

Разработка кандидатной субстанции рекомбинантного белка CRM197

Е.Г. Богомолова (bogomolovaele@inbox.ru), О.А. Добровольская, А.А. Мировская, Р.И. Аль-Шехадат, Е.А. Федорова, И.В. Духовлинов, А.С. Симбирцев

ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА, Санкт-Петербург

Резюме

Белок CRM197 является одним из нетоксичных вариантов дифтерийного токсина, характеризующийся единичной мутацией, а именно, заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52. Белок CRM197 является перспективным адъювантом нового поколения, который может быть успешно использован в вакцинных и терапевтических препаратах. Классическим способом получения дифтерийного токсина и его нетоксичных вариантов является продукция в клетках *Corynebacterium diphtheriae*. Преимущество использования *E.coli* в качестве продуцента заключается в том, что данный метод является более простым и дешевым, и позволяет получать рекомбинантный CRM197 в короткие сроки с использованием непатогенного микроорганизма. В ходе исследования разработан состав кандидатной субстанции CRM197 на основе анализа физико-химических свойств белка, а также специфики его применения в составе конъюгированных вакцин. В субстанции рекомбинантного белка CRM197 присутствуют примеси белка штамма-продуцента – 0,054 нг/мкг белка CRM197, ДНК штамма-продуцента 1,26 пг/мкг белка CRM197, а также остаточные эндотоксины менее 0,078 EU на 1 мг белка. Таким образом, белок CRM197, являющийся нетоксичным вариантом дифтерийного токсина, представляет собой перспективный адъювант нового поколения, который может быть успешно использован в вакцинных и терапевтических препаратах. Использование трехступенчатой очистки позволило получить рекомбинантный белок CRM197 фармацевтически приемлемого качества. Данный метод имеет перспективы по внедрению в производственную практику.

Ключевые слова: рекомбинантный CRM197, субстанция, адъювант, конъюгированные вакцины

Development of Pharmacology Grade Substance of Recombinant Protein CRM197

E.G. Bogomolova (bogomolovaele@inbox.ru), O.A. Dobrovol'skaya, A.A. Mirovskaya, R.I. Al-Shehadat, E.A. Fedorova, I.V. Dukhovlinov, A.S. Simbirtsev

Federal State Unitary Enterprise «Research Institute of Highly Pure Biopreparations» Federal Biomedical Agency, St. Petersburg

Abstract

CRM197 is a non-toxic mutant of diphtheria toxin having a single amino acid substitution of a glycine for a glutamic acid in position 52. Being naturally nontoxic, CRM197 is a promising adjuvant and ideal carrier protein for conjugate vaccines. Typically, production of diphtheria toxic and non-toxic mutants are carried out in *Corynebacterium diphtheriae*. Production of recombinant CRM197 in *Escherichia coli* is advantageous. It is simple, cheap and permits production of the target protein in a short time using a non-pathogenic microorganism. In this study the pharmacology grade substance of recombinant protein CRM197 was developed based on chemical properties of the protein. The substance of recombinant protein CRM197 is characterized by presence of 0.054 ng/mcg of CRM197 *E. coli* host cell protein, 1.26 pg/mcg of CRM197 *E.coli* Host Cell DNA and less than 0,078 EU endotoxins per 1 mg of recombinant protein CRM197.

Key words: recombinant CRM197, substance, adjuvant, conjugate vaccine

Введение

Дифтерия – острое инфекционное заболевание, возбудителем которого является бактерия *Corynebacterium diphtheriae*. Для этой инфекции характерно токсическое поражение организма, преимущественно сердечно-сосудистой и нервной систем, а также местный воспалительный процесс с образованием фибринового налета. Тяжесть заболевания обусловлена токсином, который выделяет дифтерийная палочка.

Белок CRM197 – один из нетоксичных вариантов дифтерийного токсина с единичной мутацией, а именно, заменой глицина на глутаминовую кислоту в

положении 52. Ген, кодирующий CRM197, относится к мутантному фагу 197tox-. Белок CRM197 нетоксичен, тем не менее, сохраняет те же воспалительные и иммуностимулирующие свойства, что и дифтерийный токсин, благодаря чему он широко используется в качестве безопасного носителя в конъюгированных вакцинах [1, 2]. В настоящее время помимо оценки эффективности уже применяющихся препаратов, в состав которых входит CRM197, активно идет разработка новых поли- и олигосахаридных вакцин против различных бактериальных инфекций.

