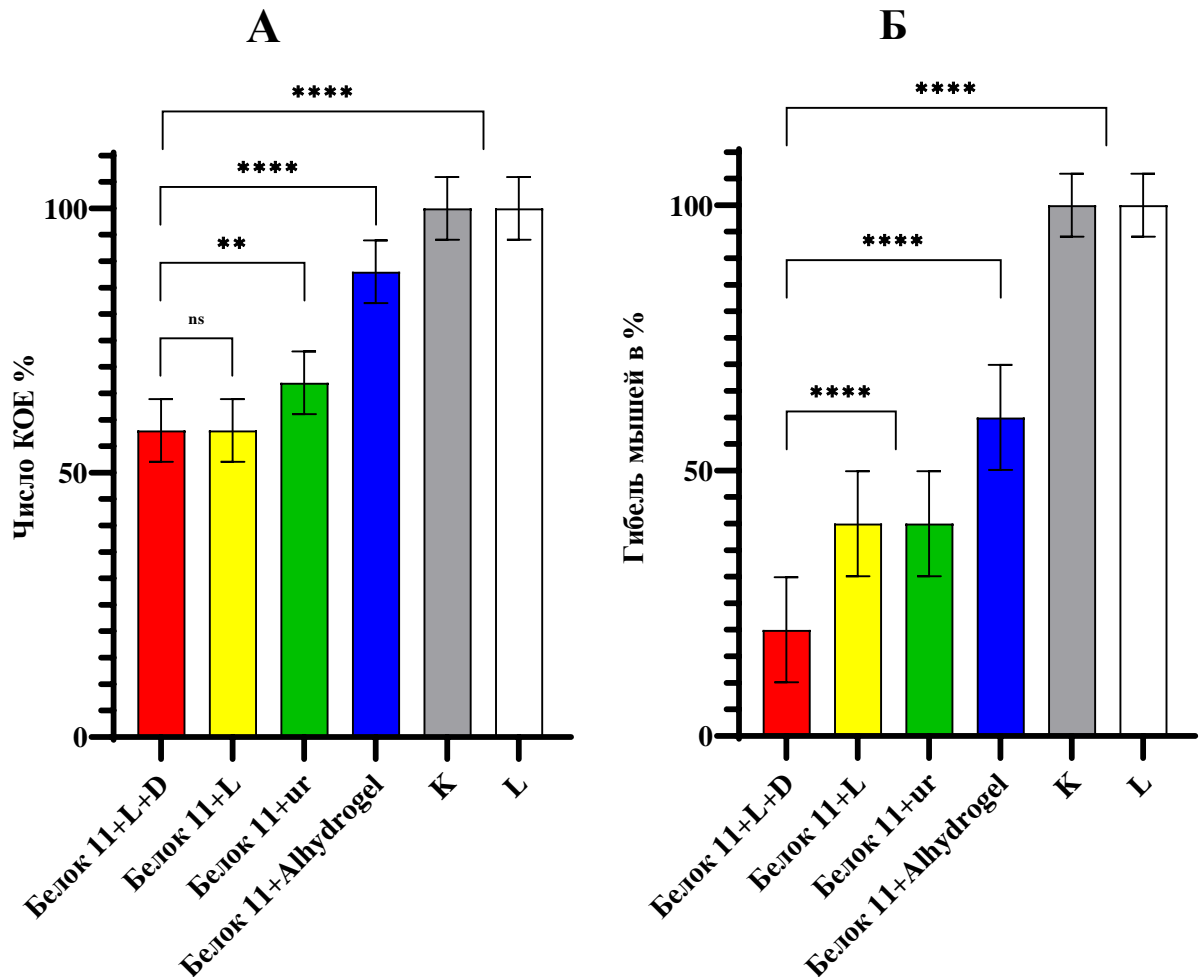


Рисунок 3.5.2. Уровень бактериемии (А) и гибель (Б) мышей при заражении *N. meningitidis* серогруппы В через 30 дн. после повторной иммунизации, в %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

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 мочеvine (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. 3.5.2).

Таблица 3.5.2. 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 им., дней	Срок после N.м., дней	N.м.*	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, заражённые *N. meningitidis* серогруппы В;
 (-) – не заражённые животные.

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.

Для оценки роли иммунных лимфоцитов в защите от менингококка был использован метод адоптивного переноса лимфоцитов селезёнки 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. 3.5.3) [216].

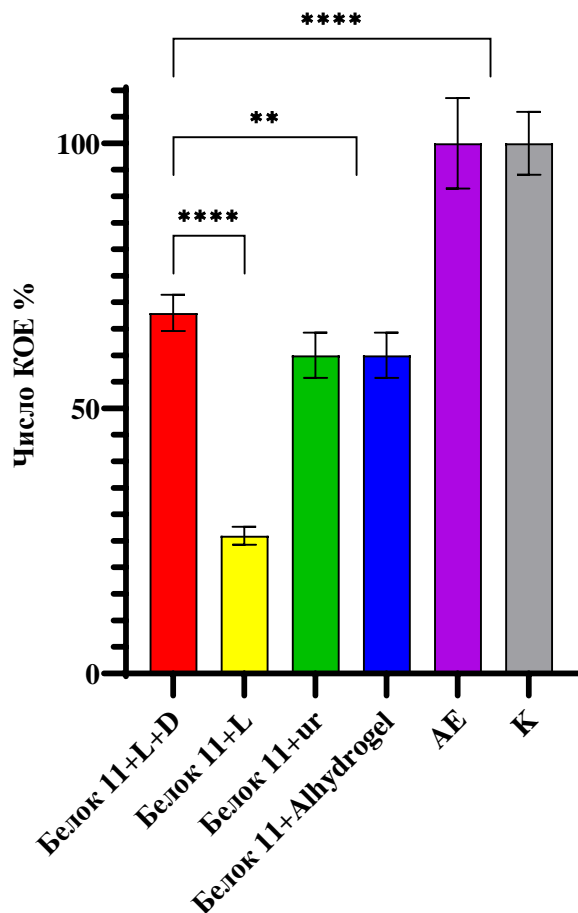


Рисунок 3.5.3. *Уровень бактериемии у мышей-реципиентов при переносе лимфоцитов от мышей-доноров через 10 мес. после реиммунизации, в %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.*

4. Обсуждение

В результате проведённых 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 расчётов 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 трёхмерная структура (Рис. 4.1).

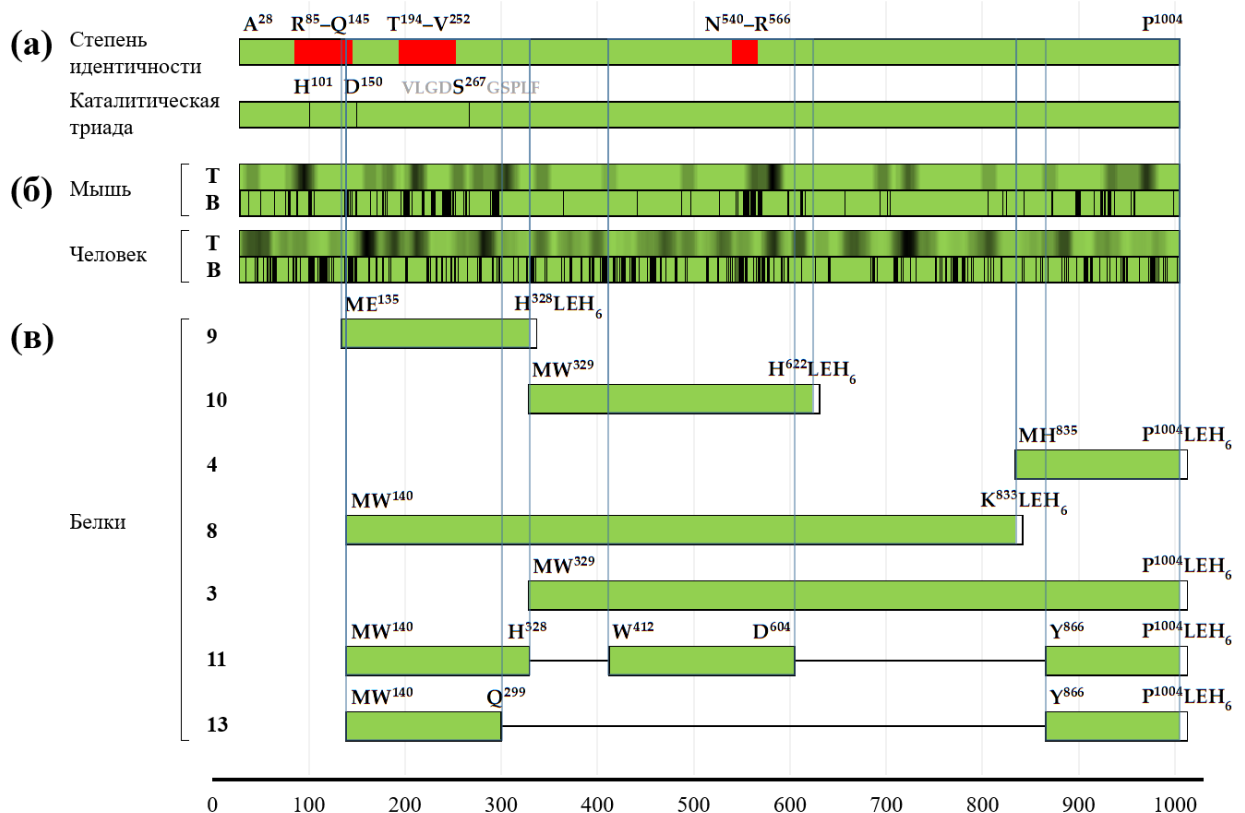


Рисунок 4.1. Упрощенное представление дизайна рекомбинантных белков на основе данных о последовательностях и эпитопах A²⁸-P¹⁰⁰⁴.

