

## Потенциальная поливакцина на основе микробной IgA1-протеазы для профилактики бактериальных менингитов

А.П. Аллилуев<sup>1</sup>, О.В. Котельникова<sup>2</sup> (ovkot.2003@mail.ru), А.А. Зинченко<sup>2</sup>, Ю.А. Прокопенко<sup>2</sup>, Л.С. Жигис<sup>2</sup>, О.А. Разгуляева<sup>2</sup>, Т.Д. Мелихова<sup>2</sup>, Е.А. Нокель<sup>2</sup>, Е.Ю. Дрожжина<sup>2</sup>, Л.Д. Румш<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва

### Резюме

Изучены иммуногенная и протективная активности рекомбинантной IgA1-протеазы серинового типа, полученной на основе генома менингококка серогруппы В штамм H44/76, а также нескольких рекомбинантных белков с различной молекулярной массой, созданных на основе первичной структуры полноразмерного фермента с учетом распределения В- и Т-эпитопов. В экспериментах на лабораторных животных показано, что ряд исследованных препаратов обладает иммуногенной и протективной активностью, защищая мышей от летального заражения вирулентными штаммами менингококков серогрупп А, В и С, проявляя тем самым свойства поливакцины. Показана протективная роль антител к IgA1-протеазе при заражении мышей менингококком серогруппы В. Выявлено нарастание антител к IgA1-протеазе менингококка в крови кроликов, инфицированных различными серотипами пневмококков, что указывает на потенциальную возможность IgA1-протеазы менингококка формировать защиту от микробов, вирулентность которых обусловлена IgA1-протеазой.

**Ключевые слова:** менингококковая поливакцина, IgA1-протеаза, рекомбинантные белки, иммуногенность, протективность

### Potential Polyvaccine Based on Microbial IgA1 Protease for Prophylaxis of Bacterial Meningitis

A.P. Alliluev<sup>2</sup>, O.V. Kotelnikova<sup>1</sup> (ovkot.2003@mail.ru), A.A. Zinchenko<sup>2</sup>, Yu.A. Prokopenko<sup>2</sup>, L.S. Zhigis<sup>2</sup>, O.A. Razgulyaeva<sup>2</sup>, T.D. Melikhova<sup>2</sup>, E.A. Nokol<sup>2</sup>, E.Yu. Drozhzhina<sup>2</sup>, L.D. Rumsh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>2</sup>Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology» of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow

### Abstract

The immunogenic and protective activities of recombinant IgA1 serine protease obtained on the base of the genome DNA of *N. meningitidis* serogroup B strain H44/76 were studied. A several recombinant proteins of different molecular weights that are based on the full-length primary structure of the enzyme, taking into account the distribution of B- and T-epitopes, also were studied. In experiments on laboratory animals it was shown that a number of tested preparations demonstrate the immunogenic and protective activity to protect mice from lethal challenge with virulent strains of meningococcus serogroups A, B and C, thereby exhibiting polyvaccine properties. The protective role of antibodies against the IgA1 protease was shown when mice were infected by meningococcus serogroup B. The increase in antibodies to the meningococcal IgA1 protease into the blood of rabbits infected with different serotypes of pneumococci has been detected, indicating potential ability of the meningococcal IgA1 protease to generate protection against microbes the virulence of which is caused by IgA1protease.

**Key words:** meningococcal polyvaccine, IgA1 protease, recombinant proteins, immunogenicity, protectivity

### Введение

Трудно переоценить успехи в борьбе с менингококковой инфекцией, обусловленные появлением полисахаридных вакцин.

После опубликования в 1969 году статьи Э. Готшлиха об иммуногенных свойствах очищенных капсульных менингококковых полисахаридов серогрупп А и С, прошел целый ряд успешных эпидемических испытаний полисахаридных вакцин в Африке, Финляндии, Бразилии, да и в нашей стране [1, 2]. Наступила эпоха сначала менингококковых,

а затем и пневмококковых полисахаридных вакцин [3, 4], однако они оказались эффективными только для взрослого населения и не вызывали иммунного ответа у детей до одного года. Толерантность детей раннего возраста к полисахаридным вакцинам удалось преодолеть только после конъюгации этих полисахаридов с различными белковыми носителями – от традиционных дифтерийного и столбнячного анатоксинов, до не токсичного рекомбинантного экзотоксина *P. aeruginosa*, конъюгированного с брюшнотифозным Vi-антигеном.

Нерешенным продолжал оставаться вопрос о вакцинопрофилактике менингококкового менингита серогруппы В. Создавались и испытывались различные вакцины и в нашей стране, и за рубежом [5]. Пожалуй наиболее удачным был цикл работ по конъюгации синтетических пептидов консервативных участков белков PorA, OpaB и NspA наружной мембраны различных штаммов менингококков серогруппы В с капсульными полисахаридами серогрупп А и С [6]. Полученные препараты обладали высокой иммуногенностью и протективной активностью при заражении мышей вирулентными штаммами менингококков серогрупп А, В и С.

В самое последнее время была создана поликомпонентная моновакцина серогруппы В на основе белков этого микроба [7]. Таким образом, к настоящему моменту в практике здравоохранения имеется набор вакцин против всех серогрупп менингококка.