Впервые гликоконъюгированные вакцины были получены в 1980-х годах, и тогда же они

продемонстрировали эффективность против бактериальных патогенов, являющихся причиной таких заболеваний, как гемофильная инфекция типа В (Hib), пневмококковые и менингококковые инфекции.

Конъюгированные вакцины производятся путем связывания части полисахаридной капсулы организма с белком-носителем. Эта комбинация более иммуногенна, чем полисахарид в одиночку, а также способна индуцировать Т-клеточную память после ревакцинации. Конъюгированные вакцины были разработаны на основе нескольких белковых носителей, одним из которых является CRM197. Белок-носитель ковалентно связывают с капсидными полисахаридами, в результате чего получают высокоиммуногенные антигены, вызывающие активацию Т-клеточного ответа.

Вакцины, содержащие CRM197 в качестве белка-носителя, были успешно использованы для иммунизации сотен миллионов детей [3]. Первой разработанной конъюгированной вакциной, в состав которой входит CRM197, была вакцина HВОС (HibTITER®; Wyeth Pharmaceuticals, Филадельфия, Пенсильвания, США) против заболеваний, вызываемых гемофильной инфекцией. Было обнаружено, что вакцина хорошо переносится, иммуногенна и приводит к снижению заболеваемости на 94% у детей в возрасте от 0 до 8 лет [4].

Другим примером конъюгированной вакцины с CRM197 является PCV13 (Prevenar 13TM, Pfaizer), 13-валентная вакцина против инвазивной пневмококковой инфекции, вызываемой *Streptococcus pneumoniae*. Вакцинация данным препаратом приводит к снижению заболеваемости как среди детей, так и взрослых. [5].

В конце 1990-х годов были разработаны две конъюгированные вакцины на основе CRM197 против менингококковой инфекции, вызываемой серотипом С (Meningitec®, Фармацевтика Wyeth; Menjugate®, Novartis Vaccines, Сиена, Италия). Клинические испытания показали, что в результате иммунизации данными вакцинами заболеваемость снижается во всех возрастных группах. Вакцины лицензированы и рекомендованы к применению в ряде европейских стран [6].

Интерес к CRM197 возрастает все больше и в связи с его потенциальной противоопухолевой активностью, реализующейся за счет способности связывать растворимую форму HB-EGF (гепарин-связывающего эпидермального фактора роста), имеющую высокий уровень экспрессии при различных видах онкологических заболеваний.

Классическим способом получения CRM197 является его продукция в клетках *Corynebacterium diphtheria*. Альтернативой классическому способу служит экспрессия его гена в клетках *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* [7, 8]. Однако более перспективным представляется метод получения полноразмерного рекомбинантного CRM197 в клетках *Escherichia coli*. Преимущество этого ме-

тода состоит в том, что он позволяет, используя непатогенный микроорганизм, получать рекомбинантный CRM197 в короткие сроки более простым и дешевым способом по сравнению с классическим. Таким образом, получение рекомбинантного CRM197 в клетках *E. coli* подходит для использования в производственных масштабах. Более того, этот метод может быть использован для производства других производных дифтерийного токсина для фундаментальных исследований или в медицинских целях.

В виду широкого применения белка CRM197 в составе вакцинных препаратов и отсутствия в России технологии его получения, актуальной является ее разработка. Получаемый белок, компонент конъюгированных вакцинных препаратов, должен соответствовать требованиям Фармакопеи и ее компонент для получения конъюгированных вакцинных препаратов следующим условиям – не более 0,2 нг/мкг белка; содержание ДНК штамма-продуцента, не более 2 пг/мкг белка; не более 10,0 ЕЭ на 1,0 мг белка бактериальных эндотоксинов.

Цель данной работы – разработка состава кандидатной субстанции фармацевтически приемлемого рекомбинантного белка CRM197.

Материалы и методы

Получение рекомбинантного CRM197

Высокоочищенный препарат рекомбинантного CRM197 выделяли из штамма-продуцента *E. coli* путем последовательного применения ионообменной, гидрофобной и молекулярно-ситовой хроматографий по ранее разработанной методике [9].