(а) Сходство последовательностей с IgA1-протеазами из различных штаммов *N. meningitidis*. Области с низким (см. Табл. 2 в [8]) сходством окрашены в красный цвет. В каталитической триаде сериновой IgA1-протеазы серин-267 представлен в составе последовательности VLGDS²⁶⁷GSPLF [111].

(б) Результаты предсказания Т- и В-клеточных эпитопов для мышей и людей-на основе рисунков 3.2.1.1, 3.2.1.2 (World) и 3.2.2.2 (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 чёрный цвет.

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

Участок первичной структуры с высокой плотностью линейных и пространственных В-эпитопов фермента E¹³⁵-H⁶²² был разделён 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 удалён 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, снабжённые 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 трёх 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 проведённых 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. 4.1). Данный результат даёт 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 ещё 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 учётом значений величины изоэлектрической точки конечных белковых молекул, таким образом, чтобы данная величина заметно отличалась от физиологического значения pH, 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. 3.2.3.1 и Рис. 4.1).

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 превышают протективные свойства белка АЕ. Иммуногенные и протективные свойства белков 11 и 13 на мышинной модели заражения охарактеризованы на Рис. 3.4.1. 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 [217], 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 (для белка АЕ мол. масса 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 селезёнки выявил, что все композиции показали значимое снижение числа КОЕ, при этом минимальное число КОЕ (26%) наблюдается у мышей-реципиентов, которым были перенесены лимфоциты селезёнки 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 (A²⁸-P¹⁰⁰⁴) 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 A²⁸-P¹⁰⁰⁴ 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(H⁸³⁵-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆, M(W³²⁹-H⁶²²)-LEN₆, M(E¹³⁵-H³²⁸)-LEN₆, M(W³²⁹-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆, M(W¹⁴⁰-K⁸³³)-LEN₆, M(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆, M(W¹⁴⁰-Q²⁹⁹)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆.
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(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ с молекулярной массой 59,4 кДа и M(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 M(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ 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(W¹⁴⁰-H³²⁸)-(W⁴¹²-D⁶⁰⁴)-(Y⁸⁶⁶-P¹⁰⁰⁴)-LEN₆ и этот же белок совместно с ДНК, кодирующей его в клетках эукариот в составе липосом.

Список литературы

1. Pizza M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against Meningococcal Diseases // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8, № 10. P. 1521.
2. Zhigis L. S., Kotelnikova O. V., Zinchenko A. A., Karlinsky D. M., Prokopenko Yu. A., Rumsh L. D. IgA1 Protease as a Vaccine Basis for Prevention of Bacterial Meningitis // *Russ J Bioorg Chem*. 2021. Vol. 47, № 4. P. 805–814.
3. Prokopenko Y., Zinchenko A., Karlinsky D., Kotelnikova O., Razgulyaeva O., Gordeeva E., Nokel E., Serova O., Kaliberda E., Zhigis L., Rumsh L., 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.
4. Roupheal N. G., Stephens D. S. *Neisseria meningitidis*: Biology, Microbiology, and Epidemiology // *Neisseria meningitidis* / Christodoulides M. Totowa, ed., NJ: Humana Press, 2012. Vol. 799. P. 1–20.
5. Bolgiano B., Moran E., Beresford N. J., Gao F., Care R., Desai T., Nordgren I. K., Rudd T. R., Feavers I. M., Bore P., Patni S., Gavade V., Mallya A., Kale S., Sharma P., Goel S. K., Gairola S., Hattarki S., Avalaskar N., Sarma A. D., LaForce M., Ravenscroft N., Khandke L., Alderson M. R., Dhere R. M., Pisal S. S. Evaluation of Critical Quality Attributes of a Pentavalent (A, C, Y, W, X) Meningococcal Conjugate Vaccine for Global Use // *Pathogens*. 2021. Vol. 10, № 8. P. 928.
6. Yonts A. B., Gaviria-Agudelo C., Kimberlin D. W., O’Leary S. T., Paulsen G. C. Fall 2023 ACIP Update on Meningococcal, RSV, COVID-19, and Other Pediatric Vaccines // *Pediatrics*. 2023.
7. Immunization, Vaccines and Biologicals: Meningococcal meningitis [Электронный ресурс] // World Health Organization. URL: <https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/meningitis> (дата обращения: 01.08.2024).
8. Karlinsky D., Prokopenko Y., 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.
9. Vitovski S., Sayers J. R. Relaxed Cleavage Specificity of an Immunoglobulin A1 Protease from *Neisseria meningitidis* // *Infect Immun*. 2007. Vol. 75, № 6. P. 2875–2885.
10. Spoerry C., Karlsson J., Aschtgen M.-S., Loh E. *Neisseria meningitidis* IgA1-specific serine protease exhibits novel cleavage activity against IgG3 // *Virulence*. 2021. Vol. 12, № 1. P. 389–403.

11. Kotelnikova O. V., Zinchenko A. A., Vikhrov A. A., Alliluev A. P., Serova O. V., Gordeeva E. A., Zhigis L. S., Zueva V. S., Razgulyaeva O. A., Melikhova T. D., Nokel E. A., Drozhzhina E. Yu., Rumsh L. D. Serological Analysis of Immunogenic Properties of Recombinant Meningococcus IgA1 Protease-Based Proteins // *Bull Exp Biol Med*. 2016. Vol. 161, № 3. P. 391–394.
12. Fu L., Zhao J., Lin L., Zhang Q., Xu Z., Han L., Xie C., Zhou R., Jin M., Zhang A. Characterization of IgA1 protease as a surface protective antigen of *Streptococcus suis* serotype 2 // *Microbes and Infection*. 2016. Vol. 18, № 4. P. 285–289.
13. Janoff E. N., Rubins J. B., Fasching C., Charboneau D., Rahkola J. T., Plaut A. G., Weiser J. N. Pneumococcal IgA1 protease subverts specific protection by human IgA1 // *Mucosal Immunology*. 2014. Vol. 7, № 2. P. 249–256.
14. Putz K., Hayani K., Zar F. A. Meningitis // *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2013. Vol. 40, № 3. P. 707–726.
15. Менингит [Электронный ресурс] // World Health Organization. 2023. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/meningitis> (дата обращения: 08.07.2025).
16. Tattevin P., Tchamgoué S., Belem A., Bénézit F., Pronier C., Revest M. Aseptic meningitis // *Revue Neurologique*. 2019. Vol. 175, № 7–8. P. 475–480.
17. Sáez-Llorens X., McCracken G. H. J. Bacterial meningitis in children // *Lancet (London, England)*. 2003. Vol. 361, № 9375. P. 2139–2148.
18. Van de Beek D., de Gans J., Tunkel A. R., Wijdicks E. F. M. Community-Acquired Bacterial Meningitis in Adults // *N Engl J Med*. 2006. Vol. 354, № 1. P. 44–53.
19. About Meningitis [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2025. URL: <https://www.cdc.gov/meningitis/about/index.html> (дата обращения: 25.02.2026).
20. About Bacterial Meningitis [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2025. URL: <https://www.cdc.gov/meningitis/about/bacterial-meningitis.html> (дата обращения: 25.02.2026).
21. Ginsberg L. Difficult and Recurrent Meningitis // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2004. Vol. 75, № 90001. P. 16i–121.
22. About Amebic Meningitis [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2025. URL: <https://www.cdc.gov/meningitis/about/amebic-meningitis.html> (дата обращения: 25.02.2026).
23. Swanson D. Meningitis // *Pediatr Rev. United States*, 2015. Vol. 36, № 12. P. 514–524.