В связи с публикацией целого ряда статей о возможных вакцинных потенциях IgA1-протеазы (IgA1pr) – одного из ферментов патогенных бактерий, возбудителей микробных менингитов [8, 9] – естественным стало изучение иммуногенных и протективных свойств этого фермента в качестве кандидата вакцины.

Исследователи сходились на том, что IgA1pr является важнейшим фактором вирулентности микробов, его роль сводится к расщеплению секреторных иммуноглобулинов А1 (s-IgA1), в значительных количествах присутствующих на слизистых оболочках и обеспечивающих первую линию защиты от бактериальных патогенов. Деградация s-IgA способствует адгезии бактерий на эпителии, колонизации ими тканей и дальнейшему развитию инфекционного процесса [10, 11].

В ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова была проведена работа по выделению и изучению IgA1pr из производственного штамма A208 *N. meningitidis* серогруппы А [12].

Препарат обладал специфической ферментативной активностью в отношении иммуноглобулина А1. В опытах на мышах были показаны высокая иммуногенная и протективная активность IgA1pr в отношении трёх основных серогрупп менингококков – А, В и С, а также характерная для белков способность к формированию иммунологической памяти.

Однако при выделении фермента из культуральной жидкости и из промежуточных продуктов производства менингококковой вакцины серогруппы А выход активного вещества фермента был невысоок, что затрудняло его дальнейшее изучение в качестве кандидата вакцинного препарата.

Для решения этой проблемы на основе нуклеотидной последовательности, кодирующей IgA1pr *N. meningitidis* серогруппы В штамма MC58, была создана ферментативно активная рекомбинантная протеаза, включающая нуклеотидную последовательность IgA1pr штамма H44/46 *N. meningitidis* се-

рогруппы В [13, 14], а затем и мутантный вариант этого белка, в котором остаток серина-267 в активном центре фермента был заменен на остаток аланина, что лишало его ферментативной активности. В эксперименте на животных при заражении живой вирулентной культурой менингококков серогрупп А, В и С была показана высокая иммуногенная и протективная активность этих препаратов [15, 16].

Для менингококкового менингита характерно нарастание в сыворотках больных в процессе болезни антител к капсульным полисахаридам, что используется для серологической диагностики этого заболевания. Представлялось, естественно, интересным выявить в сыворотках таких больных антитела и к секретируемой IgA1-протеазе. Подтверждением участия антител к IgA1pr в формировании защиты от менингококковой инфекции является их нарастание в процессе заболевания в сыворотках людей с диагнозом «бактериальный менингит» (табл. 1). Данный факт может быть использован в дальнейшем и для ретроспективной диагностики болезни, вызванной возбудителем, секретирующим IgA1pr. В сыворотках больных, средний титр антител к IgA1 составлял 1:1546 и статистически значимо отличался от уровня антител в сыворотках здоровых доноров (добровольцев) – 1:540 [17].

Представленные результаты позволяют рассматривать препарат IgA1pr как кандидат поливакцины для профилактики менингококковых инфекций. **Цель данной работы** – поиск консервативных участков IgA1pr для создания препаратов, способных обеспечить профилактику инфекций, вирулентность которых обусловлена этим ферментом

#### Материалы и методы

*Препараты, использованные в работе:*

- IgA1-протеаза *N. meningitidis* серогруппы В с молекулярной массой ~ 106 kDa [13];
- рекомбинантные белки с различной молекулярной массой от 78 до 23 kDa, представляющие собой фрагменты IgA1-протеазы *N. meningitidis* серогруппы В;
- сыворотки мышей линии BALB/с, иммунизированных IgA1-протеазой менингококка серогруппы В штамм ВН44/76 двукратно с интервалом 45 дней внутривенно в дозе 40 мкг. Сыворотки получали на 12-й день после повторной иммунизации;
- сыворотки кроликов линии шиншилла после заражения сублетальной дозой *S. pneumoniae* различных серотипов (3, 14, 6А, 19А, 19F, 23F, 18С, 9N, 6В, 9V, 15В).

Содержимое ампулы с лиофилизированной культурой разводили физиологическим раствором NaCl и подрачивали в чашках Петри с твердой питательной средой (кровяной агар, содержащий 5% дефибрированной крови крупного рогатого

Таблица 1.

Уровень антител к IgA1pr в сыворотках здоровых людей и больных менингококковым менингитом

Группа людей	Средний титр	Число сывороток (%) с титром >320	T*
Здоровые, n = 20	1:540 ± 282	55	3,33
Больные, n = 16	1:1546 ± 352	88	8,77

Примечание: \* T – коэффициент достоверности Стьюдента при  $p \leq 0,05$ .

скота) при температуре 37 °C в атмосфере CO<sub>2</sub> в течение 20 часов. После инкубации взвесь микробов пересевали (1 – 2 капли) в свежую чашку Петри и инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере CO<sub>2</sub>. Через 18 часов культуру смывали изотоническим раствором NaCl, инактивировали при температуре 52 °C, готовили концентрацию 10<sup>9</sup> м.к./мл, что соответствует оптической плотности 1,0 при длине волны 530 нм; разводили до необходимой концентрации и вводили кроликам подкожно четырёхкратно с интервалом 7 дней. Кровь забирали из ушной вены на 45-й день после последней иммунизации.