Определение индекса GRAVY

Индекс GRAVY (среднее значение гидрофобности – grand average of hydropathy) рекомбинантного белка CRM197 рассчитали с помощью программы Sequence Manipulation Suite: Protein GRAVY.

Изучение агрегации белка

Для получения стабильных растворов, содержащих белок CRM197, в состав растворителя вводили аргинин, цистеин, сахарозу, маннитол, поливинилпирролидон, полисорбат 20 и сравнивали различные диапазоны pH в двух буферных системах – ацетатной и фосфатной. Агрегация белка, ведущая к формированию осадка и свидетельствующая о его денатурации, оценивали спектрофотометрически по критерию прозрачности раствора при поглощении длины волны 340 нм по методу Малкерина и Ветцеля [10].

Определение алифатического индекса

Алифатический индекс рекомбинантного белка CRM197 рассчитывали по формуле:

$$A = X_{Ala} + aX_{Val} + b(X_{Ile} + X_{Leu}),$$

где a , b – коэффициенты, соответственно равные 2,9 и 3,9;

X – содержание соответствующих (аланин, валин, изолейцин, лейцин) остатков в белке (в молярных процентах).

Определение молекулярного веса белка CRM 197 с помощью электрофореза

Выделенный и очищенный рекомбинантный белок CRM197 был разделен с использованием электрофореза в полиакриламидном геле ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях по методу Леммли.

Определение молекулярного веса проводилось с использованием калибровочной кривой, построенной по белкам-стандартам с молекулярными весами 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 и 10 кДа.

Компьютерные методы анализа данных

Анализ полиакриламидных гелей проводили с помощью программы ImageJ.

Определение остаточных белков штамма-продуцента в субстанции рекомбинантного белка CRM197

Определение остаточных белков штамма-продуцента в субстанции белка CRM197 проводили методом иммуноферментного анализа с использованием набора (*E. coli* host cell protein ELISA kit, ENZ-KIT127-0001, Германия).

Приготовление стандартных растворов белков *E. coli*: в семь пробирок объемом 1,5 мл поместили 1 мл буфера для разведения, одна из пробирок без раствора белков (бланк – 0 нг/мл), далее делали серию разведений путем добавления 500 мкл раствора белка (сток – 810 нг/мл) в одну из пробирок и последовательно добавляли по 500 мкл из предыдущей пробирки в последующую. Из полученных стандартов отбирали по 100 мкл и вносили в лунки планшета с сорбированными антителами против белков *E. coli*.

100 мкл белка CRM197 в буфере для разведения внесли в лунку планшета. Инкубировали 1,5 часа при комнатной температуре. Дважды отмыли лунки планшета 250 мкл отмывочного буфера. Добавили по 100 мкл репортерных антител в каждую лунку и инкубировали 45 мин при комнатной температуре. Дважды отмыли лунки планшета 250 мкл отмывочного буфера. Добавили по 100 мкл конъюгата стевтавидин-пероксидазы хрена (предварительно разведенного до концентрации 0,1 мкг/мл) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Дважды отмыли лунки планшета 250 мкл отмывочного буфера. Добавили по 100 мкл субстрата – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в каждую лунку и наблюдали за развитием окраски, реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента. Детектирование проводили при длине волны 450 нм.

Концентрацию остаточного белка штамма-продуцента определяли по калибровочной кривой.

Определение остаточной ДНК штамма-продуцента в субстанции рекомбинантного белка CRM197

Определение проводили с использованием набора (*E. coli* Host Cell DNA in tubes, cat No D410T, Cygnustechologies, США).

Исследуемые образцы предварительно разводили до 1 мг/мл с помощью раствора для разведения образцов. В микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл внесли по 500 мкл исследуемого образца и контроля. Затем в каждую пробирку добавили по 25 мкл протеиназы K и инкубировали в течение 30 минут при 60 °C. Затем центрифугировали в течение 1 минуты при 10 тыс. об/мин. Одновременно в пробирки объемом 2 мл внесли по 500 мкл стандартов (0, 0,4, 0,75, 2,5, 8, 30, 75 и 200 нг/мл). В каждую пробирку добавили по 1 мл буфера для экстракции, перемешали в течение 5 секунд и инкубировали в течение 5 минут. Затем центрифугировали пробирки при 10 тыс. об/мин в течение 10 минут, супернатант удалили. В каждую пробирку добавили по 1,5 мл отмывочного буфера, перемешали и инкубировали в течение 20 минут. Центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 5 минут, супернатант удаляли. Полученный осадок ресуспендировали в 500 мкл красителя PicoGreen, перемешали и инкубировали в течение 5 минут. Отбирали по 240 мкл в микропланшеты и измеряли на спектрофотометре значения абсорбции при длинах волн 485 и 525 нм. Концентрацию остаточной ДНК штамма-продуцента определяли по калибровочной кривой.