24. van Ettekovén C. N., Liechti F. D., Brouwer M. C., Bijlsma M. W., van de Beek D. Global Case Fatality of Bacterial Meningitis During an 80-Year Period: A Systematic Review and Meta-Analysis. // *JAMA Netw Open*. United States, 2024. Vol. 7, № 8. P. e2424802.
25. Agrawal S., Nadel S. Acute bacterial meningitis in infants and children: epidemiology and management // *Paediatr Drugs*. Switzerland, 2011. Vol. 13, № 6. P. 385–400.
26. Meningococcal vaccines: WHO position paper, November 2011 // *Wkly Epidemiol Rec*. Switzerland, 2011. Vol. 86, № 47. P. 521–539.
27. Erickson L. J., De Wals P., McMahon J., Heim S. Complications of meningococcal disease in college students // *Clin Infect Dis*. United States, 2001. Vol. 33, № 5. P. 737–739.
28. Edwards M. S., Baker C. J. Complications and sequelae of meningococcal infections in children // *J Pediatr*. United States, 1981. Vol. 99, № 4. P. 540–545.
29. Венгеров Ю. Я., Нагибина М. В., Плавуннов Н. Ф., Кадышев В. А., Сидоров А. М., Королева И. С. Диагностика и лечение бактериальных менингитов в условиях скорой и неотложной медицинской помощи. Методические указания. 2019.
30. About Listeria Infection [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2024. URL: <https://www.cdc.gov/listeria/about/index.html> (дата обращения: 25.02.2026).
31. Tunkel A. R., Hartman B. J., Kaplan S. L., Kaufman B. A., Roos K. L., Scheld W. M., Whitley R. J. Practice Guidelines for the Management of Bacterial Meningitis // *Clinical Infectious Diseases*. 2004. Vol. 39, № 9. P. 1267–1284.
32. Tebruegge M., Curtis N. Epidemiology, Etiology, Pathogenesis, and Diagnosis of Recurrent Bacterial Meningitis // *Clin Microbiol Rev*. 2008. Vol. 21, № 3. P. 519–537.
33. Giovannoni S. J., Tripp H. J., Givan S., Podar M., Vergin K. L., Baptista D., Bibbs L., Eads J., Richardson T. H., Noordewier M., Rappé M. S., Short J. M., Carrington J. C., Mathur E. J. Genome Streamlining in a Cosmopolitan Oceanic Bacterium // *Science*. 2005. Vol. 309, № 5738. P. 1242–1245.
34. GBD 2019 Meningitis Antimicrobial Resistance Collaborators. Global, regional, and national burden of meningitis and its aetiologies, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // *Lancet Neurol*. England, 2023. Vol. 22, № 8. P. 685–711.
35. Jafri R. Z., Ali A., Messonnier N. E., Tevi-Benissan C., Durrheim D., Eskola J., Fermon F., Klugman K. P., Ramsay M., Sow S., Zhujun S., Bhutta Z. A., Abramson J. Global epidemiology of invasive meningococcal disease // *Popul Health Metrics*. 2013. Vol. 11. P. 17.
36. WHO/AFRO. Preventable ‘meningitis belt’ deaths targeted in health agency action plan [Электронный ресурс] // UN News. Global perspective Human stories. 2025. URL: <https://news.un.org/en/story/2025/04/1162061> (дата обращения: 25.03.2026).

37. ВОЗ публикует первое руководство по диагностике, лечению и уходу при менингите [Электронный ресурс] // World Health Organization. 2025. URL: <https://www.who.int/ru/news/item/10-04-2025-who-launches-first-ever-guidelines-on-meningitis-diagnosis--treatment-and-care> (дата обращения: 25.03.2026).
38. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2024 году» [Электронный ресурс] // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). 2025. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/b8a/u6lsxjabw032jkdf837nlaezxu3ue09m/GD_SEB.pdf (дата обращения: 25.03.2026).
39. Воробьев А. А., Быков А. С., Пашков Е. П., Караулов А. В., Корн М. Я., Быков С. А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. Москва: Медицинское информационное агентство, 2003. 236 с.
40. Caugant D. A. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: importance for the epidemiology of meningococcal disease // Infect Genet Evol. Netherlands, 2008. Vol. 8, № 5. P. 558–565.
41. McNamara L. A., Rubis A. B. CDC Yellow Book: Health Information for International Travel. Meningococcal Disease [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2025. URL: <https://www.cdc.gov/yellow-book/hcp/travel-associated-infections-diseases/meningococcal-disease.html> (дата обращения: 25.02.2026).
42. Воробьев А. В., Быков А. С., Пашков Е. П., Рыбакова А. М. Микробиология: учебник. 2-е изд. Москва: «Медицина», 2003. 336 с.
43. ABCs Bact Facts Interactive Data Dashboard [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2025. URL: <https://www.cdc.gov/abcs/bact-facts/data-dashboard.html> (дата обращения: 06.04.2026).
44. Invasive meningococcal disease Annual Epidemiological Report for 2023. European Centre for Disease Prevention and Control, 2025.
45. Lahra M. M., George C. R. R., van Hal S., Hogan T. R. Australian Meningococcal Surveillance Programme Annual Report, 2023 // Commun Dis Intell (2018). Australia, 2024. Vol. 48.
46. Zhou J. J., Li M. S., Zhang Q., Yan T. T., Wu D., Li Y. X., Li J. H., Yin Z. D., Zheng H., An Z. J. [Analysis on incidence trend of meningococcal meningitis and major pathogenic serogroups of *Neisseria meningitidis* in China, 1990-2023] // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. China, 2024. Vol. 45, № 9. P. 1197–1203.

47. Kobayashi M., Kamiya H., Fukusumi M., Takahashi H., Akeda Y., Suzuki M., Sunagawa T. Epidemiology of invasive meningococcal disease, Japan, 2013 to 2023 // Euro Surveill. Sweden, 2024. Vol. 29, № 46.
48. Mathur G., Domachowske J. B., Graña M. G., Ladak R., Langley J. M., Olaiya O., Pompeo A., Taddei L., Villena R. Need for Invasive Meningococcal Disease Prevention Through Vaccination for Young Children in the Americas // Vaccines (Basel). Switzerland, 2025. Vol. 13, № 9.
49. Ulanova M., Tsang R. S. W. *Haemophilus influenzae* serotype a as a cause of serious invasive infections // Lancet Infect Dis. United States, 2014. Vol. 14, № 1. P. 70–82.
50. Murphy T. F., Lesse A. J., Kirkham C., Zhong H., Sethi S., Munson R. S. A Clonal Group of Nontypeable *Haemophilus influenzae* with Two IgA Proteases Is Adapted to Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // PLoS ONE / Ratner A. J., ed. 2011. Vol. 6, № 10. P. e25923.
51. Clementi C. F., Murphy T. F. Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Invasion and Persistence in the Human Respiratory Tract // Front. Cell. Inf. Microbio. 2011. Vol. 1.
52. Finney L. J., Ritchie A., Pollard E., Johnston S. L., Mallia P. Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on *Haemophilus influenzae* // Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. New Zealand, 2014. Vol. 9. P. 1119–1132.
53. Sethi S., Murphy T. F. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease // N Engl J Med. United States, 2008. Vol. 359, № 22. P. 2355–2365.
54. Eldika N., Sethi S. Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in exacerbations and progression of chronic obstructive pulmonary disease // Curr Opin Pulm Med. United States, 2006. Vol. 12, № 2. P. 118–124.
55. Murphy T. F., Brauer A. L., Schiffmacher A. T., Sethi S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease // Am J Respir Crit Care Med. United States, 2004. Vol. 170, № 3. P. 266–272.
56. Ahearn C. P., Gallo M. C., Murphy T. F. Insights on persistent airway infection by nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease // Pathog Dis. United States, 2017. Vol. 75, № 4.
57. Платонов А. Е., Харит С. М., Платонова О. В. Вакцинопрофилактика менингококковой инфекции в мире и в России // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. № 5 (48). С. 32–46.
58. Озерецковский Н. А., Немировская Т. И. Вакцинация против гемофильной инфекции типа b в Российской Федерации и за рубежом // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2016. Т. 15, № 1. С. 61–66.