Определение уровня специфических антител в сыворотках иммунизированных животных проводили методом твердофазного ИФА при сорбции на планшет соответствующих антигенов или методом цельноклеточного ИФА (ц. кл. ИФА) при сорбции взвеси микробных клеток менингококка серогруппы В [18, 19].

Протективную активность IgA1pr изучали в опытах на мышах линии BALB/c. Мышей заражали живой вирулентной культурой менингококков серогруппы А (штамм А208), В (штамм Н44/76) или С (штамм О638) в дозе 0,25 x 10<sup>6</sup> м.к. Эффект защиты оценивали

по числу колониеобразующих клеток (КОЕ) или по числу выживших животных относительно контроля на 5-й день после заражения [16].

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы «Probit Analysis». Анализ распределения потенциальных В- и Т-клеточных эпитопов в структуре молекулы IgA1pr проводили, используя традиционные методы предсказания антигенной структуры белка и с помощью сервиса <http://www.iedb.org> [20] Молекулярные массы белков рассчитывали, используя сервер <http://web.expasy.org/protparam>.

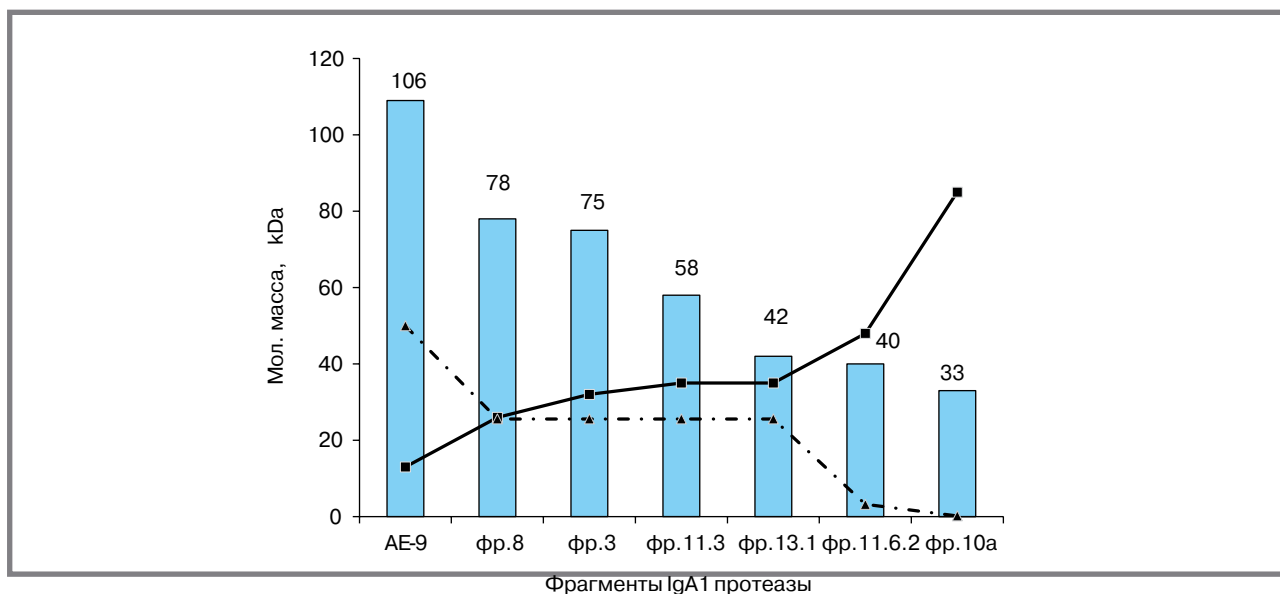
Гомологию аминокислотных последовательностей IgA1pr из различных источников исследовали посредством программы Clustal W. [21].

## Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были сконструированы и получены новые рекомбинантные белки, представляющие собой фрагменты полноразмерной IgA1pr *N. meningitidis* серогруппы В штамм Н44/76 с различной первичной структурой; изучено влияние структурных изменений на иммуногенные и протективные свойства препаратов в отношении менингококковой инфекции.

Рисунок 1.

Зависимость иммуногенности и протективности препаратов от их молекулярной массы



Примечание: По оси абсцисс – фрагменты IgA1pr; по оси ординат – мол. масса (kDa) препаратов.

Сплошная линия – число КОЕ в крови мышей при заражении менингококком серогруппы В;

пунктирная линия – уровень антител в крови иммунизированных животных; столбики – мол. масса препаратов.

Таблица 2.

Характеристика низкомолекулярного белка III – фрагмента IgA1pr

Антиген при иммунизации	Число КОЕ, %	Число выживших мышей, %	1/титр антител,		Мол. масса
			к IgA1pr	к микробной клетке**	
IgA1pr	28	86	3120 ± 1512	158 ± 47	106
Белок III	21	58	2280 ± 215	147 ± 49	23
Контроль*	100	14	–	–	–

Примечание: \*контроль – не иммунизированные животные; \*\*менингококк серогруппы В штамм H44/76.

Полученные конструкции с различной молекулярной массой содержали в своей структуре участки IgA1pr с наибольшей плотностью В-эпитопов и связывающиеся с наибольшим количеством HLA-DR аллелей Т-эпитопы. В экспериментах на животных определяли иммуногенную и протективную активность этих препаратов (рис. 1).