Определение содержания бактериального липополисахарида с использованием метода ЛАЛ-теста

Проводили с использованием лизата амебоцитов подковообразного краба *Limulus polyphemus*. Применяли гель-тромб вариант ЛАЛ-теста (ToxinSensor, GenScript, США). Готовили серию разведений образца белка CRM197 с шагом концентрации 5, а после предварительного определения содержания эндотоксина с шагом концентрации 2. На дно каждой апиrogenной пробирки добавляли образец белка CRM197, воду или эндотоксин объемом 100 мкл, после чего добавляли 100 мкл ЛАЛ-реактива чувствительностью 0,25 EU и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C в твердотельном термостате. Результаты оценивали по наличию или отсутствию плотного тромба на дне пробирки путем переворачивания пробирки.

Результаты и обсуждение

Будучи естественно нетоксичными, CRMs имеют большой потенциал для использования их при разработке вакцин. Наиболее перспективным признан CRM197.

В результате данного исследования получена субстанция рекомбинантного белка CRM197, полученного методом, описанным ранее Духовлиновым И.В. и соавт., 2015. Субстанция разраба-

тивалась на основе анализа физико-химических свойств рекомбинантного CRM197, среди которых индексы: GRAVI, алифатический, склонность к агрегации. Также определен молекулярный вес белка и его гомогенность.

Индекс GRAVI рассчитывается, исходя из аминокислотной последовательности, и характеризует растворимость белка. Если GRAVY белка положителен, то данный белок является гидрофобным и, следовательно, плохо растворимым в воде; если GRAVY отрицателен, то белок является гидрофильным и, следовательно, хорошо растворимым в воде. GRAVY для рекомбинантного белка CRM197 он составил -0,339, что свидетельствует о хорошей растворимости данного белка в водных растворах.

Алифатический индекс белка определяет относительный объем, занимаемый алифатическими боковыми цепями следующих аминокислотных остатков: аланин, валин, лейцин и изолейцин. Чем выше алифатический индекс, тем выше термостабильность глобулярных белков. Для определения алифатического индекса, были рассчитаны молярные массы всего белка и отдельно аминокислот, составляющих белок CRM197:

Мобщ = 68035.30 г/моль, MAla = 3563.74 г/моль, MVal = 5388.76 г/моль, Mlle = 4328.73 г/моль, MLeu = 4722.25 г/моль. Затем рассчитали молярный процент содержания в молекуле белка каждой аминокислоты:

$$XAla = 5.24\%, XVal = 7.92\%, Xlle = 6.87\%, \\ XLeu = 6.94\%.$$

Подставив значения в формулу, рассчитали алифатический индекс рекомбинантного белка CRM197, который составил 82.067. Это характеризует белок как средне термостабильную белковую молекулу.

В процессе разработки состава кандидатной субстанции рекомбинантного CRM197 были проанализированы различные буферные системы и стабилизаторы. Полученный рекомбинантный белок CRM197 будет использован в качестве белка-носителя в составе конъюгированных полисахаридных вакцин. Конъюгация рекомбинантного белка с полисахаридными антигенами осуществляется по ϵ -NH₂ группам лизина, соответственно, субстанция рекомбинантного белка CRM197 не должна содержать свободных аминогрупп. Для оценки склонности к агрегации белка определено поглощение раствора рекомбинантного CRM197 на основе 50 мМ натрий-фосфатного буфера, содержащего 2% сахарозы и 0,1% Tween 20, pH 8,0 при длине волны 340 нм по методу Малкерина и Ветцела составило 0,047 оптических единиц. Таким образом, была подобрана система на основе фосфатного буфера, содержащего 50 мМ натрий фосфатный буфер, 2% сахарозы, 0,1% полисорбат 20 с pH 8,0 позволяющая длительно хранить раствор белка CRM197 без его денатурации.