59. Пневмококковая инфекция: Стандарты эпиднадзора за управляемыми инфекциями [Электронный ресурс] // World Health Organization. 2018. URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/vpd-surveillance-standards-publication/17-who-surveillancevaccinepreventable-17-pneumo-russian-r1.pdf (дата обращения: 25.02.2026).
60. Левинсон У. Медицинская микробиология и иммунология. 3-е изд. Москва: Лаборатория знаний, 2023. 1184 с.
61. Козлов Р. С. Пневмококки: прошлое, настоящее и будущее. Смоленск: Смоленская государственная медицинская академия, 2005. 128 с.
62. Таточенко В. К. Пневмококковая инфекция: современный взгляд на проблему и профилактику // Вопросы современной педиатрии. 2007. Т. 6, № 1. С. 85–91.
63. Clark J. E., Hammal D., Hampton F., Spencer D., Parker L. Epidemiology of community-acquired pneumonia in children seen in hospital // Epidemiol Infect. England, 2007. Vol. 135, № 2. P. 262–269.
64. Pneumococcal Vaccination: Information for Health Care Providers [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2022. URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/by-disease/pneumo.html> (дата обращения: 25.02.2026).
65. Kilian M., Thomsen B., Petersen T. E., Bleeg H. Molecular biology of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases // Mol Immunol. England, 1983. Vol. 20, № 9. P. 1051–1058.
66. Crum-Cianflone N., Sullivan E. Meningococcal Vaccinations // Infect Dis Ther. 2016. Vol. 5, № 2. P. 89–112.
67. Zeana C., Kubin C. J., Della-Latta P., Hammer S. M. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis successfully managed with linezolid: case report and review of the literature // Clin Infect Dis. United States, 2001. Vol. 33, № 4. P. 477–482.
68. Thwaites G., Chau T. T., Mai N. T., Drobniewski F., McAdam K., Farrar J. Tuberculous meningitis // J Neurol Neurosurg Psychiatry. England, 2000. Vol. 68, № 3. P. 289–299.
69. Ratzan K. R. Viral meningitis // Med Clin North Am. United States, 1985. Vol. 69, № 2. P. 399–413.
70. Logan S. A. E., MacMahon E. Viral meningitis // BMJ. England, 2008. Vol. 336, № 7634. P. 36–40.
71. Irani D. N. Aseptic meningitis and viral myelitis // Neurol Clin. United States, 2008. Vol. 26, № 3. P. 635–655, vii–viii.
72. Шувалова Е. П. Инфекционные болезни. 6-е изд. Медицина, 2005. 696 с.

73. Shalabi M., Whitley R. J. Recurrent benign lymphocytic meningitis // *Clin Infect Dis. United States*, 2006. Vol. 43, № 9. P. 1194–1197.
74. About Viral Meningitis [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2025. URL: <https://www.cdc.gov/meningitis/about/viral-meningitis.html> (дата обращения: 25.02.2026).
75. Anh N. T., Nhu L. N. T., Hong N. T. T., Phuc T. M., Tam P. T. T., Huong D. T., Anh T. T., Deng X., Nghia H. D. T., Nguyen T. T., Van Hung N., Thuan N. D., Phuong P. T. H., Chau N. V. V., Baker S., Delwart E., Thwaites G., Van Tan L. Viral Metagenomic Analysis of Cerebrospinal Fluid from Patients with Acute Central Nervous System Infections of Unknown Origin, Vietnam // *Emerg Infect Dis. United States*, 2021. Vol. 27, № 1. P. 205–213.
76. Kauffman C. A., Pappas P. G., Sobel J. D., Dismukes W. E. *Essentials of Clinical Mycology*. 2-е изд. Springer New York, 2011. 553 с.
77. Sirven J. I., Malamut B. L. *Clinical Neurology of the Older Adult*. 2-е изд. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 642 с.
78. Raman Sharma R. Fungal infections of the nervous system: current perspective and controversies in management // *Int J Surg. United States*, 2010. Vol. 8, № 8. P. 591–601.
79. Honda H., Warren D. K. Central nervous system infections: meningitis and brain abscess // *Infect Dis Clin North Am. United States*, 2009. Vol. 23, № 3. P. 609–623.
80. Kauffman C. A., Pappas P. G., Patterson T. F. Fungal infections associated with contaminated methylprednisolone injections // *N Engl J Med. United States*, 2013. Vol. 368, № 26. P. 2495–2500.
81. Graeff-Teixeira C., da Silva A. C. A., Yoshimura K. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance // *Clin Microbiol Rev. United States*, 2009. Vol. 22, № 2. P. 322–348, Table of Contents.
82. Bennett J. E., Dolin R., Blaser M. J. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: 2-Volume Set*. 8-е изд. Elsevier Health Sciences, 2014. 3904 с.
83. Pace D., Pollard A. J. Meningococcal disease: clinical presentation and sequelae // *Vaccine. Netherlands*, 2012. Vol. 30 Suppl 2. P. B3-9.
84. Takada S., Fujiwara S., Inoue T., Kataoka Y., Hadano Y., Matsumoto K., Morino K., Shimizu T. Meningococemia in Adults: A Review of the Literature // *Intern Med. Japan*, 2016. Vol. 55, № 6. P. 567–572.
85. Vaz L. E. Meningococcal Disease // *Pediatr Rev. United States*, 2017. Vol. 38, № 4. P. 158–169.

86. Seib K. L., Scarselli M., Comanducci M., Toneatto D., Masignani V. *Neisseria meningitidis* factor H-binding protein fHbp: a key virulence factor and vaccine antigen // *Expert Rev Vaccines*. England, 2015. Vol. 14, № 6. P. 841–859.
87. Girard M. P., Preziosi M.-P., Aguado M.-T., Kieny M. P. A review of vaccine research and development: meningococcal disease // *Vaccine*. Netherlands, 2006. Vol. 24, № 22. P. 4692–4700.
88. Thigpen M. C., Whitney C. G., Messonnier N. E., Zell E. R., Lynfield R., Hadler J. L., Harrison L. H., Farley M. M., Reingold A., Bennett N. M., Craig A. S., Schaffner W., Thomas A., Lewis M. M., Scallan E., Schuchat A. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007 // *N Engl J Med*. United States, 2011. Vol. 364, № 21. P. 2016–2025.
89. Invasive meningococcal disease reported cases and incidence [Электронный ресурс] // World Health Organization. URL: https://immunizationdata.who.int/global/wiise-detail-page/invasive-meningococcal-disease-reported-cases-and-incidence?GROUP=WHO_REGIONS&YEAR= (дата обращения: 18.11.2025).
90. Arenas J., Nijland R., Rodriguez F. J., Bosma T. N. P., Tommassen J. Involvement of three meningococcal surface-exposed proteins, the heparin-binding protein NhbA, the α -peptide of IgA protease and the autotransporter protease NalP, in initiation of biofilm formation // *Mol Microbiol*. England, 2013. Vol. 87, № 2. P. 254–268.
91. Pollard A. J., Maiden M. C. J. *Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols*. 1-е изд. Humana Press, 2001. 421 с.
92. Stephens D. S., Greenwood B., Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis* // *Lancet*. England, 2007. Vol. 369, № 9580. P. 2196–2210.
93. Stephens D. S. *Neisseria meningitidis* // *Infect Control*. United States, 1985. Vol. 6, № 1. P. 37–40.
94. Sharip A., Sorvillo F., Redelings M. D., Mascola L., Wise M., Nguyen D. M. Population-based analysis of meningococcal disease mortality in the United States: 1990-2002 // *Pediatr Infect Dis J*. United States, 2006. Vol. 25, № 3. P. 191–194.
95. Naucler P., Keramarou M., Derrough T. No Consistent, Increased Mortality Risk for Females Compared to Males in Invasive Meningococcal Disease in the European Surveillance System (TESSy) // *Clin Infect Dis*. United States, 2019. Vol. 68, № 9. P. 1606–1607.
96. Mbaeyi S., Duffy J., McNamara L. A. *Pink Book*, 14th ed. Chapter 14: Meningococcal Disease [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. 2024. URL: <https://www.cdc.gov/pinkbook/hcp/table-of-contents/chapter-14-meningococcal-disease.html> (дата обращения: 25.02.2026).