В интервале молекулярных масс от 106 до ~50 kDa и определенной насыщенности В- и Т-эпитопов фрагменты IgA1pr обладали высокой иммуногенной и протективной активностью, но с уменьшением молекулярной массы их иммуногенная и протективная активность снижались (уровень антител в крови иммунизированных мышей уменьшался, а число КОЕ у инфицированных животных возрастало).

Создание конструкций белка с различным сочетанием В- и Т- эпитопов позволили получить препарат (белок III) с низкой молекулярной массой (23 kDa) [22], обладающий высокой иммуногенной и протективной активностью.

При иммунизации мышей полноразмерной IgA1pr или белком III было показано, что оба препарата значительно не отличались между собой по своим протективным свойствам и способности стимулировать образование специфических антител в сыворотках иммунизированных мышей (табл. 2).

Уровень антител к IgA1pr и способность к адгезии на поверхности микробной клетки, определяемые методом ц.кл. ИФА, зависели не столько от молекулярной массы используемого белка III, сколько от наличия в его структуре необходимых для индукции иммуногенных свойств участков В- и Т-эпитопов. Короткий вариант IgA1pr с молекулярной массой 23 kDa не уступал по активности препарату полноразмерной IgA1pr с молекулярной массой более 106 kDa.

Присутствие в сыворотках иммунизированных мышей антител, выявляемых ц.кл. ИФА при сорбции на планшет взвеси микробных клеток менингококка серогруппы В, свидетельствует о наличии IgA1pr на поверхности микробов. Выявляемые при этом антитела принимают непосредственное участие в блокировании микробов. При заражении мышей менингококком серогруппы В уровень бактериемии снижался в 4 – 5 раз, а число выживших мышей резко возрастало (табл. 2).

При пассивной защите мышей от заражения вирулентным штаммом менингококка серогруппы В [18] было установлено участие и гуморального звена иммунитета (табл. 3).

Анализ аминокислотных последовательностей сериновых IgA1-протеаз у различных представителей патогенных микробов показал высокую степень гомологии этих ферментов [23]. Наши расчеты показали, что степень гомологии первичных последовательностей IgA1-протеаз зависит от источника фермента. Сравнение аминокислотных последовательностей IgA1pr из *N. meningitidis* серогрупп А, В, С, 29Е и ферментов из *N. gonorrhoeae* и *H. influenzae* в интервале остатков 28 – 1004 показывает, что число идентичных и взаимозаменяемых остатков может достигать 70%. Если сравнивать IgA1-протеазы только *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* гомология между ними составляет уже около 90%, а внутри менингококков – более 95%.

Известно, что IgA1pr пневмококков, так же как и IgA1pr менингококков, является фактором патогенности, но относится к классу металлопротеиназ. Была показана гомология отдельных участков в первичной структуре IgA1-протеаз некоторых штаммов *S. pneumoniae* и IgA1-протеазы *N. meningitidis* и способность этих ферментов расщеплять пептидные связи пролил-серин или пролил-треонин

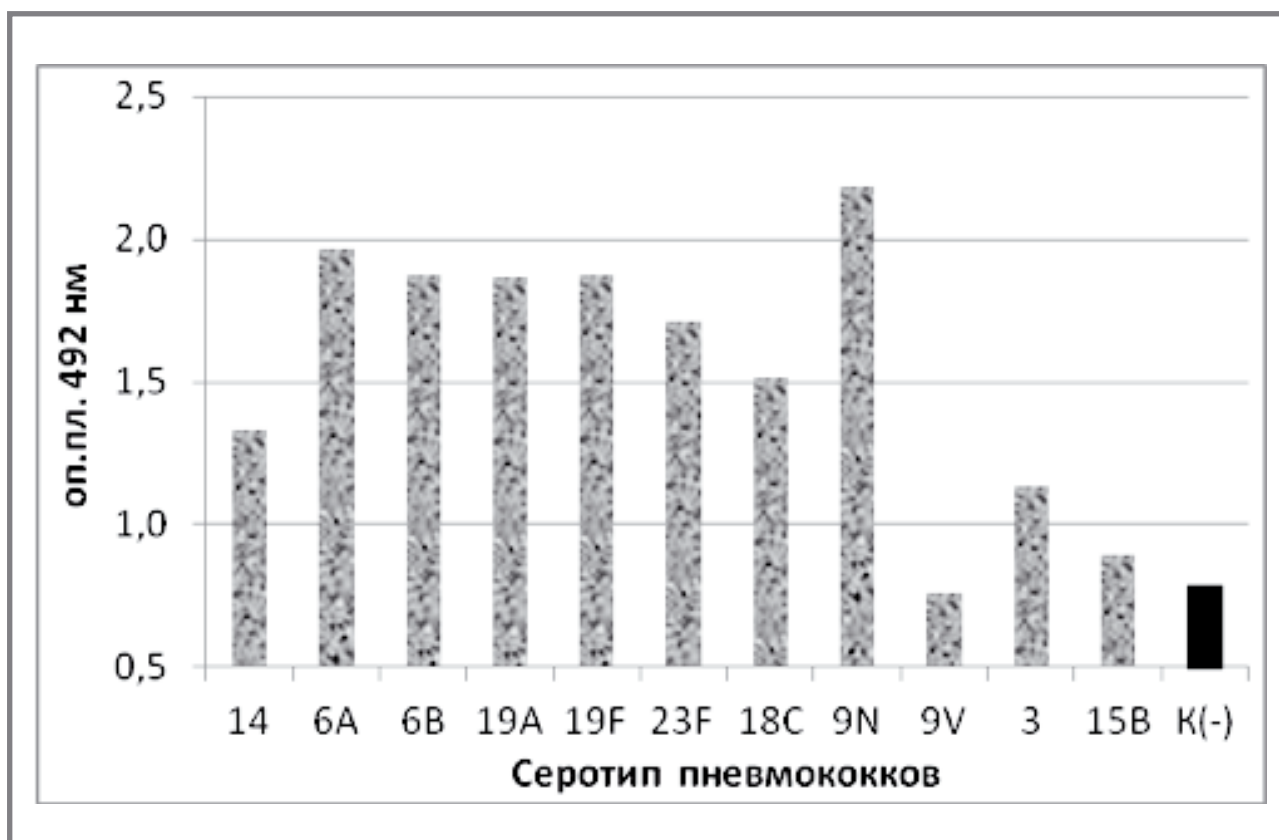
Таблица 3.