В результате анализа выделенного и очищенного рекомбинантного белка CRM197 с использованием электрофореза в ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях по методу Леммли выяснили, что белок представлен одним бендом на уровне 59 кДа (рис. 1). Определили молекулярный вес рекомбинантного CRM197 с использованием калибровочной кривой, построенной по белкам-стандартам с молекулярными весами 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 и 10 кДа. Нами была определена математическая формула, описывающая зависимость логарифма молекулярного веса белков-стандартов от относительного расстояния миграции этих белков от начала полиакриламидного геля $IgMW = -1,2366Rf + 2,0042$. Относительное расстояние, пройденное исследуемым белком CRM197, составило 0,189. Исходя из вычисленной математической формулы, был рассчитан молекулярный вес рекомбинантного белка CRM197, который составил $Mw=59,1$ кДа. Экспериментально определенный молекулярный вес белка CRM197 (59,1 кДа) полностью соответствует молекулярному весу, рассчитанному теоретически как сумма молекулярных весов всех аминокислот, входящих в состав белка, который составил 59,3 кДа.

При определении остаточных белков штамма-продуцента в субстанции рекомбинантного белка CRM197, оптическая плотность исследуемого образца субстанции, разведенного в 10 раз составила 0,115. Таким образом, концентрация остаточных белков штамма-продуцента, рассчитанная по калибровочной кривой оказалась равной 171,9 нг/мл. Концентрация исследуемого образца белка CRM197 составляла 3,2 мг/мл, следовательно, содержание остаточных белков штамма-продуцента 53,7 нг/мг белка, то есть 0,054 нг/мкг белка CRM197.

При определении остаточной ДНК штамма-продуцента в субстанции рекомбинантного белка CRM197, показатель исследуемой пробы составила 283. Рассчитанная по калибровочному графику концентрация остаточной ДНК штамма-продуцента равна 1,26 пг/мкл, учитывая, что концентрация испытуемого образца составляла 1 мг/мл, содержание остаточной ДНК штамма-продуцента в субстанции рекомбинантного CRM197 1,26 пг/мкг.

Также проводили исследование чистоты препарата от примесей эндотоксина с использованием ЛАЛ-теста. В проведенных исследованиях значение pH образца CRM197 с концентрацией 3,2 мг/мл составил $7,42 \pm 0,03$, что соответствует значению, рекомендованному для реакции с ЛАЛ-реактивом – 6,0–8,0. Гель-тромб не образовывался при исследовании тотального (неразведенного) образца, то есть при чувствительности метода 0,25 EU/мл в образце с концентрацией 3,2 мг/мл содержится менее 0,25 EU/мл, то есть на 1 мг белка приходится менее 0,078 EU.

Выводы

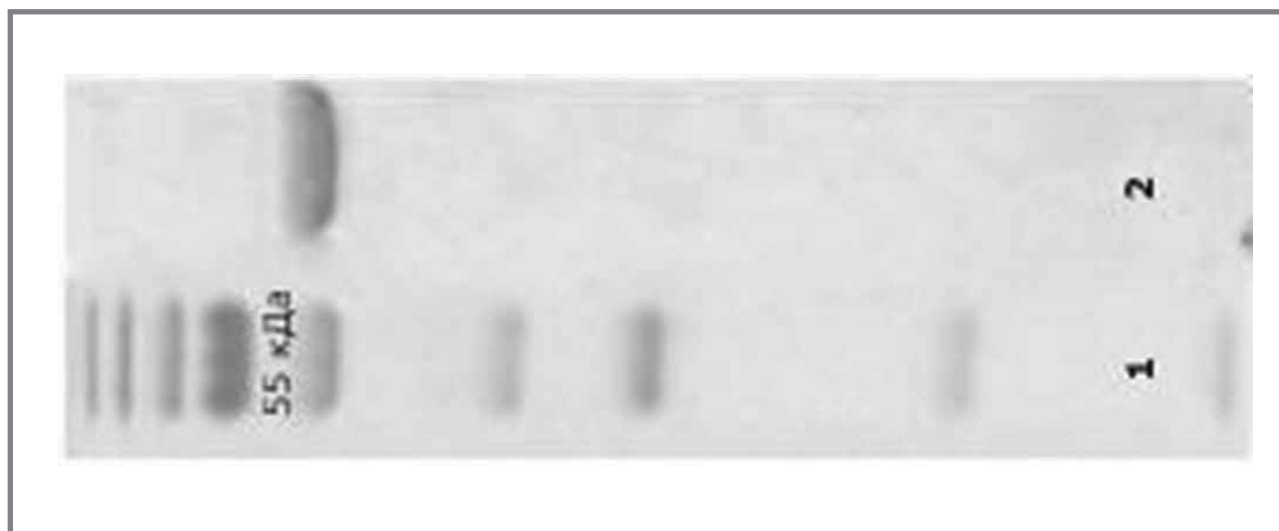
1. Изучены физико-химические свойства рекомбинантного белка CRM197, в частности определе-