97. Longo D., Fauci A. S., Kasper D. L., Hauser S., Jameson J. L., Loscalzo J. *Harrisons Manual of Medicine*, 18th Edition. 18-е изд. McGraw-Hill Education, 2012. 1568 с.
98. Castillo D., Harcourt B., Hatcher C., Jackson M., Katz L., Mair R., Mayer L., Novak R., Rahalison L., Schmink S., Theodore M. J., Thomas J., Vuong J., Wang X., Mcgee L., Caugant D. A., Chanteau S., Cognat S., Nicolas P. *Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual*, 2nd ed. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2011.
99. McCarthy P. C., Sharyan A., Sheikhi Moghaddam L. *Meningococcal Vaccines: Current Status and Emerging Strategies // Vaccines (Basel)*. Switzerland, 2018. Vol. 6, № 1.
100. Kahler C. M., Martin L. E., Shih G. C., Rahman M. M., Carlson R. W., Stephens D. S. The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum // *Infect Immun*. United States, 1998. Vol. 66, № 12. P. 5939–5947.
101. Spinosa M. R., Progida C., Talà A., Cogli L., Alifano P., Bucci C. The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells // *Infect Immun*. United States, 2007. Vol. 75, № 7. P. 3594–3603.
102. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. *Microbial biofilms // Annu Rev Microbiol*. United States, 1995. Vol. 49. P. 711–745.
103. Sim R. J., Harrison M. M., Moxon E. R., Tang C. M. Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing // *Lancet*. England, 2000. Vol. 356, № 9242. P. 1653–1654.
104. Coureuil M., Jamet A., Bille E., Lécuyer H., Bourdoulous S., Nassif X. Molecular interactions between *Neisseria meningitidis* and its human host // *Cell Microbiol*. United States, 2019. Vol. 21, № 11. P. e13063.
105. Yi K., Rasmussen A. W., Gudlavalleti S. K., Stephens D. S., Stojiljkovic I. Biofilm formation by *Neisseria meningitidis* // *Infect Immun*. United States, 2004. Vol. 72, № 10. P. 6132–6138.
106. Литусов Н. В. *Нейссерии. Иллюстрированное учебное пособие*. Екатеринбург: УГМА, 2012. 39 с.
107. Vidarsson G., van Der Pol W. L., van Den Elsen J. M., Vilé H., Jansen M., Duijs J., Morton H. C., Boel E., Daha M. R., Corthésy B., van De Winkel J. G. Activity of human IgG and IgA subclasses in immune defense against *Neisseria meningitidis* serogroup B // *J Immunol*. England, 2001. Vol. 166, № 10. P. 6250–6256.

108. Woof J. M., Kerr M. A. The function of immunoglobulin A in immunity // *J Pathol. England*, 2006. Vol. 208, № 2. P. 270–282.
109. Plaut A. G., Gilbert J. V., Artenstein M. S., Capra J. D. *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A // *Science. United States*, 1975. Vol. 190, № 4219. P. 1103–1105.
110. Topley W. W. C., Wilson G. S. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 8 Volume Set. 10-е изд. Wiley, 2006. 3500 с.
111. Mistry D., Stockley R. A. IgA1 protease // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006. Vol. 38, № 8. P. 1244–1248.
112. Tran N., Frenette A., Holyoak T. Structure of the *Thomasclavelia ramosa* immunoglobulin A protease reveals a modular and minimizable architecture distinct from other immunoglobulin A proteases // *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*, 2025. Vol. 122, № 35. P. e2503549122.
113. Takenouchi-Ohkubo N., Mortensen L. M., Drasbek K. R., Kilian M., Poulsen K. Horizontal transfer of the immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) from *Streptococcus* to *Gemella haemolysans* // *Microbiology (Reading). England*, 2006. Vol. 152, № Pt 7. P. 2171–2180.
114. Rawlings N. D., Barrett A. J., Thomas P. D., Huang X., Bateman A., Finn R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database // *Nucleic Acids Res. England*, 2018. Vol. 46, № D1. P. D624–D632.
115. Redzic J. S., Rahkola J., Tran N., Holyoak T., Lee E., Martín-Galiano A. J., Meyer N., Zheng H., Eisenmesser E. A substrate-induced gating mechanism is conserved among Gram-positive IgA1 metalloproteases // *Commun Biol. England*, 2022. Vol. 5, № 1. P. 1190.
116. Family M64 [Электронный ресурс] // MEROPS the peptidase database. 2023. URL: <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=m64> (дата обращения: 22.04.2026).
117. Family M26 [Электронный ресурс] // MEROPS the peptidase database. 2023. URL: <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=m26> (дата обращения: 22.04.2026).
118. The UniProt Consortium et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025 // *Nucleic Acids Research*. 2025. Vol. 53, № D1. P. D609–D617.
119. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res. England*, 2000. Vol. 28, № 1. P. 235–242.

120. Burley S. K. et al. Updated resources for exploring experimentally-determined PDB structures and Computed Structure Models at the RCSB Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res. England*, 2025. Vol. 53, № D1. P. D564–D574.
121. 7UUVL: IgA1 Protease with IgA1 substrate [Электронный ресурс] // RCSB PDB. 2025. URL: <https://www.rcsb.org/structure/7UUVL> (дата обращения: 22.04.2026).
122. Wang Z., Rahkola J., Redzic J. S., Chi Y.-C., Tran N., Holyoak T., Zheng H., Janoff E., Eisenmesser E. Mechanism and inhibition of *Streptococcus pneumoniae* IgA1 protease. // *Nat Commun. England*, 2020. Vol. 11, № 1. P. 6063.
123. Lorenzen D. R., Düx F., Wölk U., Tsirpouchtsidis A., Haas G., Meyer T. F. Immunoglobulin A1 protease, an exoenzyme of pathogenic *Neisseriae*, is a potent inducer of proinflammatory cytokines // *J Exp Med. United States*, 1999. Vol. 190, № 8. P. 1049–1058.
124. Family S6 [Электронный ресурс] // MEROPS the peptidase database. 2023. URL: <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=s06> (дата обращения: 22.04.2026).
125. Jose J., Otto G. W., Meyer T. F. The integration site of the *iga* gene in commensal *Neisseria* sp. // *Mol Genet Genomics. Germany*, 2003. Vol. 269, № 2. P. 197–204.
126. Bricker J., Mulks M., Moxon E. R., Plaut A. G., Wright A. Physical and genetic analysis of DNA regions encoding the immunoglobulin A proteases of different specificities produced by *Haemophilus influenzae* // *Infect Immun. United States*, 1985. Vol. 47, № 2. P. 370–374.
127. Mulks M. H., Simpson D. A., Shoberg R. J. Restriction site polymorphism in genes encoding type 2 but not type 1 gonococcal IgA1 proteases // *Antonie Van Leeuwenhoek. Netherlands*, 1987. Vol. 53, № 6. P. 471–478.
128. Halter R., Pohlner J., Meyer T. F. Mosaic-like organization of IgA protease genes in *Neisseria gonorrhoeae* generated by horizontal genetic exchange in vivo // *EMBO J. England*, 1989. Vol. 8, № 9. P. 2737–2744.
129. Chen C.-W., Ho C.-H. Substitutions in the nonactive site of the passenger domain on the activity of *Haemophilus influenzae* immunoglobulin A1 protease // *Infect Immun. United States*, 2024. Vol. 92, № 8. P. e0019324.
130. Pohlner J., Halter R., Beyreuther K., Meyer T. F. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease // *Nature. England*, 1987. Vol. 325, № 6103. P. 458–462.
131. Gallo M. C., Kirkham C., Eng S., Bebawee R. S., Kong Y., Pettigrew M. M., Tettelin H., Murphy T. F. Changes in IgA Protease Expression Are Conferred by Changes in Genomes during Persistent Infection by Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. // *Infect Immun. United States*, 2018. Vol. 86, № 8.

132. Parsons H. K., Vitovski S., Sayers J. R. Immunoglobulin A1 proteases: a structure-function update // *Biochem Soc Trans. England*, 2004. Vol. 32, № Pt 6. P. 1130–1132.
133. Blum M., Andreeva A., Florentino L. C., Chuguransky S. R., Grego T., Hobbs E., Pinto B. L., Orr A., Paysan-Lafosse T., Ponamareva I., Salazar G. A., Bordin N., Bork P., Bridge A., Colwell L., Gough J., Haft D. H., Letunic I., Llinares-López F., Marchler-Bauer A., Meng-Papaxanthos L., Mi H., Natale D. A., Orengo C. A., Pandurangan A. P., Piovesan D., Rivoire C., Sigrist C. J. A., Thanki N., Thibaud-Nissen F., Thomas P. D., Tosatto S. C. E., Wu C. H., Bateman A. InterPro: the protein sequence classification resource in 2025 // *Nucleic Acids Res. England*, 2025. Vol. 53, № D1. P. D444–D456.
134. Paysan-Lafosse T., Andreeva A., Blum M., Chuguransky S. R., Grego T., Pinto B. L., Salazar G. A., Bileschi M. L., Llinares-López F., Meng-Papaxanthos L., Colwell L. J., Grishin N. V., Schaeffer R. D., Clementel D., Tosatto S. C. E., Sonnhammer E., Wood V., Bateman A. The Pfam protein families database: embracing AI/ML // *Nucleic Acids Res. England*, 2025. Vol. 53, № D1. P. D523–D534.
135. Autotransporter beta-domain (PF03797) [Электронный ресурс] // InterPro. Classification of protein families. URL: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF03797/> (дата обращения: 22.04.2026).
136. Spahich N. A., St Geme J. W. 3rd. Structure and function of the *Haemophilus influenzae* autotransporters // *Front Cell Infect Microbiol. Switzerland*, 2011. Vol. 1. P. 5.
137. Roussel-Jazédé V., Arenas J., Langereis J. D., Tommassen J., van Ulsen P. Variable processing of the IgA protease autotransporter at the cell surface of *Neisseria meningitidis* // *Microbiology (Reading). England*, 2014. Vol. 160, № Pt 11. P. 2421–2431.
138. Van Ulsen P., Van Alphen L., Ten Hove J., Fransen F., Van Der Ley P., Tommassen J. A. Neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters // *Molecular Microbiology*. 2003. Vol. 50, № 3. P. 1017–1030.
139. Toraño A., Putnam F. W. Complete amino acid sequence of the alpha 2 heavy chain of a human IgA2 immunoglobulin of the A2m (2) allotype // *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*, 1978. Vol. 75, № 2. P. 966–969.
140. Boehm M. K., Woof J. M., Kerr M. A., Perkins S. J. The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG: a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling // *J Mol Biol. Netherlands*, 1999. Vol. 286, № 5. P. 1421–1447.
141. Hauck C. R., Meyer T. F. The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp-1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae* // *FEBS Lett. England*, 1997. Vol. 405, № 1. P. 86–90.

142. Lin L., Ayala P., Larson J., Mulks M., Fukuda M., Carlsson S. R., Enns C., So M. The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells // *Mol Microbiol. England*, 1997. Vol. 24, № 5. P. 1083–1094.
143. Hopper S., Vasquez B., Merz A., Clary S., Wilbur J. S., So M. Effects of the immunoglobulin A1 protease on *Neisseria gonorrhoeae* trafficking across polarized T84 epithelial monolayers // *Infect Immun. United States*, 2000. Vol. 68, № 2. P. 906–911.
144. Binscheck T., Bartels F., Bergel H., Bigalke H., Yamasaki S., Hayashi T., Niemann H., Pohlner J. IgA protease from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits exocytosis in bovine chromaffin cells like tetanus toxin // *J Biol Chem. United States*, 1995. Vol. 270, № 4. P. 1770–1774.
145. Senior B. W., Stewart W. W., Galloway C., Kerr M. A. Cleavage of the hormone human chorionic gonadotropin, by the Type 1 IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*, and its implications // *J Infect Dis. United States*, 2001. Vol. 184, № 7. P. 922–925.
146. Kilian M., Mestecky J., Schrohenloher R. E. Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease // *Infect Immun. United States*, 1979. Vol. 26, № 1. P. 143–149.
147. Vitovski S., Dunkin K. T., Howard A. J., Sayers J. R. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Carriage and Disease: A Difference in IgA1 Protease Activity Levels // *JAMA*. 2002. Vol. 287, № 13. P. 1699.
148. Murphy T. F., Kirkham C., Jones M. M., Sethi S., Kong Y., Pettigrew M. M. Expression of IgA Proteases by *Haemophilus influenzae* in the Respiratory Tract of Adults With Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *J Infect Dis*. 2015. Vol. 212, № 11. P. 1798–1805.
149. Johnson T. A., Qiu J., Plaut A. G., Holyoak T. Active-site gating regulates substrate selectivity in a chymotrypsin-like serine protease the structure of *Haemophilus influenzae* immunoglobulin A1 protease // *J Mol Biol. Netherlands*, 2009. Vol. 389, № 3. P. 559–574.
150. 3H09: The structure of *Haemophilus influenzae* IgA1 protease [Электронный ресурс] // RCSB PDB. 2009. URL: <https://www.rcsb.org/structure/3H09> (дата обращения: 22.04.2026).
151. Wani J. H., Gilbert J. V., Plaut A. G., Weiser J. N. Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae* // *Infect Immun. United States*, 1996. Vol. 64, № 10. P. 3967–3974.
152. Romanello V., Marcacci M., Dal Molin F., Moschioni M., Censini S., Covacci A., Baritussio A. G., Montecucco C., Tonello F. Cloning, expression, purification, and characterization of *Streptococcus pneumoniae* IgA1 protease // *Protein Expr Purif. United States*, 2006. Vol. 45, № 1. P. 142–149.

153. Achtman M., Moreau M. IgA1 protease fragment as carrier peptides: пат. US 7235242 B2 USA. 2007.
154. Gupta S. K., Smita S., Sarangi A. N., Srivastava M., Akhoun B. A., Rahman Q., Gupta S. K. In silico CD4+ T-cell epitope prediction and HLA distribution analysis for the potential proteins of *Neisseria meningitidis* Serogroup B—A clue for vaccine development // *Vaccine*. 2010. Vol. 28, № 43. P. 7092–7097.
155. Lomholt H., Kilian M. Antigenic relationships among immunoglobulin A1 proteases from *Haemophilus*, *Neisseria*, and *Streptococcus* species // *Infect Immun*. United States, 1994. Vol. 62, № 8. P. 3178–3183.
156. Lomholt H., Poulsen K., Kilian M. Comparative characterization of the *iga* gene encoding IgA1 protease in *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* // *Molecular Microbiology*. 1995. Vol. 15, № 3. P. 495–506.
157. Lomholt J. A., Kilian M. Immunoglobulin A1 protease activity in *Gemella haemolysans* // *J Clin Microbiol*. United States, 2000. Vol. 38, № 7. P. 2760–2762.
158. Kotelnikova O. V., Zinchenko A. A., Vikhrov A. A., Alliluev A. P., Serova O. V., Gordeeva E. A., Zhigis L. S., Zueva V. S., Razgulyaeva O. A., Melikhova T. D., Nokel E. A., Drozhzhina E. Yu., Rumsh L. D. Serological Analysis of Immunogenic Properties of Recombinant Meningococcus IgA1 Protease-Based Proteins // *Bull Exp Biol Med*. 2016. Vol. 161, № 3. P. 391–394.
159. Zinchenko A. A., Alliluev A. P., Serova O. V., Gordeeva E. A., Zhigis L. S., Zueva V. S., Razgulyaeva O. A., Melikhova T. D., Nokel E. A., Drozhzhina E. Yu., Kotelnikova O. V., Rumsh L. D. Immunogenic and Protective Properties of Recombinant Proteins Based on Meningococcal Iga1 Protease // *J Meningitis*. 2015. Vol. 01, № 01.
160. Zinchenko A. A., Kotelnikova O. V., Gordeeva E. A., Prokopenko Yu. A., Razgulyaeva O. A., Serova O. V., Melikhova T. D., Nokel E. A., Zhigis L. S., Zueva V. S., Alliluev A. P., Rumsh L. D. Immunogenic and Protective Properties of *Neisseria meningitidis* IgA1 Protease and of Its Truncated Fragments // *Russ J Bioorg Chem*. 2018. Vol. 44, № 1. P. 64–72.
161. Kotel'nikova O. V., Alliluev A. P., Zinchenko A. A., Prokopenko Yu. A., Zhigis L. S., Zueva V. S., Razgulyaeva O. A., Gordeeva E. A., Melikhova T. D., Nokel' E. A., Rumsh L. D. Peculiarities of the Formation of Antimeningococcus Immunity in Mice Immunized with Fragments of *N. meningitidis* IgA1 Protease // *Bull Exp Biol Med*. 2018. Vol. 165, № 6. P. 763–766.
162. 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 infections // *Microbes and Infection*. 2019. Vol. 21, № 7. P. 336–340.
163. Zinchenko A. A., Serova O. V., Prokopenko Y. A., Gordeeva E. A., Melikhova T. D., Nokel E. A., Kaliberda E. N., Kotelnikova O. V., Zhigis L. S., Razgulyaeva O. A., Alliluev A. P., Rumsh L. D. Recombinant protein having protective action on meningococcus (embodiments), polynucleotide coding recombinant protein, recombinant plasmid DNA containing said polynucleotide, host cell containing said recombinant plasmid DNA, method of producing recombinant protein: пат. RU2701964C2 USA. 2019.
164. Казеева Т. Н., Шевелев А. Б., Леонович О. А., Фаизов Т. Х., Белякова А. В., Лебедева А. А., Кузнецова Т. В., Маракасова Е. С., Ермохина О. В., Эпова Е. Ю., Дудорова М. Г., Соцкова Д. В., Волкова Е. А., Терехина А. С., Воронова Т. Ю., Васильев И. А. Структурные и функциональные особенности IgA1-протеаз // *Совр. пробл. науки и образования*. 2012. Т. 2012, № 1.
165. Pérez-Ortega J., Rodríguez A., Ribes E., Tommassen J., Arenas J. Interstrain Cooperation in Meningococcal Biofilms: Role of Autotransporters NalP and AutA // *Front Microbiol. Switzerland*, 2017. Vol. 8. P. 434.
166. Tommassen J., Arenas J. Biological Functions of the Secretome of *Neisseria meningitidis* // *Front Cell Infect Microbiol. Switzerland*, 2017. Vol. 7. P. 256.
167. Харсеева Г. Г., Тюкавкина С. Ю. Основы вакцинологии. Оценка поствакцинального иммунитета (материал для подготовки лекции) // *Infectious diseases: News, Opinions, Training*. 2020. Т. 9, № 3. С. 106–118.
168. Беликова Ю. А., Самсонов Ю. В., Абакушина Е. В. Современные вакцины и коронавирусные инфекции // *Issled. prakt. med. (Print)*. 2020. Т. 7, № 4. С. 135–154.
169. Kayser V., Ramzan I. Vaccines and vaccination: history and emerging issues // *Hum Vaccin Immunother. United States*, 2021. Vol. 17, № 12. P. 5255–5268.
170. Dretler A. W., Roupheal N. G., Stephens D. S. Progress toward the global control of *Neisseria meningitidis*: 21st century vaccines, current guidelines, and challenges for future vaccine development // *Hum Vaccin Immunother. United States*, 2018. Vol. 14, № 5. P. 1146–1160.
171. Meningococcal Vaccine Safety [Электронный ресурс] // U.S. Centers for Disease Control and prevention. URL: <https://www.cdc.gov/vaccine-safety/vaccines/meningococcal.html> (дата обращения: 10.09.2025).
172. Anosike C., Ojiakor I. M., Etiaba E. I., Uguru N. P., Ezenduka C. C., Onwujekwe O. Cost-effectiveness and budget impact of malaria, measles, and meningitis vaccines in Africa: a scoping review // *Vaccine. Netherlands*, 2025. Vol. 67. P. 127853.

173. Caron F., du Châtelet I. P., Leroy J.-P., Ruckly C., Blanchard M., Bohic N., Massy N., Morer I., Floret D., Delbos V., Hong E., Révillion M., Berthelot G., Lemée L., Deghmane A.-E., Bénichou J., Lévy-Bruhl D., Taha M.-K. From tailor-made to ready-to-wear meningococcal B vaccines: longitudinal study of a clonal meningococcal B outbreak // *Lancet Infect Dis.* United States, 2011. Vol. 11, № 6. P. 455–463.
174. Королева И. С., Белошицкий Г. В., Закроева И. М., Королева М. А. Эпидемиологические аспекты гнойных бактериальных менингитов в Российской Федерации // *Инф. и иммунитет.* 2012. Т. 2, № 1–2. С. 546–547.
175. Pérez O., Lastre M., Lapinet J., Bracho G., Díaz M., Zayas C., Taboada C., Sierra G. Immune response induction and new effector mechanisms possibly involved in protection conferred by the Cuban anti-meningococcal BC vaccine // *Infect Immun.* United States, 2001. Vol. 69, № 7. P. 4502–4508.
176. Uli L., Castellanos-Serra L., Betancourt L., Domínguez F., Barberá R., Sotolongo F., Guillén G., Pajón Feyt R. Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry // *Proteomics.* Germany, 2006. Vol. 6, № 11. P. 3389–3399.
177. Sierra-González V. G. Cuban Meningococcal Vaccine VA-MENGOC-BC:30 Years of Use and Future Potential // *MEDICC Rev.* United States, 2019. Vol. 21, № 4. P. 19–27.
178. Folaranmi T., Rubin L., Martin S. W., Patel M., MacNeil J. R. Use of Serogroup B Meningococcal Vaccines in Persons Aged ≥ 10 Years at Increased Risk for Serogroup B Meningococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015 // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* United States, 2015. Vol. 64, № 22. P. 608–612.
179. Granoff D. M. Review of meningococcal group B vaccines // *Clin Infect Dis.* United States, 2010. Vol. 50 Suppl 2, № S2. P. S54-65.
180. Gossger N., Snape M. D., Yu L.-M., Finn A., Bona G., Esposito S., Principi N., Diez-Domingo J., Sokal E., Becker B., Kieninger D., Prymula R., Dull P., Ypma E., Toneatto D., Kimura A., Pollard A. J. Immunogenicity and tolerability of recombinant serogroup B meningococcal vaccine administered with or without routine infant vaccinations according to different immunization schedules: a randomized controlled trial // *JAMA.* United States, 2012. Vol. 307, № 6. P. 573–582.
181. Holst J., Oster P., Arnold R., Tatley M. V., Næss L. M., Aaberge I. S., Galloway Y., McNicholas A., O’Hallahan J., Rosenqvist E., Black S. Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs

- and implications for the future // *Hum Vaccin Immunother.* United States, 2013. Vol. 9, № 6. P. 1241–1253.
182. TRUMENBA [Электронный ресурс] // U.S. Food and Drug Administration. 2024. URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/trumenba> (дата обращения: 15.04.2026).
183. FDA Approves PENBRAYA™, the First and Only Vaccine for the Prevention of the Five Most Common Serogroups Causing Meningococcal Disease in Adolescents [Электронный ресурс] // Pfizer. 2023. URL: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/fda-approves-penbrayatm-first-and-only-vaccine-prevention> (дата обращения: 15.04.2026).
184. PENMENVY [Электронный ресурс] // U.S. Food and Drug Administration. 2025. URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/penmenvy> (дата обращения: 15.04.2026).
185. BEXSERO [Электронный ресурс] // U.S. Food and Drug Administration. 2024. URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/bexsero> (дата обращения: 15.04.2026).
186. PENBRAYA [Электронный ресурс] // U.S. Food and Drug Administration. 2024. URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/penbraya> (дата обращения: 15.04.2026).
187. MENVEO [Электронный ресурс] // U.S. Food and Drug Administration. 2025. URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/menveo> (дата обращения: 15.04.2026).
188. Sayers E. W., Beck J., Bolton E. E., Brister J. R., Chan J., Connor R., Feldgarden M., Fine A. M., Funk K., Hoffman J., Kannan S., Kelly C., Klimke W., Kim S., Lathrop S., Marchler-Bauer A., Murphy T. D., O'Sullivan C., Schmieder E., Skripchenko Y., Stine A., Thibaud-Nissen F., Wang J., Ye J., Zellers E., Schneider V. A., Pruitt K. D. Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2025 // *Nucleic Acids Research.* 2025. Vol. 53, № D1. P. D20–D29.
189. Goldfarb T., Kodali V. K., Pujar S., Brover V., Robbertse B., Farrell C. M., Oh D.-H., Astashyn A., Ermolaeva O., Haddad D., Hlavina W., Hoffman J., Jackson J. D., Joardar V. S., Kristensen D., Masterson P., McGarvey K. M., McVeigh R., Mozes E., Murphy M. R., Schafer S. S., Souvorov A., Spurrier B., Strobe P. K., Sun H., Vatsan A. R., Wallin C., Webb D., Brister J. R., Hatcher E., Kimchi A., Klimke W., Marchler-Bauer A., Pruitt K. D., Thibaud-Nissen F., Murphy T. D. NCBI RefSeq: reference sequence standards through