Протективные свойства антител к белку III при заражении мышей менингококком серогруппы В

Группа	Число КОЕ, %	Т*
Интakтные мыши	100 ± 12	–
Реципиенты иммунной сыворотки	36 ± 8	3,28
Реципиенты интактной сыворотки	63 ± 6	2,76

Примечание: \*коэффициент достоверности Стьюдента при  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 2.

Наличие антител к IgA1-протеазе *N. meningitidis* серогруппы В в сыворотках кроликов, инфицированных *S. pneumoniae*

в шарнирной области иммуноглобулина A1 [24]. Можно было предположить наличие перекрёстных иммунных реакций для этих инфекций.

Было проведено исследование по определению антител к IgA1-протеазе в сыворотках кроликов, инфицированных различными серотипами пневмококка.

Результаты анализа показали, что в сыворотках кроликов, инфицированных лишь двумя серотипами пневмококков (9V, 15B) антитела к IgA1pr *N. meningitidis* отсутствовали. При инфицировании пневмококками серотипов 3 и 18C титры антител были невысокими и составляли соответственно 1:200 и 1:400. Однако в сыворотках животных, иммунизированных остальными серотипами пневмококков (7 из 12), титр антител составлял от 1:800 до 1:6400. Контролем служила сыворотка интактных (не иммунизированных) кроликов (рис. 2).

Таким образом, в сыворотках кроликов, инфицированных различными серотипами пневмококков, обнаружены антитела к IgA1-протеазе *N. meningitidis* серогруппы В (к 9-ти серотипам из 12-ти исследованных), что свидетельствует о способности микробов этих серотипов секретировать IgA1-протеазу, близкую по иммуногенным свойствам ранее изученному нами ферменту менингококков, что указывает на потенциальную вакцинную поливалентность этого препарата.

### Выводы

1. На примере пневмококковой инфекции с большой долей вероятности можно утверждать, что препараты на основе IgA1-протеазы *N. meningitidis* будут эффективно защищать не только от менингококков, но и от других бактерий, патогенность которых обусловлена этим ферментом.
2. Результаты, полученные при изучении набора серотипов *S. pneumoniae*, представляют существенный интерес для изучения протективной активности IgA1-протеазы менингококка в отношении чужеродной инфекции.

На основе проведенных исследований можно предположить, что изучение IgA1-протеазы позволит найти новые подходы к созданию поливакцины для профилактики заболеваний, которые вызываются патогенами, секретирующими этот фермент.

Авторы приносят благодарность проф. И.С. Королевой за любезно предоставленные сыворотки больных и проф. Н.Е. Ястребовой за предоставленные сыворотки кроликов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 14-50-00131).