Рисунок 1.

Электрофореграмма анализа рекомбинантного белка CRM197, 12,5% ПААГ, 0,1% ДДС-Na:

1 – маркер молекулярного веса (Fermentas)

2 – субстанция рекомбинантного белка CRM197



ны индекс GRAVY, равный 0,339, что свидетельствует о хорошей растворимости данного белка в водных растворах, алифатический индекс, равный 82,067, что характеризует CRM197 как средне термостабильную белковую молекулу, также экспериментально определен его молекулярный вес, который полностью соответствует теоретически рассчитанному. По результатам денситометрического анализа электрофореграммы рекомбинантного белка CRM197 показано, что образец имеет чистоту 99% и представляет собой 1 полосу, что свидетельствует о его гомогенности.

2. На основе анализа физико-химических свойств белка, а также специфики его применения в составе конъюгированных вакцин, разработан состав кандидатной субстанции CRM197, представляющий собой раствор рекомбинантного белка CRM197 в 50мМ натрий фосфатном буфере, содержащем 2% сахарозы, 0,1% Tween 20, pH 8,0.
3. В субстанции рекомбинантного белка CRM197 присутствуют примеси белка штамма-продуцента равные 0,054 нг/мкг белка CRM197, ДНК штамма-продуцента 1,26 пг/мкг белка CRM197, а также остаточные эндотоксины менее 0,078

EU на 1 мг белка, что характеризует ее как фармацевтически приемлемую.

Таким образом, белок CRM197, являющийся нетоксичным вариантом дифтерийного токсина, представляет собой перспективный адъювант нового поколения, который может быть успешно использован в вакцинных и терапевтических препаратах. Использование трехступенчатой очистки позволило получить рекомбинантный белок CRM197 фармацевтически приемлемого качества. Данный метод имеет перспективы по внедрению в производственную практику.

Исследование выполнено в рамках НИОКР по соглашению № 14.579.21.0022 с Минобрнауки РФ о предоставлении субсидии из федерального бюджета для прикладных научных исследований по лоту шифр 2014-14-579-0001 по теме: «Разработка конъюгированных вакцин на основе синтетических углеводных лигандов против возбудителей госпитальных инфекций». Соглашение о выделении субсидий № 14.579.21.0022 от 05 июня 2014 г. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI57914X0022.

Литература

1. Blanchard-Rohner G. The B-cell response to a primary and booster course of MenACWY-CRM₁₉₇ vaccine administered at 2, 4 and 12 months of age. *Vaccine*. 2013; 31 (20): 2441 – 2448.
2. Malito E. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109 (14): 5229 – 5234.
3. Pollard A.J. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9 (3): 213 – 220.
4. Shinefield H.R. Postlicensure surveillance for *Haemophilus influenzae* type b invasive disease after use of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide CRM197 conjugate vaccine in a large defined United States population: a four-year eight-month follow-up. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1995; 14 (11): 978 – 981.
5. Black S. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000; 19 (3): 187 – 195.
6. Shinefield H.R. Overview of the development and current use of CRM(197) conjugate vaccines for pediatric use. *Vaccine*. 2010; 28 (27): 4335 – 4339.
7. Zhou J. Secretory expression of recombinant diphtheria toxin mutants in *B. Subtilis*. *J. Tongji Med. Univ. Tongji Med. Univ. Tongji Med. Univ. Tongji Med. Univ.* 1999; 19 (4): 253 – 256.
8. Retallack D.M. Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expr. Purif.* 2012; 81 (2): 157 – 165.
9. Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев А.С. Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli*. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5 (1): 37 – 44.
10. Mulkern M. G., Wetzel R. pH dependence of the reversible and irreversible thermal denaturation of interferons. *Biochemistry*. 1989; 28: 6556 – 6561.