- 25 years of curation and annotation // *Nucleic Acids Research*. 2025. Vol. 53, № D1. P. D243–D257.
190. Sayers E. W., Cavanaugh M., Frisse L., Pruitt K. D., Schneider V. A., Underwood B. A., Yankie L., Karsch-Mizrachi I. GenBank 2025 update // *Nucleic Acids Research*. 2025. Vol. 53, № D1. P. D56–D61.
191. O’Cathail C., Ahamed A., Burgin J., Cummins C., Devaraj R., Gueye K., Gupta D., Gupta V., Haseeb M., Ihsan M., Ivanov E., Jayathilaka S., Kadhivelu V., Kumar M., Lathi A., Leinonen R., McKinnon J., Meszaros L., Pauperio J., Pesant S., Rahman N., Rinck G., Selvakumar S., Suman S., Sunthornytin Y., Ventouratou M., Waheed Z., Woollard P., Yuan D., Zyoud A., Burdett T., Cochrane G. The European Nucleotide Archive in 2024 // *Nucleic Acids Research*. 2025. Vol. 53, № D1. P. D49–D55.
192. Altschul S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Research*. 1997. Vol. 25, № 17. P. 3389–3402.
193. Altschul S. F., Wootton J. C., Gertz E. M., Agarwala R., Morgulis A., Schäffer A. A., Yu Y. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices // *The FEBS Journal*. 2005. Vol. 272, № 20. P. 5101–5109.
194. Waterhouse A. M., Procter J. B., Martin D. M. A., Clamp M., Barton G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25, № 9. P. 1189–1191.
195. Troshin P. V., Procter J. B., Barton G. J. Java bioinformatics analysis web services for multiple sequence alignment—JABAWS:MSA // *Bioinformatics*. 2011. Vol. 27, № 14. P. 2001–2002.
196. Troshin P. V., Procter J. B., Sherstnev A., Barton D. L., Madeira F., Barton G. J. JABAWS 2.2 distributed web services for Bioinformatics: protein disorder, conservation and RNA secondary structure // *Bioinformatics* / Hancock J., ed. 2018. Vol. 34, № 11. P. 1939–1940.
197. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // *Briefings in Bioinformatics*. 2019. Vol. 20, № 4. P. 1160–1166.
198. Vita R., Blazeska N., Marrama D., IEDB Curation Team Members, Shackelford D., Zalman L., Foos G., Zarebski L., Chan K., Reardon B., Fitzpatrick S., Busse M., Coleman S., Sedwick C., Edwards L., MacFarlane C., Ennis M., Duesing S., Bennett J., Greenbaum J., De Almeida Mendes M., Mahita J., Wheeler D. K., Cantrell J. R., Overton J. A., Natale D. A., Sette A., Peters B. The Immune Epitope Database (IEDB): 2024 update // *Nucleic Acids Research*. 2025. Vol. 53, № D1. P. D436–D443.

199. Wang P., Sidney J., Dow C., Mothé B., Sette A., Peters B. A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach // *PLoS Computational Biology* / Stormo G., ed. 2008. Vol. 4, № 4. P. e1000048.
200. Wang P., Sidney J., Kim Y., Sette A., Lund O., Nielsen M., Peters B. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules // *BMC Bioinformatics*. 2010. Vol. 11, № 1. P. 568.
201. Paul S., Lindestam Arlehamn C. S., Scriba T. J., Dillon M. B. C., Oseroff C., Hinz D., McKinney D. M., Carrasco Pro S., Sidney J., Peters B., Sette A. Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes // *J Immunol Methods*. Netherlands, 2015. Vol. 422. P. 28–34.
202. Reynisson B., Alvarez B., Paul S., Peters B., Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data // *Nucleic Acids Research*. 2020. Vol. 48, № W1. P. W449–W454.
203. Greenbaum J., Sidney J., Chung J., Brander C., Peters B., Sette A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes // *Immunogenetics*. 2011. Vol. 63, № 6. P. 325–335.
204. Weiskopf D., Angelo M. A., de Azeredo E. L., Sidney J., Greenbaum J. A., Fernando A. N., Broadwater A., Kolla R. V., De Silva A. D., de Silva A. M., Mattia K. A., Doranz B. J., Grey H. M., Shresta S., Peters B., Sette A. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8⁺ T cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States, 2013. Vol. 110, № 22. P. E2046-2053.
205. Bui H.-H., Sidney J., Dinh K., Southwood S., Newman M. J., Sette A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines // *BMC Bioinformatics*. 2006. Vol. 7, № 1. P. 153.
206. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S. A. A., Ballard A. J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A. W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. 2021. Vol. 596, № 7873. P. 583–589.
207. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all // *Nat Methods*. 2022. Vol. 19, № 6. P. 679–682.

208. Guex N., Peitsch M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis*. Germany, 1997. Vol. 18, № 15. P. 2714–2723.
209. Ponomarenko J., Bui H.-H., Li W., Fusseder N., Bourne P. E., Sette A., Peters B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes // *BMC Bioinformatics*. 2008. Vol. 9, № 1. P. 514.
210. Kringelum J. V., Lundegaard C., Lund O., Nielsen M. Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking // *PLoS Comput Biol* / Peters B., ed. 2012. Vol. 8, № 12. P. e1002829.
211. Qi T., Qiu T., Zhang Q., Tang K., Fan Y., Qiu J., Wu D., Zhang W., Chen Y., Gao J., Zhu R., Cao Z. SEPPA 2.0—more refined server to predict spatial epitope considering species of immune host and subcellular localization of protein antigen // *Nucleic Acids Research*. 2014. Vol. 42, № W1. P. W59–W63.
212. Zhou C., Chen Z., Zhang L., Yan D., Mao T., Tang K., Qiu T., Cao Z. SEPPA 3.0-enhanced spatial epitope prediction enabling glycoprotein antigens // *Nucleic Acids Res*. England, 2019. Vol. 47, № W1. P. W388–W394.
213. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server // *The Proteomics Protocols Handbook* / Walker J. M. Totowa, ed., NJ: Humana Press, 2005. P. 571–607.
214. Bjellqvist B., Hughes G. J., Pasquali C., Paquet N., Ravier F., Sanchez J. C., Frutiger S., Hochstrasser D. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences // *Electrophoresis*. Germany, 1993. Vol. 14, № 10. P. 1023–1031.
215. Frequently Asked Questions [Электронный ресурс] // AlphaFold Protein Structure Database. URL: <https://alphafold.ebi.ac.uk/faq> (дата обращения: 25.01.2024).
216. Christodoulides M., Humbert M. V., Heckels J. E. The potential utility of liposomes for *Neisseria* vaccines // *Expert Rev Vaccines*. England, 2021. Vol. 20, № 10. P. 1235–1256.
217. Harding C. V., Collins D. S., Kanagawa O., Unanue E. R. Liposome-encapsulated antigens engender lysosomal processing for class II MHC presentation and cytosolic processing for class I presentation // *J Immunol*. England, 1991. Vol. 147, № 9. P. 2860–2863.

Приложения

Приложение А

Список штаммов, нуклеотидные последовательности из геномов которых были получены в European Nucleotide Archive (см. Раздел 2.4.3.):

N. meningitidis strains BA3030 (Assembly: GCA_002265135.1), M12611 (Assembly: GCA_001407255.1), NM1359 (Assembly: GCA_001123285.1), NM3680 (Assembly: GCA_000818515.1), NM3684 (Assembly: GCA_000818495.1), NM3685 (Assembly: GCA_000818505.1), NM3688 (Assembly: GCA_000818525.1), S00-1238 (Assembly: GCA_003799305.1), S00-1241 (Assembly: GCA_003799315.1), VB734 (Assembly: GCA_002001345.1), VB860 (Assembly: GCA_002001355.1) и VB35262 (Assembly: GCA_002001405.1). *N. gonorrhoeae* strains 09_10_003 (Assembly: GCA_001431825.1), 20/15/004 (Assembly: GCA_002289125.1), gc-206 (Assembly: GCA_006225405.1), gc-207 (Assembly: GCA_006225845.1) и NCTC11421 (Assembly: GCA_900454075.1).

Приложение Б

Праймеры, использованные при создании генетических конструкций.

Белок	Праймер	Последовательность (5'-3')
АЕ	IgA1-Nde-28	GACAGCCATATGGCATTGGTCAGAGACGATGTC
	IgA1-Xho-1004	GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT
Белок 9	IgA1-E135	GAACCAAATAAAAATTGGCATCAC
	IgA1-H328-Xho	GCGCTCGAGATGATGTTCTCCATTACCTTTGA
Белок 10	IgA1-W329	TGGAACATTACTIONTTTGGCACAAA
	IgA1-H622-Xho	GCGCTCGAGGTGGTTCATCGCGTTTTTCTTG
Белок 4	IgA1-H835	CATTTGACTGGCGACAGCCAA
	IgA1-P1004-Xho	GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT
Белок 8	IgA1-W140	TGGCATCACGAAATCAAGGTC
	IgA1-K833-Xho	GCGCTCGAGTTTGCTATGTTGGTTTAGGCTGA
Белок 3	IgA1-W329	TGGAACATTACTIONTTTGGCACAAA
	IgA1-Xho-1004	GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT
Белок 11	f1	TGGCATCACGAAATCAAGGTC
	f2	CCATTTCGGATTTTTGACTTGCCAAATGATGTTCTCCATTACCTTTGAT
	f3	TGATTGATTTTGAGCGTGTGGTAGTCGTTATTTTCTGTTACACCGT
	f4	GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT
Белок 13	f1	TGGCATCACGAAATCAAGGTC
	f4	GCGCTCGAGAGGCGGTGCGACGACGATAT
	f5	ATGATTGATTTTGAGCGTGTGGTATTGCCAAGAGTTTTTTTGATAGCC
Белок 11 в составе рсDNA3.1	IgA1-W140-HindIII	GCGAAGCTTATGTGGCATCACGAAATCAAG
	IgA1-P1004-XbaI	CGCTCTAGATCAAGGCGGTGCGACGACGATATT