## Литература

1. Мочадо П.А. В кн.: Вакцинопрофилактика менингита и бешенства. Материалы советско-французского симпозиума. Москва.1978: 52.
2. Чернышева Т.Ф., Фаворова Л.А., Крылов Е.П. и др. Эпидемиологическая эффективность менингококковой лиофилизированной группы А вакцины МНИИЭМ. В сборнике: Острые менингиты; НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. 1982: 37 – 42.
3. Frasch C.E. Meningococcal vaccines: Past, present and future, in Meningococcal Disease. Ed.: K Cartwright. Chichester, John Wiley. 1995; 7: 245 – 283.
4. Sierra, G. V. G., H. C. Campa, N. M. Varcacel, I. L. Garcia, P. L. Izquierdo, P. F. Sotolongo et. al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. Nat. Inst. Public Health Ann. 14:195 – 207. NIPH Ann. 1991; 14: 195 – 210.
5. Платонов А.Е. Харит С.М., Платонова О.В. Вакцинопрофилактика менингококковой инфекции в мире и в России. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2009; 5 (48): 32 – 46.
6. Несмеянов В.А., О.В. Котельникова, О.М. Вольпина, К.М. Феоктистов, О.В. Чибискова, М.Н. Жмак и др. Способ приготовления бивалентной вакцины против менингококковой инфекции серогрупп В/А или В/С на основе синтетических пептидов и капсульных полисахаридов без использования адьюванта. RU N2250113, 20.04.2003.
7. Gossger N., Snape M.D., Yu L.M., Finn A., Bona G. et al. 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. 2012; (307): 573 – 582.
8. Kilian M., Thomsen B., Petersen T.H.E., Bleeg H. Molecular biology of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. Mol. Immunol. 1983; 20: 1051 – 1058.
9. Mulks M.H., Kornfeld S.J., Plaut A.G. Specific proteolysis of human IgA by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Journal of Infectious Diseases. 1980; 141: 450 – 456.
10. Казеева Т.Н., Шевелев А.Б., Леонович О.А., Фаизов Т.Х., Белякова А.В., Лебедева А.А. и др. Структурные и функциональные особенности IgA1 протеаз. Современные проблемы науки и образования. 2012; 1.
11. Bachovchin W.W., Plaut A.G., Flentke G.R., Lynch M., Kettner C.A. Inhibition of IgA1 proteinases from *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* by peptide prolyl boronic acids. J. Biol. Chem. 1990; 265 (7): 3738 – 3743.
12. Аллилуев А.П., Ягудаева Е.Ю., Жигис Л. С., Козлов Л.В., Котельникова О.В., Зуева В.С. и др. Способ получения IgA1 протеазы из культуры *Neisseria meningitidis* серогруппы А и иммуногенный препарат на её основе. RU C1 № 2407792. 2010.
13. Румш Л.Д., Мельников Э.Э., Аллилуев А.П., Козлов Л.В., Котельникова О.В., Жигис Л.С. и др. Нуклеиновая кислота, кодирующая функционально активную рекомбинантную IgA1 протеазу *Neisseria meningitidis* серогруппы В, рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую активную IgA1 протеазу, штамм-продуцент, содержащий плазмидную ДНК, продуцирующий зрелую форму IgA1 протеазы, рекомбинантная Ig протеаза *Neisseria meningitidis* серогруппы В, способ получения зрелой формы IgA1 протеазы, обладающей иммуногенными и протективными свойствами. RU №2453599. 2012.
14. Серова О.В., Мельников Э.Э., Зинченко А.А., Котельникова О.В., Аллилуев А.П., Бичучер А.М. и др. Рекомбинантная IgA1 протеаза *N. meningitidis*. Получение, свойства. Биофармацевтический журнал. 2011; 3 (6): 42 – 47.
15. Румш Л.Д., Серова О.В., Зинченко А.А., Аллилуев А.П., Козлов Л.В., Котельникова О.В. и др. Полинуклеотид, кодирующий мутантную рекомбинантную IgA1 протеазу *Neisseria meningitidis* серогруппы В, рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая указанный полинуклеотид, клетка-хозяин, содержащая указанную плазмидную ДНК, рекомбинантная IgA1 протеаза *Neisseria meningitidis* серогруппы В, способ получения зрелой формы IgA1 протеазы. RU № 2486243. 2013.
16. Kotelnikova O.V., Alliluev A.P., Drozhzhina E.Yu., Koroleva I.S., Sitnikova E.A., Zinchenko A.A. et. al. Protective properties of recombinant IgA1 protease from meningococcus. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013; 7 (4): 305 – 310.
17. Котельникова О.В., Зинченко А.А., Гордеева Е.А., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Жигис Л.С. и др. Перспективное использование секретируемых микробных протеаз для профилактики менингококковых менингитов. Сборник: Клиническая медицина. Сборник материалов между. научн. конф., 3 сессия. О.И. Филимонова, ред. 2015: 17 – 26.
18. Kotelnikova O.V., Zinchenko A.A., Vikhrov A.A., Alliluev A.P., Serova O.V., Gordeeva E.A. et al. Serological analysis of immunogenic properties of recombinant meningococcus IgA1 protease-based proteins. Bull. Exp. Biol. Med. 2016; 161 (3): 391 – 394.
19. Кузнецова С.А., Косицкая Л.С., Соколов Д.И., Фрейдлин И.С., Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю. Использование иммуноферментного анализа для оценки экспрессии адгезионных молекул на эндотелиальных клетках. Медицинская иммунология. 1999; 1 (5): 71 – 74.
20. Emimi E.A., Hughes J.V., Perlow D.S., Boger J., Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J. Virol. 1985; 55 (3): 836 – 839. Доступно на: <http://tools.iedb.org/bcell>.
21. Combet C., Blanchet C., Geourjon C., Del age G. NPS: network protein sequence analysis. Trends Biochem. Sci. 2000; 25: 147 – 150.
22. Zinchenko A.A., Alliluev A.P., Serova O.P., Gordeeva E.A., Zhigis L.S., Zueva V.S. et al. Immunogenic and protective properties of recombinant proteins based on meningococcal IgA1 protease. J. Meningitis. 2015. 1:102, doi: 10.4172/jomg.1000102.
23. Lomholt H., Poulsen K., Kilian M. Comparative characterization of the iga gene encoding IgA1 protease in *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*. Mol. Microbiol. 1995; 15 (3): 495 – 506.
24. Romanello V., Marcacci M., Dal Molin F., Moschioni M., Censini S., Covacci A. et al. Cloning, expression, purification, and characterization of *Streptococcus pneumoniae* IgA1 protease. Protein Expr. Purif. 2006; 45 (1): 142 – 149.

## References

1. Mochado P.A. In: Vaccine meningitis and rabies. Materials of Soviet-French Symposium. Moscow.1978: 52.
2. Chernysheva T.F., Favorova L.A., Krylov E.P. et al. Epidemiological effectiveness of meningococcal group A lyophilized vaccine MNIEM. In: Acute meningitis. Epidemiology and Microbiology Research Institute them. N.F. Gamaley. 1982: 37 – 42.
3. Frasch C.E. Meningococcal vaccines: Past, present and future, in Meningococcal Disease. Ed.: K Cartwright. Chichester, John Wiley. 1995; 7: 245 – 283.
4. Sierra, G. V. G., Campa H.C., N. M. Varcacel, I. L. Garcia, P. F. Sotolongo et. al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. Nat. Inst. Public Health Ann. 14:195 – 207. NIPH Ann. 1991; 14: 195 – 210.
5. Platonov A.E., Harith S.M., Platonova O.V. Vaccination meningococcal disease in the world and in Russia. Epidemiologia i Vakcinoprofilaktika. [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2009; 5 (48): 32 – 46.
6. Nesmeyanov V.A., Kotelnikova O.V., Vol'pina O.M., Feoktistov K.M., Chibiskova O.V., Zhmak M.N. et al. Method of preparation of a bivalent vaccine against meningococcal infection of serogroup B/A or B/C on the basis of synthetic peptides, and without using capsular polysaccharide adjuvant. RU N2250113, 20.04.2003.
7. Gossger N., Snape M.D., Yu L.M., Finn A., Bona G. et al. 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. 2012; (307): 573 – 582.
8. Kilian M., Thomsen B., Petersen T.H.E., Bleeg H. Molecular biology of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. Mol. Immunol. 1983; 20: 1051 – 1058.
9. Mulks M.H., Kornfeld S.J., Plaut A.G. Specific proteolysis of human IgA by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Journal of Infectious Diseases. 1980; 141: 450 – 456.
10. Kazeeva T.N., Shevelev A.B., Leonovich O.A., Faizov T.H., Belyakov A.V., Lebedev A.A. et al. Structural features of functional IgA1 proteases. Sovremennye problemi nauki i obrazovaniya. [Modern problems of science and education]. 2012; 1.
11. Bachovchin W.W., Plaut A.G., Flentke G.R., Lynch M., Kettner C.A. Inhibition of IgA1 proteinases from *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* by peptide prolyl boronic acids. J. Biol. Chem. 1990; 265 (7): 3738 – 3743.
12. Alliluev A.P., Yagudaeva E.Y., Zhigis L.S., Kozlov L.V., Kotelnikova O.V., Zueva V.S. et al. A method for producing IgA1 protease from a culture of *Neisseria meningitidis* serogroup A and immunogenic drug based on it. RU C1 № 2407792. 2010.
13. Rumsh L.D., Melnikov E.E., Alliluev A.P., Kozlov L.V., Kotelnikova O.V., Zhigis L.S. et al. Nucleic acid encoding a functionally active recombinant IgA1 protease, *Neisseria meningitidis* serogroup B, a recombinant plasmid DNA comprising a nucleotide sequence encoding active IgA1 protease-producing strain, containing plasmid DNA, producing the mature form IgA1 protease, recombinant Ig protease of *Neisseria meningitidis* serogroup B, the method for producing mature IgA1 protease shape having immunogenic and protective properties. RU №2453599. 2012.
14. Serova O.V., Melnikov E.E., Zinchenko A.A., Kotelnikova O.V., Alliluev A.P., Bichucher A.M. et al. Recombinant IgA1 protease *N. meningitidis*. Getting properties. Biofarmaceutichesky Zhurnal. [Biopharmaceutical Journal]. 2011; 3 (6): 42 – 47.
15. Rumsh L.D., Serova O.V., Zinchenko A.A., Alliluev A.P., Kozlov L.V., O.V. Kotelnikova et al. A polynucleotide encoding IgA1 protease mutant recombinant *Neisseria meningitidis* serogroup B, a recombinant plasmid DNA comprising the polynucleotide, host cells containing said plasmid DNA, recombinant *Neisseria meningitidis* IgA1 protease serogroup B, a method of producing mature IgA1 protease form. RU № 2486243. 2013.
16. Kotelnikova O.V., Alliluev A.P., Drozhzhina E.Yu., Koroleva I.S., Sitnikova E.A., Zinchenko A.A. et al. Protective properties of recombinant IgA1 protease from meningococcus. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013; 7 (4): 305 – 310.

17. Kotelnikova O.V., Zinchenko A.A., Gordeeva E.A., Melikhova T.D., Nokel E.A., Zhigis L.S. et al. Prospective use of microbial proteases secreted for the prevention of meningococcal meningitis. Collection: Clinical Medicine. Collected between materials. Scien. Conf., 3 session. Ed.: Filimonova O.I. 2015: 17 – 26.
18. Kotelnikova O.V., Zinchenko A.A., Vikhrov A.A., Alliluev A.P., Serova O.V., Gordeeva E.A. et al. Serological analysis of immunogenic properties of recombinant meningococcus IgA1 protease-based proteins. Bull. Exp. Biol. Med. 2016; 161 (3): 391 – 394.
19. Kuznetsova S.A., Kositskaya L.S., Sokolov D.I., Freidlin I.S., Polosuhina E.R., Baryshnikov A.Yu. Using the enzyme immunoassay for assessing expression of adhesion molecules on endothelial cells. Medicinskaya immunologia. [Medical Immunology]. 1999; 1 (5): 71 – 74.
20. Emini E.A., Hughes J.V., Perlow D.S., Boger J., Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J. Virol. 1985; 55 (3): 836 – 839. Available at: <http://tools.iedb.org/bcell>.
21. Combet C., Blanchet C., Geourjon C., Del age G. NPS: network protein sequence analysis. Trends Biochem. Sci. 2000; 25: 147 – 150.
22. Zinchenko A.A., Alliluev A.P., Serova O.P., Gordeeva E.A., Zhigis L.S., Zueva V.S. et al. Immunogenic and protective properties of recombinant proteins based on meningococcal IgA1 protease. J. Meningitis. 2015. 1:102, doi: 10.4172/jomg.1000102.
23. Lomholt H., Poulsen K., Kilian M. Comparative characterization of the iga gene encoding IgA1 protease in *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*. Mol. Microbiol. 1995; 15 (3): 495 – 506.
24. Romanello V., Marcacci M., Dal Molin F., Moschioni M., Censini S., Covacci A. et al. Cloning, expression, purification, and characterization of *Streptococcus pneumoniae* IgA1 protease. Protein Expr. Purif. 2006; 45 (1): 142 – 149.

## ИНФОРМАЦИЯ ВОЗ

### Впервые в Европе число случаев ВИЧ-инфекции превысило 2 миллиона

В числе 2 млн случаев ВИЧ-инфекции, более чем 153 тыс. новых, зарегистрированы в 2015 году. Это на 7% больше по сравнению с предыдущим годом и самый высокий годовой прирост, начиная с 1980- го, когда инфекция стала регистрироваться. Таковы основные тезисы нового доклада «ВИЧ/СПИД – эпиднадзор в Европе, 2015», подготовленного Европейским региональным бюро ВОЗ совместно с Европейским Центром по профилактике и контролю заболеваний (ECDC) в преддверии Всемирного дня борьбы со СПИДом 2016 года.

«Несмотря на значительные усилия, ВИЧ-инфекция остается одной из основных проблем здравоохранения в Европейском регионе ВОЗ, в частности в его Восточной части. В 2015 году зафиксировано наибольшее количество новых случаев, выразившиеся в ужасающем числе 2 млн ВИЧ-инфицированных. – сообщила д-р Жужанна Якаб (Dr Zsuzsanna Jakab), директор Европейского регионального бюро ВОЗ – Для решения этой критической ситуации нами составлен новый план действий, который одобрен всеми европейскими странами в сентябре 2016 года. Мы призываем лидеров стран реализовать этот план, срочно приняв действенные меры с целью скорейшего поворота вспять эпидемии ВИЧ-инфекции к 2030 году».

«Мы знаем, что развитие эпидемии ВИЧ-инфекции зависит от ежегодного прироста числа новых случаев, учет которых является краеугольным камнем Европейского эпиднадзора за этой инфекцией. – поясняет и. о. директора ECDC Андреа Аммон (Andrea Ammon) – Но мы также знаем, что эти цифры не отражают истинную картину. По оценкам ECDC, в настоящее время более 122 тыс. человек в Европейском Союзе/Европейской экономической зоне (ЕС/ЕЭЗ) инфицированы ВИЧ, но не знают об этом, то есть 1 из 7 ВИЧ-инфицированных, живущих в странах ЕС/ЕЭЗ. Для выявления 15% лиц не знающих о своем ВИЧ-инфицированном статусе, необходимо активизировать усилия для поощрения и облегчения прохождения тестирования на ВИЧ

с целью постановки диагноза и проведения соответствующего лечения».

Закономерности и тенденции развития эпидемии ВИЧ-инфекции существенно различаются в зависимости от региона

В 2015 году выявлено 153 407 новых случаев ВИЧ-инфекции в 50 странах Европейского со следующим географическим распределением:

В странах Западной Европы – 27 022 новых случаев ВИЧ-инфекции (18%). Это значительный спад за последнее десятилетие.

В странах Центральной Европы – 5297 новых случаев ВИЧ-инфекции (3%). Хотя интенсивность эпидемии остается низкой, но это существенное увеличение по сравнению с тем, что было 10 лет назад.

В странах Восточной Европы – 121 088 новых случаев ВИЧ-инфекции (79%). Прирост на 80% за 10 лет.

Основные пути передачи ВИЧ также разнообразны: в Западной и Центральной части региона – гомосексуальный; в восточной части – гетеросексуальный. В странах Восточной Европы треть новых случаев, по-прежнему, обусловлены инъекционным употреблением наркотиков.

Мероприятия по борьбе с ВИЧ-инфекцией должны быть адаптированы к местной эпидемиологической ситуации

Новый план действий по борьбе с ВИЧ-инфекцией, основываясь на предыдущих достижениях, определяет конкретные действия для реализации странами 3 амбициозных целей: 90 – 90 – 90 к 2020 году: 90% людей, живущих с ВИЧ, знают свой ВИЧ-статус, 90% выявленных людей, живущих с ВИЧ, получают лечение и у 90% людей из них достигается вирусная супрессия. Для достижения этих целей, каждая страна должна определить и внедрить комплекс основных мероприятий по профилактике, диагностике, лечению в зависимости от ее эпидемической ситуации, имеющихся ресурсов и возможностей.

Источник: <http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2016/11/hiv-cases-reach-over-2-million-for-the-first-time-in-europe>