References

1. Blanchard-Rohner G. The B-cell response to a primary and booster course of MenACWY-CRM₁₉₇ vaccine administered at 2, 4 and 12 months of age. *Vaccine*. 2013; 31 (20): 2441 – 2448.
2. Malito E. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109 (14): 5229–5234.
3. Pollard A.J. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9 (3): 213–220.
4. Shinefield H.R. Postlicensure surveillance for *Haemophilus influenzae* type b invasive disease after use of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide CRM197 conjugate vaccine in a large defined United States population: a four-year eight-month follow-up. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1995; 14 (11): 978 – 981.
5. Black S. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000; 19 (3): 187 – 195.
6. Shinefield H.R. Overview of the development and current use of CRM(197) conjugate vaccines for pediatric use. *Vaccine*. 2010; 28 (27): 4335 – 4339.
7. Zhou J. Secretory expression of recombinant diphtheria toxin mutants in *B. Subtilis*. *J. Tongji Med. Univ. Tong Ji Yi Ke Xue Xue Bao*. 1999; 19 (4): 253 – 256.
8. Retallack D.M. Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expr. Purif.* 2012; 81 (2): 157 – 165.
9. Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S. Production of recombinant protein CRM197 in *Escherichia coli*. *Russian journal of infection and immunity*. 2015; 5 (1): 37 – 44 (in Russian).
10. Mulken M. G., Wetzel, R. pH dependence of the reversible and irreversible thermal denaturation of interferons. *Biochemistry*. 1989; 28: 6556 – 6561.

Вакцинация детей с ревматическими заболеваниями

М.П. Костинов (vaccinums@gmail.com), А.А. Тарасова

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Москва

Резюме

Освещены особенности вакцинации детей с ревматическими заболеваниями. Показано, каким образом схема иммунизации может быть изменена в зависимости от патологии и возраста ребенка.

Ключевые слова: иммунизация, дети с ревматическими заболеваниями

Vaccination of Children with Rheumatic Diseases

M.P. Kostinov (vaccinums@gmail.com), A.A. Tarasova

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract

Recommendations highlighted features vaccination of children with rheumatic diseases. It is shown how the immunization scheme may be changed according to the pathology and the age of the child.

Key words: immunization, children with rheumatic diseases

Вакцинация против пневмококковой инфекции

Вакцинация против пневмококковой инфекции рекомендована больным с аутоиммунными ревматоидными заболеваниями (Европейская лига против ревматизма – European League Against Rheumatism – EULAR) [94].

Согласно новой стратегии вакцинации взрослых против пневмококковой инфекции Европейская медицинская ассоциация (ЕМА), ВОЗ, Американский центр по контролю за заболеваниями (CDC) и Американский комитет по практике иммунизации (ACIP), Российское респираторное общество рекомендуют начинать вакцинацию против пневмококковой инфекции с пневмококковой конъюгированной 13-валентной вакцины (ПКВ13). Даже в случае если пациент ранее вакцинирован полисахаридной пневмококковой вакциной Пневмо 23 (ППВ23), ему необходима одна доза ПКВ13 [95 – 97].

Рекомендации по срокам вакцинации иммунокомпрометированных пациентов, в том числе с аутоиммунными заболеваниями (Клинические рекомендации по вакцинации иммунокомпрометированных Американского общества инфекционных болезней – Clinical Practice Guideline for Vaccination of the Immunocompromised of Infectious Diseases Society of America (IDSA) 2013 г.) [98]:

1. Вакцины следует вводить до планируемой иммуносупрессивной терапии, если это возможно.
2. Живые вакцины рекомендуется вводить не ранее, чем за 4 недели до иммуносупрессивной терапии и не следует в течение 2 недель после начала лечения.
3. Инактивированные вакцины вводят не ранее чем за 2 недели до начала иммуносупрессивной терапии.
4. ПКВ13 назначается взрослым и детям с хроническими воспалительными заболеваниями, которые получают иммуносупрессивную терапию по следующим схемам: