

Различные технологии получения пневмококковых иммуногенов: определение новых подходов к их разработке

И. М. Грубер*, О. М. Кукина, Н. Б. Егорова, О. В. Жигунова

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова

Резюме

Актуальность. Применение во всем мире пневмококковых вакцин, в частности конъюгированных (PCV), привело к значительному снижению частоты инвазивных пневмококковых заболеваний у вакцинированных детей и у непривитых людей всех возрастов как при носительстве, так и при увеличении резистентности пневмококка к антибиотикам. Однако «невакцинные» серотипы и бескапсульные (нетипируемые) штаммы стали основными причинами пневмококковых заболеваний. Это требует новых подходов при разработке вакцин, способных привести к серотипнезависимой защите, особенно детей, пожилых и иммунокомпрометированных людей. Пневмококковая вакцина должна защищать от широкого спектра серотипов, индуцировать мукозальный и системный иммунитет, снижать первичную назальную колонизацию и инвазивные формы. **Цель.** Обзор посвящен анализу экспериментальных разработок инновационных вакцин на основе протективных белковых антигенов (PPV) с капсульными полисахаридами, адъювантами, системой доставки антигена, а также инактивированных цельноклеточных (WCV) и живых аттенуированных. Особое внимание уделено методам мукозальной иммунизации, учитывая тропизм пневмококка к слизистым верхних и нижних дыхательных путей. **Заключение.** На данном этапе наиболее перспективными представляются препараты на основе бактериальных лизатов (PWCV) и протективных белковых антигенов (PspA, dPly), а также этих антигенов в сочетании с адъювантами и, возможно, с некоторыми этиологически наиболее значимыми капсульными полисахаридами.

Ключевые слова: пневмококковые конъюгированные вакцины, серотипнезависимая защита, протективные белковые антигены, адъюванты, бактериальные лизаты, мукозальная иммунизация

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Грубер И. М., Кукина О. М., Егорова Н. Б. и др. Различные технологии получения пневмококковых иммуногенов: определение новых подходов к их разработке. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2021;20(1): 76–91. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-1-76-91>.

Different Technologies for Obtaining Pneumococcal Immunogens

IM Gruber**, OM Kukina, NB Egorova, OV Zhigunova

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Relevance. The worldwide use of pneumococcal vaccines, in particular conjugated vaccines (PCV), has led to a significant reduction in the incidence of invasive pneumococcal diseases in both vaccinated children and unvaccinated people of all ages. However, "non-vaccine" serotypes and capsule-free (non-typed) strains have become the main causes of pneumococcal disease, as with carriage, with an increase in antibiotic resistance. This requires new approaches in the development of vaccines that can lead to serotype-independent protection, especially in children, the elderly and immunocompromised people. The pneumococcal vaccine should protect against a wide range of serotypes, induce mucosal and systemic immunity, and reduce primary nasal colonization, as well as invasive forms. **Aim.** The review is devoted to the analysis of experimental development of innovative vaccines based on protective protein antigens (PPV), including in combination with capsular polysaccharides, using adjuvants or antigen delivery systems, as well as inactivated whole cell preparations (WCV) and live attenuated vaccines. Particular attention is paid to the methods of mucosal immunization, taking into account the tropism of pneumococcus in relation to the mucous membranes of the upper and lower respiratory tract. **Conclusion.** At this stage, the most developed and promising are drugs based on bacterial lysates (PWCV) and protective protein antigens (PspA, dPly), as well as these antigens mixed with adjuvants, and, possibly, with some etiologically most significant capsular polysaccharides.

Keywords: pneumococcal conjugate vaccines, serotype-independent protection, protective protein antigens, adjuvants, bacterial lysates, mucosal immunization

No conflict of interest to declare.

For citation: Gruber IM, Kukina OM, Egorova NB, et al. Different Technologies for Obtaining Pneumococcal Immunogens. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(1): 76–91 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-1-76-91>.

* Для переписки: Грубер Ирина Мироновна, д. м. н., профессор, заведующая лабораторией экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064. Россия, Москва, Малый Казённый переулок, 5А. +7 (495) 916-20-47, igruber_instmech@mail.ru.

©Грубер И. М. и др.

** For correspondence: Gruber Irina M., Dr. Sci (Med), professor, Head of the Laboratory of Experimental Microbiology Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Malyy Kazonnyy pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (495) 916-20-47, igruber_instmech@mail.ru. ©Gruber IM et al.

Известно, что широкое применение во всем мире пневмококковых вакцин, в частности конъюгированных (PCV), привело к значительному снижению частоты инвазивных пневмококковых заболеваний как у вакцинированных детей, так и у непривитых людей всех возрастов. Однако «невакцинные» серотипы, новые серотипы и бескапсульные (нетипируемые) штаммы пневмококка стали основными причинами заболеваний при их носительстве и на фоне роста их резистентности к антибиотикам. Это требует поиска новых подходов к разработке вакцин с широким покрытием всех возможных вариантов пневмококков, фокусирующихся на определении консервативных антигенов, способных обеспечивать серотипнезависимую защиту, особенно детей, пожилых и иммунокомпрометированных людей.

Пневмококковая вакцина должна защищать от широкого спектра серотипов (их известно 98), индуцировать мукозальный и системный иммунитет, снижать первичную назальную колонизацию и инвазивные формы [1–8]. Основные типы инновационных вакцин разрабатываются на основе протективных белковых антигенов (PPV) в комплексе с капсульными полисахаридами с использованием адъювантов или систем доставки антигена. Создаются также инактивированные цельноклеточные препараты (WCV) и живые аттенуированные вакцины, способные охватывать большинство пневмококковых штаммов.

Цель настоящего сообщения – представить обзор опубликованных в основном в последние 5 лет результатов экспериментальных разработок инновационных вакцин, а также, по возможности, рассмотреть судьбу пневмококковых вакцин, которые к 2016–2017 гг. находились на различных стадиях клинических исследований. Поскольку мишенью для *S. pneumoniae* является слизистая дыхательных путей, эффективная пневмококковая вакцина должна обеспечивать не только защиту от инвазивной инфекции, но также от колонизации дыхательной системы. Исследователи считают, что потенциальной стратегией защиты от пневмококковых заболеваний может быть создание вакцин, индуцирующих мукозальный и системный иммунитет. Остановившись прежде всего на результатах исследований в отношении пневмококковых белковых вакцин (PPV), следует отметить, что в большинстве работ внимание уделено основным факторам вирулентности (патогенности), представленным пневмококковыми поверхностными белками (в основном PspA, а также PspC, цитотоксическим белком пневмолизина – Ply, белками гистициновой триады – PhtD), играющими критическую роль в назофарингеальной колонизации, передаче и поражении тканей, а также другими белками (PsaP, PcpA, PrtA).

Использование белковых пневмококковых антигенов

Пневмококковый поверхностный белок A (PspA) – ключевой фактор вирулентности пневмококка

[9] присутствует на клеточной поверхности почти всех пневмококковых штаммов. Он является холин-связывающим белком, который способствует уклонению от иммунитета, ингибируя фиксацию комплемента на поверхности бактериальной клетки, и связывает лактоферрин, блокирует этот бактерицидный пептид, предотвращая его проникновение через бактериальную мембрану [10]. Было показано, что PspA состоит из 5 доменов: 1 – сигнальный пептид, 2 – вариабельный N-концевой α -спиральный высоко заряженный; 3 – богатая пролином антиген-консервативная область (PRR), которая часто прерывается непролиновым блоком (NPB) и 4 – холин-связывающим доменом, прикрепляющим белок к наружной мембране клеточной стенки бактерии; 5 – C-терминальная область – короткий гидрофобный хвост. Установлено, что N-терминальная область PspA поверхностно доступна, имеет спиральную структуру с протективным эпитопом и может быть разделена на 3 области – A, B и C [11]. На основании исследования 24 аллелей генов *pspA* установлена их мозаичность, что определяет серологическую вариабельность PspA [12]; именно более 100 аминокислот C-области известны как «В-окно» или область, определяющая клайд (clade-defining region – CDR). Сходство аминокислотной последовательности в «В-окне» различных пневмококковых штаммов является основой классификации PspA на 3 семейства, распределенных на 6 клайдов [13,14]. Иммунизация здоровых взрослых рекомбинантным фрагментом PspA, содержащим N-концевую область, выявила в I фазе клинических исследований перекрестно-реактивные антитела [15], способные индуцировать пассивную защиту у мышей [16]. Фрагменты PspA, соответствующие полным N-концевым областям PspA, защищали мышей от инвазивной пневмококковой инфекции (ИПИ), вызванной штаммом, экспрессирующим гомологичный PspA [17]. При этом была показана важность C-концевых 104 и N-концевых 115 аминокислот α -спиральной области PspA в перекрестной защите мышей от ИПИ. Вместе с тем существуют опасения относительно способности PspA перекрестно реагировать с человеческим белком миозином, что может приводить к аутоиммунной кардиологической патологии [8].

В масштабном комплексном исследовании, проведенном Kawaguchiya M с соавт. [18] через 6 лет после регистрации в Японии вакцины PCV13, были изучены 678 неинвазивных пневмококковых изолятов, из которых 596 (87,9%) относились к невакцинным серотипам. Наиболее распространены были 15A, 35B, 15C и 23A (14,5; 11,8; 9,3 и 9,0% соответственно), причем 96,6% обладали генами резистентности к макролидам *erm(B)* и *mef(A/E)*. PspA 1, 2 и 3 семейства были определены у 42,3; 56,6 и 0,6% изолятов соответственно, и исследование нуклеотидной последовательности CDR выявило высокую идентичность (90–100%) среди клайдов одного семейства и 57–69% – между 1

и 2 семействами. Использование PspA, относящихся к наиболее распространенным среди изолятов 1 и 2 семействам (соответственно, 1–5 клайдам), наиболее часто рассматривается как кандидат в вакцинный препарат [8]. При изучении перекрестного иммунного ответа на рекомбинантные PspA белки двух семейств было показано, что перекрестной антигенной и протективной активностью обладали фрагменты PspA4 и PspA5, относящиеся ко 2 семейству [19]. Akbari E с соавт. [20] изучили протективный ответ на два рекомбинантных антигена PspA – PspA₄ABC и PspAB₁₋₅, полученных из двух штаммов *E. coli*, сконструированных путем трансформации вектора, содержащего последовательности фрагментов ДНК генов, кодирующих N-терминальную область ABC штамма *S. pneumoniae* EF5668 (4 клайда 2 семейства) и В область 1–5 клайдов 5 разных штаммов соответственно. При изучении иммуногенности антигенов *in vivo* установлено, что после интраназального и внутрибрюшинного (в/бр) заражения иммунизированных мышей штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6355 (серотип 5, 2 клайд PspA) наблюдалось снижение назофарингеальной колонизации и более высокая протективная активность у мышей, иммунизированных PspAB₁₋₅ – антигеном В-области всех 5 клайдов. Кроме того, сыворотка этих мышей в большей степени способствовала прикреплению С3 компонента комплемента и показала в ИФА перекрестную активность антител по отношению к PspA всех 5 клайдов.

MA da Silva с соавт. [21] считают, что при конструировании конъюгированных с капсульными полисахаридами вакцин пневмококковые поверхностные белки могут быть альтернативой гетерологичным белкам (CRM197 или столбнячному токсиду). Они изучили функциональную и перекрестную иммунологическую активность антител, индуцированных при подкожной (п/к) иммунизации мышей BALB/c конъюгатом PS14-mPspA4Pro (mPspA4Pro – модифицированный формальдегидом PspA 4 клайда 2 семейства с N-терминальным участком+ пролиновый блок, конъюгированный с полисахаридом 14 серотипа – PS14), отдельными компонентами и их смесью. При введении конъюгированной вакцины было установлено повышение титра анти-PS14 IgG и снижение титра анти- PspA4, по сравнению с введением смеси этих компонентов. Это свидетельствует о том, что при конъюгации изменяется профиль белкового эпитопа.

Опсонифагоцитарная активность является основным показателем функциональной активности антител *in vitro* и зависит от связывания антител и фиксации комплемента, что ведет к гибели бактерий и клиренсу. Так, несмотря на снижение уровня PspA4-антител, индуцированных конъюгатом, их функциональность была установлена по опсонифагоцитарной активности в отношении 14 пневмококковых штаммов разных серотипов с PspA, относящимся к 1–5 клайдам

двух семейств. Снижение числа КОЕ при использовании сывороток к конъюгату по сравнению со смесью было значительнее или сопоставимо. Мыши, иммунизированные п/к конъюгатом, были защищены от назальной колонизации штамма гетерологичного серотипа- 6В № 0603 с PspA 1 клайда. Таким образом, конъюгация mPspA4Pro с PS14 обеспечивала ожидаемое увеличение IgG по отношению к полисахаридному фрагменту, что указывает на ее эффективность в модификации антигена в Т-клеточно-зависимый. Кроме того, установлено, что анти-PS14-антитела являются функциональными и снижают количество КОЕ в анализе опсонифагоцитарного киллинга. Важно также, что конъюгат PS14-mPspA4Pro сохраняет антигенные свойства молекулы mPspA4Pro, поскольку сыворотка к конъюгату обладает опсонифагоцитарными свойствами, сравнимыми со свойствами свободных белков, к большой группе штаммов, в том числе в отношении защиты от колонизации.

Некоторые белковые пневмококковые факторы вирулентности (PsaA, PspC, PspA, PcpA, Ply, и PhtD) были определены как кандидаты в вакцину [22]. При обследовании младенцев у них была установлена естественная индукция антител к этим антигенам в результате назофарингеальной колонизации и развития инфекции дыхательных путей, а также, вероятно, после многократных вакцинаций, которые проводят во многих странах младенцам с двухмесячного возраста [23].

Ранее было показано, что из ряда изученных белков PhtD (белки гистидиновой триады), PcpA (холинсвязывающий белок) и PlyD1 (нетоксичный дериват пневмолизина) были более иммуногенны, формируя естественную защиту детей, как здоровых, так и страдающих рецидивирующим острым средним отитом (ОСО) [24]. Так, группу детей шестимесячного возраста, у которых отмечали назофарингеальную колонизацию (49 – с рецидивирующим ОСО и 771 – без ОСО), наблюдали до возраста 25 месяцев и установили, что динамика уровня сывороточных IgG к PhtD, PcpA и PlyD1 развивалась синхронно в обеих группах по отношению к 3 приведенным белкам, при этом не было отмечено значительного увеличения IgM к PcpA. Авторы заключили, что эти антигены аналогично иммуногенны и поэтому совместимы для комбинирования в трехвалентной белковой вакцине для борьбы с назофарингеальной колонизацией и профилактикой ОСО.

При комбинации цельных белков с белковыми фрагментами была установлена защита мышей от различных болезней, вызываемых пневмококками. Такой подход объединяет полноразмерные белки с различными белковыми фрагментами для усиления их потенциала в качестве вакцинных антигенов. В моделях активной и пассивной иммунизации пептиды, полученные из холинсвязывающего белка А (CbpA), которые участвуют в адгезии к клеткам легких, слитые с детоксицированным

пневмолизин, индуцирующим образование пор в мембране эукариотических клеток, защищали мышей от пневмококкового носительства, отита, пневмонии, бактериемии, менингита и менингококкового сепсиса [25]. Было показано, что фрагменты PspA, слитые с производными пневмолизина, усиливают иммунный ответ, опосредованный перекрестно-реактивными антителами, и отложение комплемента на гетерологичные штаммы, что обеспечивает защиту от фатального заражения и снижение колонизации носоглотки мышей [26]. Chen A с соавт. [27] показали, что поливалентные пневмококковые белковые вакцины, содержащие пневмолизиниды с эпитопами/фрагментами CbpA и/или PspA, обеспечивают защиту животных на моделях сепсиса, менингита и очаговой пневмонии.

На двух мышиных моделях (BALB/cOlaHsd (H-2^d) и C57BL/6J (H-2^b)) было проведено исследование Т-клеточного ответа на детоксицированный пневмолизин (PlyD1), который считают одним из кандидатов в белковую вакцину для защиты от инфекций, вызванных *S. pneumoniae* [28]. Мышей вакцинировали п/к PlyD1 с алюминиевым адъювантом (Al-AD) или без него и определяли индукцию нейтрализующих анти-Ply IgG (в основном IgG1) у обеих линий мышей, причем при вакцинации без адъюванта значительно более высокий уровень нейтрализующих антител был индуцирован у мышей линии BALB/c. Для скрининга единичных иммунодоминантных пептидов использовали синтетические пептиды, охватывающие полноразмерный Ply, что позволило идентифицировать один иммунодоминантный и три субдоминантных природных эпитопа у обеих линий мышей. Эти эпитопы, идентифицированные у мышей, могут быть использованы для исследований Т-клеток человека, поскольку последовательности PlyD1, отобранные *in vivo* на мышах, имели значительное совпадение с предсказанными гуманизированными эпитопами людей. Цитокиновый ответ показал в основном профиль Th2 с низким уровнем цитокинов Th1 у обеих линий мышей. Таким образом, авторы определили, что PlyD1 является В-клеточным иммуногеном у мышей BALB/c и у мышей C57BL/6 индуктором антител с нейтрализующей способностью, также выявили различные эпитопы Т-клеток, варьировавшие в двух изученных мышиных линиях. Распознавание таких Т-клеточных эпитопов может стимулировать цитокиновый ответ и помогать защитным реакциям В-клеток против пневмококковой инфекции. Если идентифицированные PlyD1-специфичные области Т-клеток будут подтверждены у людей, по мнению авторов [28], они могут быть использованы либо в качестве пневмококк-специфичного белка-носителя в полисахаридной конъюгированной вакцине, либо в качестве компонента белковой вакцины, что требует дальнейшего изучения.

PrtA, поверхностный белок пневмококка, был идентифицирован скринингом библиотеки

экспрессии пневмококкового генома с использованием сыворотки выздоравливающего пациента [29] и идентифицирован как сериновая протеаза. Ген *prtA* распространен и консервативен среди штаммов *S. pneumoniae*. Аминокислотная последовательность PrtA, содержащего каталитические домены, была высоко консервативна среди 78 клинических изолятов пневмококка, представляющих 22 различных серотипа, включая штамм D39 (серотип 2). Было показано, что делеция гена *prtA* в *S. pneumoniae* D39 снижала летальность мышей через 36 часов после в/бр заражения [30] и облегчала течение пневмонии после интраназального заражения [31].

Адъюванты и их значение при иммунизации белковыми антигенами

Поскольку известно, что белковые антигены, даже содержащие оптимальные В-клеточные и Т-клеточные эпитопы, слабо иммуногенны, они требуют использования носителей и адъювантов (AD). На протяжении многих лет наиболее распространенным AD был основанный на Al(OH)₃ (Al-AD), относительно безвредный, индуцирующий TLR-зависимый эффект, он увеличивает стабильность антигена и усиливает доставку к антигенпрезентирующим клеткам (АПК), хотя есть данные о появлении цитотоксических Т-лимфоцитов или гранулем на месте введения [32]. Механизм действия Al-AD сложен, включает индукцию ответа на сигналы опасности, усиление презентации антигена и привлечение иммунных клеток и может меняться в зависимости от специфического состава вакцины. Использование прямого конъюгирования пептидов с TLR может привести к активации Т-клеток и презентации антигена. Было показано, что конъюгирование антигенных пептидов с лигандами TLR, такими как CpG-лиганд TLR9, значительно улучшает примирование Т-клеток *in vivo* благодаря комбинированному эффекту повышенного поглощения длинных пептидов и совместному иммуностимулирующему действию [33]. Отмечено, что в различных моделях на животных белки пневмококка при совместном введении с TLR индуцируют высокую иммуногенность [34].

Для компенсации слабой иммуногенности и индукции соответствующего типа иммунного ответа в вакцины включают различные AD, в том числе водно-масляные и масляно-водные эмульсии, лиганды толл-подобных рецепторов, флагеллин и другие частицы, обладающие такой же активностью, что и как алюминиевые AD [35,36], например, наночастицы, образовавшие PLGA (poly lactic-co-glycolic acid) – AD, эффективный в коклюшной вакцине [37], который индуцирует Th-ответ (Th1 и Th2) и продукцию антител В-клетками. Другие AD на основе наночастиц, например, PEI-полиэтиленмин [38] и хитозан [39], также оказывают эффект как мукозальный AD в противовирусных вакцинах и в вакцине против *Helicobacter pilori*. Вместе с тем

при использовании AD возможно проявление побочного эффекта. Так, например, при испытании мукозальной вакцины с полным адъювантом СТ (холерный токсин) была отмечена ее высокая эффективность, однако была выявлена также нежелательная токсичность, связанная с модификацией В-субъединицы СТ [40].

Широко используемыми AD является группа основанных на сквалене¹ эмульсий, таких как MF59, AS03, и AS02, варьирующих по составу. MF59 лицензированный в мире – типичный адъювант этой группы, представляющий собой молочно-белую эмульсию (oil-in-water). Он входит в состав многих вакцин, в том числе прошедших клинические испытания [32]. Адъювант AS03 содержит, кроме сквалена, DL- α -токоферол, индуцирует NF- κ B, цитокиновый и хемокиновый ответ и приводит к миграции АПК к лимфоузлам, активируя в них, в частности, клетки врожденного иммунитета. MF59 и AS03 способствуют Th1 и Th2 иммунному ответу. Адъювант AS02 представляет собой систему, состоящую из эмульсии сквалена и стимуляторов иммунных белков – MPL (3-O-дезацил-4-монофосфорный липид А) и сапонин QS21, индуцирующих Th1 иммунный ответ [41]. Было показано, что конструкция PsaA-PspA23 (состоит из участка PsaA, ответственного за адгезию, и N-терминального участка, определяющего 3 клайд PspA, и полноразмерного PspA2) с AI-AD способствует высокому титру антител у мышей и выработке эффективной защиты от пневмококковых штаммов, PspA которых относятся к 1 и 2 семейству независимо от серотипа [42]. В исследовании Chen X с соавт. [32] проведено масштабное сравнительное изучение четырех AD (MF59, AS03, AS02, AI-AD), определения их оптимальных доз при иммунном ответе на слияние белков PsaA-PspA23 с включением полноразмерного PspA4 (содержит N-терминальный домен и богатую пролином область 4 клайда PspA). Мышей линии BAIB/c иммунизировали однократно в/м вакциной, содержащей PsaAPspA23 (MM 90 kD), PspA4 (MM 65 kD) и AD, с отрицательным (PBS буфер с AI-AD) и положительным (вакцина PPV23 п/к) контролями. Было показано, что все 4 AD способствовали IgG антиген-специфическому иммунному ответу. При этом использование AS02 индуцировало наиболее высокий титр IgG1 и IgG2a и уровень цитокинов IL-2, IL-4, TNF- α , и IFN- γ . Установлено влияние AD на размножение бактерий в легких и крови: во всех случаях КОЕ/мл было ниже у иммунизированных мышей в сравнении с отрицательным контролем. Наиболее эффективный бактериальный клиренс крови в отношении штамма ATCC BAA-334 (клайд 3, семейство 2) отмечен при использовании AS02, а также при PPV23 (положительный контроль); в то же время как при применении всех AD в отношении штамма ATCC 10,813 (семейство

1, клайд 2) отмечен сравнимый клиренс крови и элиминация из легких, с преимуществом перед PPV23. Для изучения протективной активности заражали мышей интраназально четырьмя штаммами *S. pneumoniae* (в которых PspA относятся к 1 и 2 клайдам семейства 1, 3 и 5 клайдам семейства 2) и установили разную степень защиты от штаммов обоих семейств, причем в группе с адъювантом AS02 защита отмечена в отношении всех 4 штаммов с разными клайдами PspA. Таким образом, исследования Chen X с соавт. показали, что комплекс антигенов PsaA-PspA23 и PspA4 в комбинации с 4 AD повышает системный иммунный ответ и обеспечивает защиту от пневмококковых штаммов, содержащих PspA различных семейств, и их эффективную элиминацию из крови и легких, причем наиболее выраженный эффект наблюдается при использовании адъюванта AS02 даже в сравнении с коммерческой вакциной PPV23.

В контролируемом рандомизированном клиническом исследовании (NCT00307528 / NCT01767402, I/II стадии) было проведено сравнительное изучение вакцин на основе белка PhtD (в дозах 10 или 30 мкг) с адъювантом AS02V при двукратной в/м иммунизации пожилых (≥ 65 лет) и молодых (18–45 лет) людей в сравнении с использованием общепринятого AI-AD и контролями – PPV23 и плацебо (физиологический раствор) [43]. При изучении безопасности и реактогенности вакцин показано отсутствие серьезных реакций; на основании выявления анти-PhtD IgG установлен высокий гуморальный иммунный ответ в старшей когорте, хотя и ниже, чем в молодой когорте. В обеих когортах численность В-клеток памяти и CD4 Т-клеток увеличивалась вакцинацией PhtD с любым адъювантом через месяц после второй дозы; у пожилых участников увеличение В-клеток памяти было статистически значимо больше при AS02V, чем при AI-AD, а значимые различия между AD в молодой группе не определены. При пассивной защите мышей от назального заражения *S. pneumoniae* 3 серотипа сыворотками (получены при иммунизации обеих когорт 3 вакцинами – PhtD, PhtD+AI-AD, PhtD+AS02V) было показано, что анти-PhtD-антитела обеспечивали наибольшую выживаемость мышей (~80%) при введении сывороток от обеих когорт, вакцинированных PhtD + AS02V, от пожилых, иммунизированных вакциной PhtD + AI-AD, в то время как такая же сыворотка молодых защищала ~60% мышей.

В другом рандомизированном клиническом исследовании (NCT007560067, I стадии), в котором кроме приведенных выше вариантов при иммунизации пожилых людей использовали конъюгированную вакцину PCV8, показано, что свободные или конъюгированные dPhtD и dPly обладали приемлемыми профилями безопасности и реактогенности [44]. Иммунные ответы усиливались с помощью AS02V-адъювантной композиции, содержащей свободные PhtD-dPly; отмечена

¹ Сквален – маслянистый жидкий углеводород, который содержится в масле печени акулы и кожном сале человека и является метаболитическим предшественником стероидов или стеролов.

тенденция к более высокой опсонофагоцитарной активности при PCV8, чем при PPV23. Поскольку не выявлено серьезных реакций при оценке безопасности вакцины PhtD с адъювантом AS02V, эта вакцина может быть полезна для профилактики пневмонии у взрослого населения, включая пожилых людей.

Для изучения эффективности иммунизации PrtA в сочетании с адъювантом курдланом для предотвращения инфекции *S. pneumoniae* мышей BALB/c иммунизировали интраназально комбинацией фрагмента PrtA (аминокислоты 144–1041) и адъюванта курдлана², являющегося индуктором Th17-ответа [45]. Было показано, что PrtA-курдлан индуцирует антиген-специфический IL-17A и IFN- γ , но не Th2 ответ и гуморальный ответ: анти-PrtA IgG в сыворотке и в БАЛ, PrtA-специфический IgA в сыворотке, в мукозальных секретах (в слюне, назальном смыве, но не в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ)). При этом отмечено, что PrtA в комбинации с курдланом не защищает мышей от пневмонии (при назальном заражении) и от системной инвазии.

Были изучены различные современные системы доставки вакцинных антигенов при создании эффективных пептидных вакцин. Так, в качестве потенциальных средств доставки, которые могут стабилизировать вакцинные антигены и действовать в качестве адъювантов, внимание привлекли наноразмерные материалы (<1000 нм), такие как вирусоподобные частицы (VLP), бактериальные белки наружной мембраны (БНМ), липосомы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), полимерные и неразлагаемые наносферы. Бактериальные БНМ представляют собой другую систему доставки среди наночастиц, используемых, в частности, для доставки пневмококковых белковых антигенов. Так, фрагменты PspA и полноразмерные белки, включенные в БНМ сальмонелл, на мышинной модели при интраназальном введении индуцировали защиту от пневмококковой колонизации, опосредованную Th-17, без необходимости в мукозальном адъюванте [46]. БНМ представляют собой пузырьки липидов, высвобождаемые из наружных мембран грамотрицательных бактерий для связи между собой и с другими микроорганизмами в окружающей среде. БНМ, обладающие необходимыми иммуностимулирующими свойствами, способностью презентации антигена на их поверхности и включения гетерологичных антигенов, могут использоваться в качестве эффективных систем доставки вакцинных антигенов. Такие БНМ были использованы при разработке вакцины против менингококка серогруппы B [47].

При использовании в субъединичной PspA-вакцине AD на основе наночастиц PST (polysorbitol transporter), был установлен антиген-специфический

иммунный ответ у мышей и способность АПК поглощать антиген и формировать защиту от летального заражения *S. pneumoniae* [48]. Кые Y-C с соавт. [49] при иммунизации рекомбинантным PspA использовали AD PST, который считают эффективным мукозальным адъювантом, способным стимулировать адаптивный иммунитет. В этом исследовании ген, связанный со стволовой частью PspA (1-302 аминокислота) 2 кластера 1 семейства штамма *S. pneumoniae* Rx1, включающей область α -ворот и часть богатого пролином участка на С-терминальном конце, был клонирован в вектор pET21d(+), и *Escherichia coli* BL21 (DE3) была трансформирована этой плазмидой. Иммунизировали мышей C57BL/6 интраназально трехкратно сконструированной субъединичной вакциной на основе PspA/PST и для сравнения PspA с известным AD (холерный токсин – PspA/CT) и только PspA, а также PBS. Через 3 недели после последней вакцинации заражали летальной дозой вирулентного штамма *S. pneumoniae* WU2 (3 серотип). Была определена сравнимая высокая протективная активность – 100% выживаемость и отсутствие снижения веса мышей, иммунизированных вакцинами с AD, при отсутствии выживаемости мышей в группах сравнения (только PspA, CT и PBS). Титр специфических IgG в сыворотке после каждой иммунизации, как и изотипа IgG, был также сравним и значительно выше при иммунизации двумя адъювантированными вакцинами в сравнении с PspA. Также после 3-й иммунизации адъювантированными вакцинами отмечено повышение титра IgA, высоким был и титр специфических IgG и IgA в БАЛ, но при PspA/PST ниже, чем при PspA/CT. Число клеток, секретирующих специфические PspA-IgG антитела в органах (селезенке, лимфоузлах, легких), в группе мышей, иммунизированных PspA/PST, было выше, чем в контролях, а уровень PspA-IgA антител выше только в лимфоузлах по сравнению с контролями.

При изучении длительности протективного иммунитета при иммунизации PspA/PST было установлено, что, во-первых, специфические PspA-IgG в сыворотке сохраняются длительно на высоком уровне – в течение 15 недель и в БАЛ – в течение 12 недель после последней иммунизации; во-вторых, по большому числу АПК в костном мозге в течение 12 недель после последней иммунизации установлена также иммунологическая память В-клеток; в-третьих, длительно сохранялась протективная активность (100% выживаемость), что было подтверждено при заражении мышей через 12 недель после последней иммунизации. С помощью проточной цитометрии в ответ на введение вакцин PspA/PST в клетках лимфоузлов была обнаружена продукция цитокинов, в частности, в супернатанте отмечено увеличение численности IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, и среди внутриклеточных цитокинов – значительная индукция Th2-клеточного ответа, проявляющегося в продукции PspA специфических

² Курдлан – линейный нейонный β -1,3-глюкан, выделенный из бактерии *Alcaligenes faecalis*, из-за нетоксичности и способности к гелеобразованию при повышении температуры, принят в США как пищевая добавка.

IL-5 и IL-10, а также выявлена значительная продукция В-клетками IL-10, но не IL-5. Эти результаты согласуются с данными о том, что адъювант PST не индуцирует провоспалительные цитокины в отличие от CT [48]. Кроме того, при сравнении с общими CD4⁺ Т-клетками отмечено увеличение продукции PspA специфических Т-клеток, в частности фолликулярных Th (Tfh)-клеток и IL-21. При изучении воздействия вакцины на фенотипические маркеры функциональной активности дендритных клеток определено, что способность экспрессии MHCII у PspA/PST выше, чем у PspA/CT, в то время как способность к индукции CD80 и CD86 выше при PspA/CT, что согласуется с данными в отношении индукции провоспалительного ответа на введение PspA/CT [48]. Таким образом, в исследовании Kye Y-C с соавт. [49] показано, что интраназальное введение субъединичной вакцины PspA/PST стимулирует Th2- или Tfh активность с антиген-специфическим Т- и В-клеточным ответом; в лимфоузлах значимо увеличивается численность CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих IL-4/IL-5, известные как индуцирующие В-клеточную дифференциацию и терминальное созревание IgG продуцирующих В-клеток и поддерживающих их длительную иммунологическую память.

Вакцины на основе частиц полиангидрида (безводных частиц) – нановакцины – представляют собой платформу следующей генерации вакцин против таких патогенов, как вирус гриппа, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*. Эти нановакцины сформулированы с использованием кополимеров на основе 1,8-bis-(p-carboxyphenoxy)3,6-dioxaoctane (CPTEG), 1,6-bis-(p-carboxyphenoxy)hexane (CPH) и sebacic acid (SA). Полиангидриды обеспечивают преимущества доставки вакцин и адъювантные свойства, обладают высокой биосовместимостью с минимальной местной по сравнению с традиционными адъювантами реактогенностью [50]. Кроме того, они гидрофобны и стабилизируют лабильные белки, защищая их от денатурации продуктами ферментативного расщепления и кислотной деградации и обеспечивают пролонгированное высвобождение антигена. Так, было показано, что мыши, иммунизированные однократной дозой нановакцины, инкапсулирующей слитый белок *Y. pestis* F1-V, были защищены от летального заражения *Y. pestis* по меньшей мере в течение 280 дней после иммунизации [51]. Исследователи определили, что вариация состава полиангидридного сополимера модулирует интернализацию и персистенцию в АПК *in vitro*, а также индукцию как клеточного, так и гуморального иммунного ответа *in vivo*, что свидетельствует о способности адаптировать химию полимера для рационального конструирования нановакцин с целью оптимальной индукции антигенспецифического иммунитета [52]. Было показано, что N-терминальная область рекомбинантного PspA (rPspA), инкапсулированная в наночастицы (CPH и CPTEG), сохраняла стабильность,

конформационную структуру, а также биологическую активность при высвобождении, что было установлено с использованием анализа связывания аполактоферрина [53].

В последующих исследованиях при оценке способности различных вариантов полиангидридных носителей была подобрана композиция нановакцины (А – 1 µg PspA инкапсулированного в 50 µg 50:50 CPTEG:CPH наночастиц; В – 0.5 µg PspA инкапсулированного в 25 µg 50:50 CPTEG:CPH наночастиц + 25 µg свободных 50:50 CPTEG:CPH наночастиц + 0.5 µg растворимого PspA) и при однократной иммунизации показано, что по сравнению с PspA с обычным Al-AD приведенные композиции защищают животных от летального заражения с 25-кратным уменьшением общей дозы PspA; эта доза остается стабильной (особенно вариант А), что важно в условиях хранения препарата при комнатной температуре в течение, по меньшей мере, 2 месяцев [9].

Разработка методов мукозальной иммунизации

Учитывая, что пневмококковая пневмония остается распространенным и тяжелым заболеванием, альтернативным способом защиты может быть мукозальная иммунизация, при которой мишенью для действия препаратов являются легкие. Как отмечено в обзоре Kataoka K с соавт. [54], для создания безопасных эффективных вакцин, индуцирующих мукозальный иммунитет к большинству бактериальных легочных инфекций, необходима система соответствующих вакцинных антигенов и нетоксичных молекулярных АД. Такие конструкции вакцин могут индуцировать антиген-специфический иммунный ответ, защищающий от мукозальных инфекций. Было показано, что наногель-содержащий рекомбинантный PspA защищает мышей после интраназальной иммунизации от летального пневмококкового заражения, а у макаков индуцирует IgG в сыворотке и в БАЛ, IgA – в назальном смыве и Th2/Th17 цитокиновый ответ [55,56]. Была разработана и изучена порошковая композиция для применения ингаляционным способом или аэрозольно при распылении (с использованием небулайзера) для людей, включающая rPspA4Pro, адсорбированный на поверхности полимерных наночастиц (NPs) PGA-co-PDL (полиглицерол адипат-со-ω-пентадекалактон), инкапсулированных в микрочастицах L-лейцина. Этот комплекс сухих порошковых нанокомпозитных микрочастиц (NCMPs) – NP/NCMP PspA4Pro, представляющий собой частицы ~2µm, может быть использован как легочная вакцина [57]. При п/к иммунизации людей этой нановакциной отмечен высокий анти-PspA титр IgG [53]. Было проведено исследование иммунного ответа и протективного потенциала при двукратной иммунизации мышей назально конъюгатом NP/NCMP PspA4Pro на основе PGA-co-PDL и п/к PspA4Pro [58]. Отмечено

значительное повышение титров IgG в сыворотках крови иммунизированных мышей, что свидетельствует о влиянии антигенов на Th2-ответ; в БАЛ определен высокий уровень IgG только при иммунизации NP/NCMP PspA4Pro. Установлено связывание сывороточных IgG с интактными бактериями, экспрессирующими PspA, которые относятся только к 3, 4 и 5 клайдам 2 семейства. При п/к и назальной иммунизации изучаемыми препаратами установлена частичная защита от летального заражения гетерологичным пневмококковым штаммом ATCC6303 (серотип 3, PspA5) 50% и 67% соответственно; только при назальном введении отмечено значимое снижение высеваемости из БАЛ и при анализе содержания цитокинов и хемокинов в БАЛ у этих мышей отмечен более высокий уровень только в отношении провоспалительного цитокина IL-6, TNF- α и нейтрофильных хемоаттрактантов KC/CXCL1 и MIP-2/CXCL2, по сравнению с контролем (физиологическим раствором). Таким образом, показано, что мукозальная иммунизация NP/NCMP PspA4Pro, направленная на мишень – легкие, способна индуцировать местный и системный иммунитет, создавая защиту только в отношении штамма, экспрессирующего PspA гомологичного семейства [58].

Серия работ посвящена исследованиям, связанным с разработкой мукозальной вакцины на основе PspA с AD, который представляет собой бактериоподобные частицы BLPs (bacterium-like particles), необходимые для расположения антигена на его поверхности. Этот AD получен из лизата *Lactococcus lactis* [14] и в серии экспериментальных исследований он использован как мукозальный AD и носитель. Так, при интраназальной иммунизации вакциной PspA-BLP, в которой PspA 3 клайда 2 семейства, установлен высокий уровень SIgA в респираторном тракте, но не сывороточных IgG [59]. Эта вакцина защищала мышей при летальном интраназальном заражении штаммами, содержащими PspA различных семейств (гомологичных и гетерологичных), независимо от серотипа; определено значимое снижение их высеваемости из легких. На основании этих результатов авторы считают такую мукозальную вакцину возможным потенциальным средством повышения системного и мукозального иммунитета. В дальнейших исследованиях была использована система афинно-связывающего домена – якорного белка (PA), способного к связи с антигенами, закрепленными на поверхности BLP. PA является доменом гидролазы клеточной стенки *L. lactis* ActA, состоящей из трех повторов мотива связывания клеточной стенки типа LysM [60]. Этот домен нековалентно связывается с пептидогликаном грамположительных бактерий, в результате чего антигены, слитые с PA, могут эффективно и стабильно прикрепляться к пептидогликану BLP и вызывать антигенспецифический иммунный ответ. При использовании PspA (клайда 4 семейства 2),

слитого с PA, закрепленного на поверхности BLPs, было показано, что интраназальная иммунизация этим препаратом (BLPs/PspA-PA) индуцирует PspA-специфические IgG в сыворотке и IgA в назальном смыве; на мышинной модели установлена защита от заражения пневмококками с PspA двух клайдов – гомологичного и гетерологичного семейств [61].

Подробно описана в исследовании такая же технология разработки и испытания вакцины, созданной с использованием BLP, оценено связывание с ним PspA2-PA или PspA4-PA (клайда 2 семейства 1 и клайда 4 семейства 2 пневмококков) [62]. PspA2-PA или PspA4-PA получали путем индукции культуры *E. coli* BL21, трансформированной pET-20b-PspA2-PA или pET-20b-PspA4-PA. Результаты анализа SDS-PAGE подтвердили, что PspA2-PA и PspA4-PA связываются с BLP, и в дальнейшем эти вакцины обозначены соответственно PspA2-BLP и PspA4-BLP. С помощью конфокальной иммунофлуоресцентной микроскопии со специфическими антителами против PspA2 и PspA4 было доказано, что связывание BLP с антигенами не влияет на их антигенность; установлено связывание сывороточных антител с интактными бактериями, экспрессирующими PspA всех 3 семейств от 1 до 5 клайдов. При использовании этого комплексного препарата было установлено, что он индуцировал как высокий уровень сывороточных IgG, так и мукозальных SIgA и обеспечивал высокую протективную активность: через 14 дней после иммунизации показана 100% защита от летального интраназального заражения штаммами *S. pneumoniae* ATCC10813 и ATCC6303 (PspA которых относятся ко 2 клайду 1 семейства и 5 клайду 2 семейства соответственно), при 50–60% выживаемости мышей, иммунизированных вакциной PPV23, и отсутствии выживаемости уже через 4 дня в контроле (при иммунизации BLP). Это позволило авторам сделать обоснованный вывод, что пневмококковую вакцину, обозначенную как PspA-BLP, можно считать перспективной стратегией иммунизации для усиления как системного, так и мукозального иммунного ответа [62].

BLP в качестве AD был применен в мукозальной пневмококковой вакцине на основе мутантного штамма-продуцента детоксицированного пневмолизина (Plym2), в котором были заменены 2 аминокислоты, что привело к изменению его антигенности – к потере цитотоксичности при сохранении способности индуцировать нейтрализующие антитела. В этом препарате белок Plym2 расположен на поверхности BLPs. Показано, что интраназальная иммунизация мышей BLP-Plym2 индуцирует высокий уровень IgG в сыворотке и SIgA в БАЛ; в сыворотке отмечен высокий титр нейтрализующей активности, который может ингибировать гемолиз дикого типа Ply [63]. Авторы считают, что вакцина такого типа могла бы быть использована для формирования мукозального

иммунитета. Однако впоследствии при иммунизации этим препаратом отсутствовала эффективная защита от заражения, что связали со свойствами самого пневмолизина, поскольку антитела к нему, обладая нейтрализующей активностью, не защищают от размножения пневмококка [62]. Более перспективным авторам представляется использование приведенной выше PspA-BLP-вакцины.

Известно, что система врожденного иммунитета важна в индукции адаптивного иммунитета (АИ). Так, TLR, экспрессируемые клетками врожденного иммунитета, включая дендритные клетки (DC), специфически распознают PAMPs (в т.ч. ЛПС, CpG ДНК, флагеллин), при этом TLR9 являются наиболее экспрессируемыми плазмоцитоподобными DC и В-клетками. Так, CpG ODN (неметилированный CpG олигодезоксинуклеотид) вызывает стимуляцию и созревание плазмоцитоподобных DC под действием антигенспецифического CD4⁺ Th1 и CD8⁺ CTL ответа. Показано, что протективный иммунный ответ, сходный с триггерным действием бактериальной ДНК, индуцируется синтетическим CpG ODN – эффективным адъювантом. Ранее было показано, что назальное применение pFL как мукозального АД повышало IgA антительный ответ на PspA в легких и носовой полости молодых (6–8 недельных) мышей C57BL/6, что снижало их колонизацию [64]. Эти исследования показали, что назальная вакцина на основе PspA с комбинированным ДНК-АД pFL / CpG ODN повышает уровень PspA-специфического мукозального IgA и в плазме IgG [65] и снижает колонизацию как у молодых (6-8 недельных), так и у возрастных (18-месячных) мышей. Авторы считают, что такая вакцина с комбинированным адъювантом может обладать значительным потенциалом для защиты пожилых от *S. pneumoniae*.

В обзоре также рассмотрена возможность использования адъюванта pFL+PC (фосфорилхолин), конъюгированного с белком [54]. Это объясняли тем, что PC, синтезирующийся из холина и аденозинтрифосфата, включается в тейхоевую и липотейхоевую кислоты как компонент клеточной стенки пневмококка и считается иммунодоминантным эпитопом структурного компонента [66]. Это предполагает возможность использования PC-KLN-конъюгата с белком-носителем KLN (фосфорилхолин-гемоцианин) как кандидатного антигена для протективной вакцины против пневмококковой инфекции. Было показано, что при заражении 2×10^7 клеток *S. pneumoniae* через 7 дней после назальной иммунизации мышей линии C57BL/6 вакциной PC-KLN+pFL и при высева через 12 ч БАЛ и назального смыва снижается КОЕ/мл, что свидетельствовало о подавлении колонизации верхних и нижних дыхательных путей адъювантной системой, мишень которой – DC, и, в свою очередь, приводит к предупреждению пневмококковой инфекции [64]. Так как с использованием МкАт была определена специфичность образующихся после

назальной иммунизации IgA и IgM, то, по мнению исследователей, вакцина, скорее всего, индуцировала мукозальные и системные PC-специфические антитела T15 идиотипа. Было также показано антиатеросклеротическое действие данного препарата. Исследователи обращают внимание на то, что белковый носитель KLN индуцирует как специфический, так и неспецифический иммунный ответ, и его использование в комплексе с pFL, который индуцирует специфический иммунный ответ, может привести к побочному эффекту [67]. Поэтому предполагают перспективность применения PspA в качестве белка-носителя для PC, чтобы индуцировать T-зависимый клеточный и независимый антительный ответ к *S. pneumoniae*. На основании анализа большого объема экспериментальных и теоретических данных Kataoka K с соавт. делают заключение о перспективности разработки и применения мукозального адъюванта с мишенью – DC, такого, как назальный АД на основе ДНК, например, pFL+PC, как пути развития более безопасной и эффективной мукозальной вакцины к бактериальным и вирусным антигенам [54]. Для успешного развития вакцины необходимо: во-первых, всесторонне изучить ее безопасность и эффективность, поскольку нет аналогичной коммерческой вакцины; во-вторых, определить критерии оценки эффективности такой вакцины на людях; в-третьих, изучить влияние таких препаратов на опсонофагоцитоз как один из эффективных показателей протективного иммунного ответа [62].

Продолжение разработки цельноклеточных и живых пневмококковых вакцин

Цельноклеточные вакцины исторически занимают большое место в вакцинологии. На примере коклюшных вакцин очевидно, что они эффективны и создают более длительный иммунитет, чем бесклеточные, однако они более реактогенны, но остаются на вооружении в развивающихся странах. Одним из путей разработки белоксодержащих пневмококковых вакцин является цельноклеточный подход, основанный на необходимости рентабельного метода иммунизации большим количеством потенциальных белковых антигенов, чтобы индуцировать серотип-независимый иммунитет [5,68]. Цельноклеточная пневмококковая вакцина (PWCV) была изучена как альтернатива полисахаридным вакцинам, она индуцирует антитела и активацию IL-17A, защищающие мышей от инвазивной пневмококковой инфекции и снижающие носоглоточную колонизацию [69]. Она разработана на основе бескапсульного штамма *S. pneumoniae* RM200 RX1E PdT ΔlytA, аутолизинотрицательного, в котором пневмолизин заменен на пневмолизин³. Бактериальные клетки убивали β-пропиолактоном; использовали AI-AD. Защита

³ Пневмолизин – производное, несущее ген токсина с 3 точечными мутациями, которые отменяют как цитолитическую активность, так и активацию комплемента.

была определена в нескольких моделях на мышах C57Bl/6: назальной колонизации штаммом серотипа 6B, в фатальном сепсисе при респираторном заражении вирулентными штаммами серотипов 3 и 5; кроличьи антисыворотки были активны в фагоцитарной реакции *in vitro* и защищали мышей *in vivo* от сепсиса при респираторном заражении штаммом серотипа 3. В I фазе клинических испытаний (NCT01537185) была установлена безопасность и переносимость вакцины в дозах 100 и 300 мкг при трехкратной иммунизации взрослых (в США) и была также показана ее иммуногенность – IgG ответ на различные пневмококковые белки, включая функциональные антитела к Ply, как и увеличение цитокинового Т-клеточного ответа, в том числе IL-17 [4]. Позднее, в I/II фазах клинических испытаний (NCT02097472), проведенных в Кении в апреле 2014 г. – декабре 2015 г, PWCV вводили 304 здоровым подросткам (дозы 600 и 1000 мкг) и иммунизированным PCV10 детям (возраст 12–15 мес, дозы 300 и 600 мкг) для оценки безопасности, переносимости и иммуногенности различных доз вакцины. Как было отмечено в работе Moffitt K и Mallley R [4], и в настоящее время (на 01.07.2020), в доступной печати результаты не обнаружены, несмотря на завершенность приведенного этапа клинических испытаний и подробное методическое описание.

Альтернативой приведенному варианту вакцины является использование бактериального лизата, в котором повысить представленность иммунопротективных белков *S. pneumoniae* (PiuA, PiaA, PsaA, RrgA, RrgB, ClpP, PspA и Ply), изоэлектрическая точка (pI) которых 7,5 или ниже, можно частично с помощью анионообменной хроматографии с буфером pH 8,0, а также при выращивании продуцента в стрессовых условиях, например, при высокой температуре, для индукции белков теплового шока (Hsps), что может повысить антигенность, поскольку они облегчают перекрестную презентацию пептидов и действуют как естественные AD [68]. В этом комплексном исследовании представлена мультиантигенная вакцина (MAV), разработанная на основе штамма *S. pneumoniae* TIGR4 (ATCC BA-334), а также штамма TIGR4 B7.1 (PlyD6) (экспрессирует инактивированный пневмоллизин), подвергавшихся тепловому шоку при 42 °C в течение 30 мин, после чего была проведена анионообменная хроматография бактериального лизата для обогащения отрицательно заряженными антигенами, например, PspA и Ply. В иммуноблоте была определена фракция с заметным увеличением экспрессии Hsp60 и Hsp70 в MAV по сравнению с инактивированным при 65 °C бактериальным лизатом (HKL), показаны различия в количестве, интенсивности и молекулярной массе полос неHsp антигенов, идентифицированных после инкубации в сыворотках от животных, вакцинированных MAV или HKL. При анализе гемолиза установлено, что препарат MAV содержал активный Ply, который

отсутствовал в HKL и HKWC (цельноклеточный препарат из дикого штамма TIGR4, инактивированный нагреванием). Для оценки иммуногенности MAV мышей линии CD-1 иммунизировали двукратно п/к с интервалом 21 день MAV, HKL, HKWC либо буфером (отрицательный контроль). В сыворотке (полученной через 1 неделю после второй вакцинации) MAV, в отличие от HKL, отмечен более высокий антителыный ответ на штамм *S. pneumoniae* TIGR4 с доминированием IgG, без значительного уровня IgM (по сравнению с контролем). У мышей, иммунизированных MAV, также обнаружены значительно повышенные уровни IgG в БАЛ, но не в назальном смыве. Установлен более высокий уровень опсонофагоцитоза при связывании IgG сыворотки мышей, вакцинированных MAV (по сравнению с HKL или HKWC), со штаммом *S. pneumoniae* TIGR4, а также со штаммами гетерологичных серотипов 18C, 23F, 3 и 19F (по сравнению с контролем). Это свидетельствует, что вакцинация MAV индуцирует функциональные антитела. Показано также, что MAV способна защищать от заражения гомологичным или гетерологичным штаммом *S. pneumoniae* на уровне, аналогичном тому, который обеспечивается вакциной PCV13, и связана со значительными изменениями воспалительного ответа легких на инфекцию. В приведенных исследованиях показано, что как иммуноблоттинг, так и тандемная масс-спектрометрия подтвердили повышенное содержание Hsp в MAV по сравнению с лизатом (HKL). Кроме того, была определена повышенная экспрессия множества поверхностных белков, в том числе известных антигенов (главным образом, липопroteинов, Hsps, поверхностных антигенов, таких как PavB, PsaA, PiaA) и уменьшенная – протективных антигенов Ply, PspA и PspC. Все исследования продемонстрировали усиление антителыных ответов у мышей, вакцинированных MAV, по сравнению с HKL, демонстрируя преимущество использования MAV в создании потенциально более эффективной вакцины. В отличие от HKL, MAV индуцировала антителыные ответы на все белковые антигены, протестированные с использованием системы мультиплексного анализа (MSD), причем вакцинация MAV все же индуцировала более сильный IgG ответ на антигены PspC и Ply в MSD-анализе, чем вакцинация HKL. Эти данные, по мнению авторов, свидетельствуют, что MAV усиливает иммуногенность. Прямое сравнение препаратов MAV, приготовленных с или без стадии теплового шока, не выявило четких различий в содержании белковых антигенов и антигенности, что указывает на важность этапа хроматографии в повышении антигенности MAV, а не индукции Hsp. В целом эти данные дают основание предполагать, что технология создания MAV может обеспечить серотипнезависимую защиту от *S. pneumoniae* белковыми антигенами, которые стимулируют ответы антител, не требуя идентификации специфических защитных антигенов или производства

рекомбинантных белков для включения в субъединичные вакцины. MAV требует ограниченной последующей обработки и позволяет быстро создать высокопроизводительный вакцинный продукт, значительно снижая стоимость вакцин и повышая вероятность того, что вакцина станет доступной в странах с низким и средним уровнем дохода [68].

Перспективность технологии MAV при создании вакцин против *S. pneumoniae* следующего поколения подтверждена результатами завершенной I фазой клинических испытаний (NCT0257635): в двойном слепом рандомизированном исследовании с участием 36 добровольцев (18–40 лет), получивших 3 прививки PnuBioVax с интервалом в 28 дней при одной из трех доз (50, 200, 500 мкг) или плацебо. Оценка безопасности и титра антител к PnuBioVax и пневмококковым антигенам показала, что все дозы были безопасными и хорошо переносимыми, наблюдалось статистически значимое увеличение титров анти-PnuBioVax IgG при уровнях доз 200 и 500 мкг по сравнению с 50 мкг и плацебо. У большинства добровольцев, получавших 200 и 500 мкг PnuBioVax, отмечено двукратное увеличение титра антител к пневмолизину (Ply), пневмококковому поверхностному антигену (PsaA), PiaA (потребление железа), PspA (пневмококковому поверхностному белку A) [70].

Среди изучаемых вакцин живые аттенуированные вакцины имеют ряд преимуществ, обладая перекрестной защитой широкого спектра действия на основе индукции как иммунологической памяти, так и клеточно-опосредованного иммунного ответа на общие и важные пневмококковые антигены [71], однако существует обеспокоенность в отношении безопасности и стабильности живых ослабленных вакцин. Jang A-Y с соавт. исследовали безопасность и иммуногенность живой цельноклеточной пневмококковой вакцины, сконструированной путем делеции гена *lgt* из штамма *S. pneumoniae* серотипа 4 – TIGR4 (TIGR41lgt) для защиты от гетерологичных пневмококковых штаммов [72]. Липопроtein-диацил-глицерил-трансфераза (*Lgt*) является высококонсервативным ферментом, который катализирует присоединение диацилглицерила к N-концевому остатку цистеина в соответствии с пептидной последовательностью, известной как пре-пролипипопротеин на мембране. Удаление *lgt* у грамположительных бактерий может значительно ослабить вирулентность, приведет к неправильному закреплению липопротеинов на цитоплазматической мембране [73,74]. Было показано, что дефицитный по *lgt* штамм – мутант пневмококка проявлял сниженный TLR2-опосредованный воспалительный ответ *in vitro* и уменьшенную инвазивность *in vivo* [75]. При изучении биологических свойств сконструированного штамма TIGR41lgt было показано наличие PsaA в клеточном лизате дикого штамма TIGR4 и в культуральном супернатанте TIGR41lgt, что указывает на его аномальное закрепление на мембране [72].

Наряду с ослаблением инвазивности и способности активировать воспаление штамм TIGR41lgt был способен колонизировать носоглотку мыши достаточно долго, вызывая мукозальный антительный ответ и IgG2b-доминантный Th1 системный иммунный ответ, которые перекрестно реагировали на гетерологичные пневмококковые серотипы. При этом длительная колонизация является локализованной и не приводит к инфекционному процессу даже в ответ на в 1000 раз превышающую летальную дозу родительского штамма, что говорит в пользу штамма TIGR41lgt как потенциального вакцинного кандидата. Вакцинация живой TIGR41lgt индуцирует гуморальный ответ с доминированием IgG2, склонный к Th1 ответу у мышей. В отличие от человека, у которого IgG1 более эффективен при опсонизации и FcγR-опосредованном пневмококковом фагоцитозе, у мышей IgG2 функционирует как высокоэффективный опсонин и более значительно вовлечен в опсонофагоцитоз и сывороточную бактерицидную активность, чем IgG1 [76].

Поскольку пневмококки обладают тропизмом к дыхательным путям, альвеолярные макрофаги играют важную роль в защите от пневмококка и, несмотря на низкий уровень IgA, значительно не отличавшийся в БАЛ между вакцинацией убитой и живой TIGR41lgt, иммунизация живой TIGR41lgt более эффективно удаляла пневмококк из альвеол.

Серия работ посвящена исследованию свойств живых вакцин на основе аттенуированного штамма *S. pneumoniae* SPY1, который был получен случайно при молекулярно-биологической работе со штаммом NCTC 7466 (D39, серотип 2) и характеризовался дефектом трех важных пневмококковых факторов вирулентности, включая капсулу, тейхоевые кислоты и пневмолизин [77,78]. Была определена значительно ослабленная вирулентность этого штамма и сниженная способность назофарингеальной колонизации мышей и показано, что мукозальная иммунизация может обеспечить Т-клеточную и В-клеточную защиту от пневмококковой колонизации и летального пневмококкового заражения: мукозальная иммунизация аттенуированным живым штаммом SPY1 обеспечивает лучшую защиту от заражения штаммами серотипов 4 (TIGR4) и 19F (CMCC 31693), чем системная (п/к) иммунизация мышей. На модели летальной инвазивной инфекции мукозальная вакцинация защищала от штамма серотипов D39 и 3 и клинического изолята серотипа 6B (CMCC 31207) [78]. Установлено, что штамм SPY1 вызывает высокий уровень серотипонезависимых антител и смешанный клеточный иммунный ответ, а также пассивную защиту мышей иммунной SPY1-сывороткой от инвазивного заражения штаммом D39, что указывает на защитный антитело-опосредованный эффект. Кроме того, SPY1 также обеспечивает лучший защитный эффект, чем коммерческая PPV23 вакцина. Было также показано, что несмотря на большую

чувствительность C57BL/6 мышей к пневмококку по сравнению с BALB/c, их иммунизация SPY1 индуцировала сходный спектр цитокинов.

Для увеличения ростовых свойств штамма путем инсерционной инактивации был сконструирован аттенуированный мутантный штамм *S. pneumoniae* SPY1ΔlytA, лишенный гена *lytA*, ответственного за синтез аутолизина, предотвращающего рост штамма, что способствовало его длительной сохранности [79]. Чтобы улучшить стабильность и иммуногенность, был создан штамм SPY1ΔlytACaPi, внешняя поверхность клеток которого покрыта искусственной оболочкой из фосфата кальция путем минерализации *in situ*.

Технология биологической минерализации была успешно использована для улучшения термостабильности живых организмов. Этот метод предусматривает использование фосфата кальция для формирования оболочки, улучшающей термостабильность и иммуногенность, что было установлено на примере вирусов и дрожжей: обработанный таким образом вакцинный вирус можно хранить при 26 °C в течение более 9 дней и при 37 °C в течение 1 недели [80]. Показано, что мукозальная и подкожная иммунизация штаммом SPY1ΔlytACaPi индуцировала лучший защитный эффект, чем SPY1ΔlytA [79]. Титры IgG в группе мышей, иммунизированных п/к SPY1ΔlytACaPi, были выше, чем в группе SPY1ΔlytA + Al-AD, что, по мнению авторов, также свидетельствует об адъювантном действии оболочки CaPi. Изучение клеточного иммунитета мышей, вакцинированных мукозально, показало, что SPY1ΔlytACaPi значительно стимулировал секрецию играющих важную роль провоспалительных цитокинов IL-17A и IL-10 по сравнению с SPY1ΔlytA. При этом между группами SPY1ΔlytACaPi и SPY1ΔlytA + CT не было значительного различия, что также указывает на адъювантный эффект минерализованного слоя. При изучении действия SPY1ΔlytACaPi на назофарингеальную колонизацию *S. pneumoniae* определено, что оно было значительно ниже, чем в группе мышей, получавших неминерализованный штамм

[79]. Показано, что минерализованная оболочка повышает бактериальную стабильность – штамм можно хранить при 37 °C в течение 1 недели, что важно, поскольку для вакцин поддержание холодной цепи имеет решающее значение для адекватной биологической активности. Установлено, что защитный эффект минерализованной вакцины превосходил неминерализованную вакцину как при мукозальной (индуцировала в основном Th17-ответ), так и при п/к вакцинации (повышала уровень IgG). Полученные результаты закладывают основу для дальнейших исследований и разработок вакцин против *S. pneumoniae*.

Заключение

В последние годы разработке альтернативных инновационных противопневмококковых препаратов на основе протективных белковых антигенов с использованием современных адъювантов, а также цельноклеточных и живых пневмококковых вакцин, уделяют большое внимание. При этом подчеркнута целесообразность мукозальной иммунизации, учитывая тропизм пневмококка по отношению к слизистым верхних и нижних дыхательных путей, и необходимость защиты как от инвазивной инфекции, так и от колонизации дыхательной системы. Тем не менее, за исключением применяющихся во всем мире полисахаридной и конъюгированных вакцин, новые коммерческие препараты (по доступным литературным данным на 01.07.20) не зарегистрированы, хотя в 2014–2017 гг. находились на разных стадиях клинических испытаний [4,43,44,70] и показали свою безопасность, хорошую переносимость и увеличение титров специфических IgG.

Проведенный анализ данных литературы показывает, что на данном этапе наиболее разработанными и перспективными представляются препараты на основе бактериальных лизатов (PWCV) и протективных белковых антигенов (PspA, dPly), а также этих антигенов в смеси с адъювантами и, возможно, с некоторыми этиологически наиболее значимыми капсульными полисахаридами.

Литература

1. Семенова И. Б., Михайлова Н. А. Серотипнезависимые вакцины против пневмококковой инфекции. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. №4. С. 76–85.
2. Петухова Е. С., Воробьев Д. С., Семенова И. Б. Роль белков *Streptococcus pneumoniae* в разработке серотипнезависимых пневмококковых вакцин. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. Т.1, №3. С. 74–80.
3. Daniels C., Rogers D., Shelton C. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. // The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics. 2016. Vol. 21, N1. P. 27–35.
4. Moffitt K., Malley R. Rationale and prospects for novel pneumococcal vaccines. // Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2016. Vol. 12, N2. P. 383–392.
5. Pichichero M. Pneumococcal whole-cell and protein-based vaccines: Changing the paradigm. // Expert Review of Vaccines. 2017. Vol. 16, N12. P. 1181–1190.
6. Pichichero M., Khan N., Xu Q. Next generation protein based *Streptococcus pneumoniae* vaccines. // Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2016. Vol. 12, N1. P. 194–205.
7. Principi N., Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years. // Expert Opinion on Biological Therapy. 2018. Vol. 18, N1. P. 7–17.
8. Masomian M., Ahmad Z., Ti Gew L., et al. Development of Next Generation *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Conferring Broad Protection. // Vaccines. 2020. Vol. 8, N1. P. 132.
9. Wagner-Muniz D.A., Haughney S.L., Kelly S.M., et al. Room Temperature Stable PspA-Based Nanovaccine Induces Protective Immunity. // Frontiers in Immunology. 2018. Vol. 9. P. 325.
10. Shaper M., Hollingshead S.K., Benjamin W.H., et al. PspA Protects *Streptococcus pneumoniae* from Killing by Apolactoferrin, and Antibody to PspA Enhances Killing of *Pneumococci* by Apolactoferrin. // Infection and Immunity. 2004. Vol. 72, N9. P. 5031–5040.
11. Daniels C.C., Coan P., King J., et al. The proline-rich region of pneumococcal surface proteins A and C contains surface-accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody-mediated protection against sepsis. // Infection and Immunity. 2010. Vol. 78, N5. P. 2163–2172.
12. Hollingshead S.E., Becker R., Briles D.E. Diversity of PspA: Mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. // Infection and Immunity. 2000. Vol. 68, N10. P. 5889–5900.

13. Darrieux M., Moreno A.T., Ferreira D.M., et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. // *Journal of Medical Microbiology*. 2008. Vol. 57, N3. P.273–278.
14. van Roosmalen M.L., Kanninga R., El Khattabi M., et al. Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. // *Meth-ods*. 2006. Vol. 38, N2. P.144–149.
15. Nabors G.S., Braun P.A., Herrmann D.J., et al. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. // *Vaccine*. 2000. Vol. 18, N17. P.1743–1754.
16. Briles D.E., Hollingshead S.K., King J., et al. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. // *The Journal of Infectious Diseases*. 2000. Vol. 182, N6. P. 1694–1701.
17. Darrieux M., Miyaji E.N., Ferreira D.M., et al. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. // *Infection and Immunity*. 2007. Vol. 75, N12. P. 5930–5938.
18. Kawaguchiya M., Urushibara N., Aung M.S., et al. Genetic diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) in paediatric isolates of non-conjugate vaccine serotypes in Japan. // *Journal of Medical Microbiology*. 2018. Vol. 67, N8. P.1130–1138.
19. Moreno A.T., Oliveira M.L.S., Ferreira D.M., et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010. Vol. 17, N3. P. 439–446.
20. Akbari E., Negahdari B., Faraji F., et al. Protective responses of an engineered PspA recombinant antigen against *Streptococcus pneumoniae*. // *Biotechnology Reports*. 2019. Vol. 24. P. e00385.
21. da Silva M.A., Converso T.R., Goncalves V.M., et al. Conjugation of PspA4Pro with capsular *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide serotype 14 does not reduce the induction of cross-reactive antibodies. // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2017 Vol. 24, N8. P.e00118–17.
22. Feldman C., Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines// *Journal of Infection*. 2014. Vol. 69, N4. P. 309–325.
23. Ren D., Almudevar A.L., Pichichero M.E. Synchrony in serum antibody response to conserved proteins of *Streptococcus pneumoniae* in young children// *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015. Vol. 11, N2. P. 489–497.
24. Pichichero M.E., Kaur R., Casey J.R., et al. Antibody response to *Streptococcus pneumoniae* proteins PhtD, LytB, PcpA, PhtE and Ply after nasopharyngeal colonization and acute otitis media in children// *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2012. Vol. 8, N6. P. 799–805.
25. Mann B., Thornton J., Heath R., et al. Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein// *The Journal of Infectious Diseases*. 2014. Vol. 209, N7. P. 1116–1125.
26. Converso T.R., Goulart C., Darrieux M., et al. A protein chimera including PspA in fusion with PhtD is protective against invasive pneumococcal infection and reduces nasopharyngeal colonization in mice// *Vaccine*. 2017. Vol. 35, N37. P. 5140–5147.
27. Chen A., Mann B., Gao G., et al. Multivalent pneumococcal protein vaccines comprising pneumolysinoid with epitopes/fragments of CbpA and/or PspA elicit strong and broad protection. // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2015. Vol. 22, N10. P. 1079–1089.
28. van Westen E., Poelen M.C.M., van den Dobbelsteen G.P.J.M., et al. Immunodominance in T cell responses elicited against different domains of detoxified pneumolysin PlyD1// *PLOS ONE*. 2018. Vol. 13, N3. P. e0193650.
29. Zysk G., Bongaerts R.J.M., ten Thoren E., et al. Detection of 23 immunogenic pneumococcal proteins using convalescent-phase serum. // *Infection and Immunity*. 2000. Vol. 68, N6. P. 3740–3743.
30. Bethe G., Nau R., Wellmer A., et al. The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. // *FEMS Microbiology Letters*. 2001. Vol. 205, N1. P. 99–104.
31. de Stoppelaar S.F., Bootsma H.J., Zomer A., et al. *Streptococcus pneumoniae* serine protease HtrA, but not SFP or PrtA, is a major virulence factor in pneumonia.// *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, N11. P. e80062.33.
32. Chen X., Li B., Yu J., et al. Comparison of four adjuvants revealed the strongest protection against lethal pneumococcal challenge following immunization with PsaA-PspA fusion protein and ASO2 as adjuvant. // *Medical Microbiology and Immunology*. 2019. Vol. 208, N2. P. 215–226.
33. Khan S., Bijker M.S., Weterings J.J., et al. Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, N29. P. 21145–21159.
34. Moffitt K., Skoberne M., Howard A., et al. Toll-like receptor 2-dependent protection against pneumococcal carriage by immunization with lipidated pneumococcal proteins// *Infection and Immunity*. 2014. Vol. 82, N5. P. 2079–2086.
35. Lee S., Nguyen M.T. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases// *Immune Network*. 2015. Vol. 15, N2. P. 51–57.
36. Moyer T.J., Zmolek A.C., Irvine D.J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. // *Journal of Clinical Investigation*. 2016. Vol. 126, N3. P. 799–808.
37. Li P., Asokanathan C., Liu F., et al. PLGA nano/micro particles encapsulated with pertussis toxoid (PTd) enhances Th1/Th17 immune response in a murine model. // *International Journal of Pharmaceutics*. 2016. Vol. 513, N1–2. P. 183–190.
38. Wegmann F., Gartlan K.H., Harandi A.M., et al. Polyethyleneimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens. // *Nature Biotechnology*. 2012. Vol. 30, N9. P. 883–888.
39. Jing Z.-W., Jia Y.-Y., Wan N., et al. Design and evaluation of novel pH-sensitive ureido-conjugated chitosan/TPP nanoparticles targeted to *Helicobacter pylori*. // *Biomaterials*. 2016. Vol. 84. P. 276–285.
40. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin – a foe & a friend. *Indian J. Med. Res.* 2011. Vol. 133, N2. P. 153–163.
41. Le B., Agnandji S., von Glasenapp I., et al. A Randomized Trial Assessing the Safety and Immunogenicity of ASO1 and ASO2 Adjuvanted RTS,S Malaria Vaccine Candidates in Children in Gabon. // *PLOS ONE*. 2009. Vol. 4, N10. P. e7611.
42. Lu J., Sun T., Wang D., et al. Protective immune responses elicited by fusion protein containing PsaA and PspA fragments. // *Immunological investigations*. 2015. Vol. 44, N5. P. 482–496.
43. Leroux-Roels I., Devaster J.M., Leroux-Roels G., et al. Adjuvant system ASO2V enhances humoral and cellular immune responses to pneumococcal protein PhtD vaccine in healthy young and older adults: randomised, controlled trials. // *Vaccine*. 2015. Vol. 33, N4. P. 577–584.
44. Pauksens K., Nilsson A.C., Caubet M., et al. Randomized controlled study of the safety and immunogenicity of pneumococcal vaccine formulations containing PhtD and detoxified pneumolysin with Alum or adjuvant system ASO2V in elderly adults. // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2014. Vol. 21, N5. P. 651–660.
45. Hsu C.-F., Hsiao C.-H., Tseng S.-F., et al. PrtA immunization fails to protect against pulmonary and invasive infection by *Streptococcus pneumoniae*. // *Respiratory Research*. 2018. Vol. 19, N1. P. 187.
46. Kuipers K., Daleke-Schermerhorn M.H., Jong W.S.P., et al. *Salmonella* outer membrane vesicles displaying high densities of pneumococcal antigen at the surface offer protection against colonization. // *Vaccine*. 2015. Vol. 33, N17. P. 2022–2029.
47. Lagousi T., Basdeki P., Routsias J., et al. Novel Protein-Based Pneumococcal Vaccines: Assessing the Use of Distinct Protein Fragments Instead of Full-Length Proteins as Vaccine Antigens. // *Vaccines*. 2019. Vol. 7, N1. P. 9.
48. Firdous J., Islam M.A., Park S.-M., et al. Induction of long-term immunity against respiratory syncytial virus glycoprotein by an osmotic polymeric nanocarrier. // *Acta Biomaterialia*. 2014. Vol. 10, N11. P. 4606–4617.
49. Kye Y.-C., Park S.-M., Shim B.-S., et al. Intranasal immunization with pneumococcal surface protein A in the presence of nanoparticle forming polysorbitol transporter adjuvant induces protective immunity against the *Streptococcus pneumoniae* infection. // *Acta Biomaterialia*. 2019. Vol. 90. P. 362–372.
50. Vela-Ramirez J.E., Goodman J.T., Boggiatto P.M., et al. Safety and biocompatibility of carbohydrate-functionalized polyanhydride nanoparticles. // *The AAPS Journal*. 2015. Vol. 17, N1. P. 256–267.
51. Ulery B.D., Petersen L.K., Phanse Y., et al. Rational design of pathogen-mimicking amphiphilic materials as nanoadjuvants. // *Scientific Reports*. 2011. Vol. 1, N1. P. 198.
52. Goodman J.T., Vela Ramirez J.E., Boggiatto P.M., et al. Nanoparticle chemistry and functionalization differentially regulates dendritic cell-nanoparticle interactions and triggers dendritic cell maturation. // *Part. Part. Syst. Charact.* 2014. Vol. 31, N12. P. 1269–1280.
53. Haughney S.L., Petersen L.K., Schoofs A.D., et al. Retention of structure, antigenicity, and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles. // *Acta Biomaterialia*. 2013. Vol. 9, N9. P. 8262–8271.
54. Kataoka K., Fukuyama Y., Briles D.E., et al. Review Dendritic cell-targeting DNA-based nasal adjuvants for protective mucosal immunity to *Streptococcus pneumoniae*. // *Microbiology and Immunology*. 2017. Vol. 61, N7. P. 195–205.
55. Kong I.G., Sato A., Yuki Y., et al. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. // *Infection and Immunity*. 2013. Vol. 81, N5. P. 1625–1634.
56. Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., et al. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques// *Mucosal immunology*. 2015. Vol. 8, N5. P. 1144–1153.
57. Kunda N.K., Alfagih I.M., Miyaji E.N., et al. Pulmonary dry powder vaccine of pneumococcal antigen loaded nanoparticles. // *International journal of pharmaceutics*. 2015. Vol. 495, N2. P.903–912.
58. Rodrigues T.C., Oliveira M.L.S., Soares-Schanoski A., et al. Mucosal immunization with PspA (Pneumococcal surface protein A)-adsorbed nanoparticles targeting the lungs for protection against pneumococcal infection. // *PLOS ONE*. 2018. Vol. 13, N1. P. e0191692.
59. Li B., Chen X., Yu J., et al. Protection elicited by nasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) adjuvanted with bacterium-like particles against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. // *Microbial Pathogenesis*. 2018. Vol. 123. P. 115–119.
60. Bosma T., Kanninga R., Neef J., et al. Novel surface display system for proteins on nongenetically modified gram-positive bacteria. // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72, N1. P.880–889.

- ## References

1. Semenova IB, Mikhailova NA. Serotype-independent vaccines against pneumococcal infection. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2016;4(1):76–85. (In Russ). doi: 10.36233/0372-9311-2016-4-76-85.
2. Petukhova ES, Vorobyev DS, Semenova IB. The role of proteins of *Streptococcus pneumoniae* in the development of serotype-independent pneumococcal vaccines. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2018;1(3):74–80. (In Russ). doi: 10.36233/0372-9311-2018-3-74-80.
3. Daniels C, Rogers D, Shelton C. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. 2016;21(1):27–35. doi: 10.5863/1551-6776-21.1.27.
4. Moffitt K, Malley R. Rationale and prospects for novel pneumococcal vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(2):383–392. doi: 10.1080/21645515.2015.1087625.
5. Pichichero M. Pneumococcal whole-cell and protein –based vaccines: Changing the paradigm. *Expert Review of Vaccines*. 2017;6(12):1181–1190. doi: 10.1080/14760584.2017.1393335.
6. Pichichero M, Khan N, Xu Q. Next generation protein based *Streptococcus pneumoniae* vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(1):194–205. doi: 10.1080/21645515.2015.1052198.
7. Principi N, Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2018;18(1):7–17. doi: 10.1080/14712598.2018.1384462.
8. Masomian M, Ahmad Z, Ti Gew L, et al. Development of Next Generation *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Conferring Broad Protection. *Vaccines* 2020;8(1):132. doi: 10.3390/vaccines8010132.
9. Wagner-Muniz DA, Haughey SL, Kelly SM, et al. Room Temperature Stable PspA-Based Nanovaccine Induces Protective Immunity. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9:325. doi: 10.3389/fimmu.2018.00325.
10. Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, et al. PspA Protects *Streptococcus pneumoniae* from Killing by Apolactoferrin, and Antibody to PspA Enhances Killing of Pneumococci by Apolactoferrin. *Infection and Immunity*. 2004;72(9):5031–5040. doi: 10.1128/iai.72.9.5031-5040.2004.
11. Daniels CC, Coan P, King J, et al. The proline-rich region of pneumococcal surface proteins A and C contains surface-accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody-mediated protection against sepsis. *Infection and Immunity*. 2010;78(5):2163–2172. doi: 10.1128/iai.01199-09.
12. Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: Mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 2000;68(10):5889–5900. doi: 10.1128/iai.68.10.5889-5900.2000.
13. Darrieux M, Moreno AT, Ferreira DM, et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57(3):273–278. doi: 10.1099/jmm.0.47661-0.
14. van Roosmalen ML, Kanninga R, El Khatib M, et al. Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods*. 2006;38(2):144–149. doi: 10.1016/j.meth.2005.09.015.
15. Nabors GS, Braun PA, Herrmann DJ, et al. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. *Vaccine*. 2000;18(17):1743–1754. doi: 10.1016/s0264-410x(99)00530-7.
16. Briles DE, Hollingshead SK, King J, et al. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;182(6):P.1694–1701. doi: 10.1086/317602.
17. Darrieux M, Miyaji EN, Ferreira DM, et al. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. *Infection and Immunity*. 2007;75(12):5930–5938. doi: 10.1128/iai.00940-07.
18. Kawaguchi Y, Urushibara N, Aung MS, et al. Genetic diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) in paediatric isolates of non-conjugate vaccine serotypes in Japan. *Journal of Medical Microbiology*. 2018;67(8):1130–1138. doi: 10.1099/jmm.0.000775.
19. Moreno AT, Oliveira MLS, Ferreira DM, et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010;17(3):439–446. doi: 10.1128/cvi.00430-09.
20. Akbari E, Negahdari B, Faraji F, et al. Protective responses of an engineered PspA recombinant antigen against *Streptococcus pneumoniae*. *Biotechnology Reports*. 2019;24:e00385. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00385.
21. da Silva MA, Converso TR, Goncalves VM, et al. Conjugation of PspA4Pro with capsular *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide serotype 14 does not reduce the induction of cross-reactive antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2017;24(8):e00118-17. doi: 10.1128/cvi.00118-17.
22. Feldman C, Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *Journal of Infection*. 2014;69(4):309–325. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.006.
23. Ren D, Almudevar AL, Pichichero ME. Synchrony in serum antibody response to conserved proteins of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015;11(2):489–497. doi: 10.4161/21645515.2014.990861.
24. Pichichero ME, Kaur R, Casey JR, et al. Antibody response to *Streptococcus pneumoniae* proteins PhtD, LytB, PcpA, PhtE and Ply after nasopharyngeal colonization and acute otitis media in children. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2012;8(6):799–805. doi: 10.4161/hv.19820.
25. Mann B, Thornton J, Heath R, et al. Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(7):1116–1125. doi: 10.1093/infdis/jit502.

26. Converso TR, Goulart C, Darrieux M, et al. A protein chimera including PspA in fusion with PhtD is protective against invasive pneumococcal infection and reduces nasopharyngeal colonization in mice. *Vaccine*. 2017;35(37):5140–5147. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.010
27. Chen A, Mann B, Gao G, et al. Multivalent pneumococcal protein vaccines comprising pneumolysin with epitopes/fragments of CbpA and/or PspA elicit strong and broad protection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2015;22(10):1079–1089. doi: 10.1128/CVI.00293-15
28. van Westen E, Poelen MCM, van den Dobbelsteen GPJM, et al. Immunodominance in T cell responses elicited against different domains of detoxified pneumolysin PlyD1. *PLOS ONE*. 2018;13(3):e0193650. doi: 10.1371/journal.pone.0193650
29. Zysk G, Bongaerts RJM, ten Thoren E, et al. Detection of 23 immunogenic pneumococcal proteins using convalescent-phase serum. *Infection and Immunity*. 2000;68(6):3740–3743. doi: 10.1128/iai.68.6.3740–3743.2000
30. Bethe G, Nau R, Wellmer A, et al. The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*. 2001;205(1):99–104. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10931.x
31. de Stoppelaar SF, Bootsma HJ, Zomer A, et al. *Streptococcus pneumoniae* serine protease HtrA, but not SFP or PrtA, is a major virulence factor in pneumonia. *PLOS ONE*. 2013;8(11):e80062. doi: 10.1371/journal.pone.0080062
32. Chen X, Li B, Yu J, et al. Comparison of four adjuvants revealed the strongest protection against lethal pneumococcal challenge following immunization with PsaA-PspA fusion protein and AS02 as adjuvant. *Medical Microbiology and Immunology*. 2019;208(2): 215–226. doi: 10.1007/s00430-019-00579-9
33. Khan S, Bijker MS, Weterings JJ, et al. Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(29):21145–21159. doi: 10.1074/jbc.M701705200
34. Moffitt K, Skoberne M, Howard A, et al. Toll-like receptor 2-dependent protection against pneumococcal carriage by immunization with lipidated pneumococcal proteins. *Infection and Immunity*. 2014;82(5):2079–2086. doi: 10.1128/iai.01632-13
35. Lee S, Nguyen MT. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Network*. 2015;15(2):51–57. doi: 10.4110/in.2015.15.2.51
36. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(3):799–808. doi: 10.1172/jci81083
37. Li P, Asokanathan C, Liu F, et al. PLGA nano/micro particles encapsulated with pertussis toxoid (PTd) enhances Th1/Th17 immune response in a murine model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;513(1–2):183–190. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.08.059
38. Wegmann F, Gartlan KH, Harandi AM, et al. Polyethyleneimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens. *Nature Biotechnology*. 2012;30(9):883–888. doi: 10.1038/nbt.2344
39. Jing Z-W, Jia Y-Y, Wan N, et al. Design and evaluation of novel pH-sensitive ureido-conjugated chitosan/TPP nanoparticles targeted to *Helicobacter pylori*. *Biomaterials*. 2016;84:276–285. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.045
40. Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin – a foe & a friend. *Indian J Med Res*. 2011;133(2):153–163.
41. Lell B, Agnandji S, von Glasenapp I, et al. A Randomized Trial Assessing the Safety and Immunogenicity of AS01 and AS02 Adjuvanted RTS,S Malaria Vaccine Candidates in Children in Gabon. *PLOS ONE*. 2009;4(10):e7611. doi: 10.1371/journal.pone.0007611
42. Lu J, Sun T, Wang D, et al. Protective immune responses elicited by fusion protein containing PsaA and PspA fragments. *Immunological investigations*. 2015;44(5):482–496. doi: 10.3109/08820139.2015.1037956
43. Leroux-Roels I, Devaster JM, Leroux-Roels G, et al. Adjuvant system AS02V enhances humoral and cellular immune responses to pneumococcal protein PhtD vaccine in healthy young and older adults: randomised, controlled trials. *Vaccine*. 2015;33(4):577–584. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.10.052
44. Pauksens K, Nilsson AC, Caubet M, et al. Randomized controlled study of the safety and immunogenicity of pneumococcal vaccine formulations containing PhtD and detoxified pneumolysin with Alum or adjuvant system AS02V in elderly adults. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2014;21(5):651–660. doi: 10.1128/cvi.00807-13
45. Hsu C-F, Hsiao C-H, Tseng S-F, et al. PrtA immunization fails to protect against pulmonary and invasive infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Respiratory Research*. 2018;19(1):187. doi: 10.1186/s12931-018-0895-8
46. Kuipers K, Daleke-Schermerhorn MH, Jong WSP, et al. *Salmonella* outer membrane vesicles displaying high densities of pneumococcal antigen at the surface offer protection against colonization. *Vaccine*. 2015;33(17):2022–2029. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.010
47. Lagousi T, Basdeki P, Routsias J, et al. Novel Protein-Based Pneumococcal Vaccines: Assessing the Use of Distinct Protein Fragments Instead of Full-Length Proteins as Vaccine Antigens. *Vaccines*. 2019;7(1):9. doi: 10.3390/vaccines7010009
48. Firdous J, Islam MA, Park S-M, et al. Induction of long-term immunity against respiratory syncytial virus glycoprotein by an osmotic polymeric nanocarrier. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(11):4606–4617. doi: 10.1016/j.actbio.2014.07.034
49. Kye Y-C, Park S-M, Shim B-S, et al. Intranasal immunization with pneumococcal surface protein A in the presence of nanoparticle forming polysorbital transporter adjuvant induces protective immunity against the *Streptococcus pneumoniae* infection. *Acta Biomaterialia*. 2019;90:362–372. doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.049
50. Vela-Ramirez JE, Goodman JT, Boggiatto PM, et al. Safety and biocompatibility of carbohydrate-functionalized polyanhydride nanoparticles. *The AAPS Journal*. 2015;17(1):256–267. doi: 10.1208/s12248-014-9699-z
51. Ulerý BD, Petersen LK, Phanse Y, et al. Rational design of pathogen-mimicking amphiphilic materials as nanoadjuvants. *Scientific Reports*. 2011;1(1):198. doi: 10.1038/srep00198
52. Goodman JT, Vela Ramirez JE, Boggiatto PM, et al. Nanoparticle chemistry and functionalization differentially regulates dendritic cell-nanoparticle interactions and triggers dendritic cell maturation. *Part Part Syst Charact*. 2014;31(12):1269–1280. doi: 10.1002/ppsc.201400148
53. Haughney SL, Petersen LK, Schoofs AD, et al. Retention of structure, antigenicity, and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(9):8262–8271. doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.006
54. Kataoka K, Fukuyama Y, Briles DE, et al. Review Dendritic cell-targeting DNA-based nasal adjuvants for protective mucosal immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology and Immunology*. 2017;61(7):195–205. doi: 10.1111/1348-0421.12487
55. Kong IG, Sato A, Yuki Y, et al. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 2013;81(5):1625–1634. doi: 10.1128/IAI.00240-13
56. Fukuyama Y, Yuki Y, Kataoka K, et al. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunology*. 2015;8(5):1144–1153. doi: 10.1038/mi.2015.5
57. Kunda NK, Alfigah IM, Miyaji EN, et al. Pulmonary dry powder vaccine of pneumococcal antigen loaded nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2015;495(2):903–912. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.09.034
58. Rodrigues TC, Oliveira MLS, Soares-Schanoski A, et al. Mucosal immunization with PspA (Pneumococcal surface protein A)-adsorbed nanoparticles targeting the lungs for protection against pneumococcal infection. *PLOS ONE*. 2018;13(1):e0191692. doi: 10.1371/journal.pone.0191692
59. Li B, Chen X, Yu J, et al. Protection elicited by nasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) adjuvanted with bacterium-like particles against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Microbial Pathogenesis*. 2018;123:115–119.
60. Bosma T, Kanninga R, Neef J, et al. Novel surface display system for proteins on nongenetically modified gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(1):880–889. doi: 10.1128/AEM.72.1.880-889.2006
61. Wang D, Lu J, Yu J, et al. A Novel PspA Protein Vaccine Intranasal Delivered by Bacterium-Like Particles Provides Broad Protection Against Pneumococcal Pneumonia in Mice. *Immunological Investigations*. 2018;47(4):403–415. doi: 10.1080/08820139.2018.1439505
62. Lu J, Guo J, Wang D, et al. Broad protective immune responses elicited by bacterium-like particle-based intranasal pneumococcal particle vaccine displaying PspA2 and PspA4 fragments. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2019;15(2):371–380. doi: 10.1080/21645515.2018.1526556
63. Lu J, Hou H, Wang D, et al. Systemic and mucosal immune responses elicited by intranasal immunization with a pneumococcal bacterium-like particle-based vaccine displaying pneumolysin mutant Plym2. *Immunology Letters*. 2017;187:41–46. doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.003
64. Kataoka K, Fujihashi K, Oma K, et al. The nasal dendritic cell-targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumonia. *Infection and Immunity*. 2011;79(7):2819–2828. doi: 10.1128/iai.01360-10
65. Fukuyama Y, King JD, Kataoka K, et al. A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG oligodeoxynucleotide as nasal adjuvant elicits protective secretory-IgA immunity to *Streptococcus pneumoniae* in aged mice. *The Journal of Immunology*. 2011;186(4):2454–2461. doi: 10.4049/jimmunol.1002837
66. Baatarjav T, Kataoka K, Gilbert RS, et al. Mucosal immune features to phosphorylcholine by nasal Flt3 ligand cDNA-based vaccination. *Vaccine*. 2011;29(34):5747–5757. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.097
67. Swaminathan A, Lucas RM, Dear K, et al. (2014) Keyhole limpet haemocyanin- a model antigen for human immunotoxicological studies. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2014;78(5):1135–1142. doi: 10.1111/bcp.1242
68. Chan W-Y, Entwistle C, Ercoli G, et al. A Novel, Multiple-Antigen Pneumococcal Vaccine Protects against Lethal *Streptococcus pneumoniae* Challenge. *Infection and Immunity*. 2019;87(3):e00846-18. doi: 10.1128/IAI.00846-18
69. Campos IB, Herd M, Moffitt KL, et al. IL-17A and Complement Contribute to Killing of Pneumococci Following Immunization With a Pneumococcal Whole Cell Vaccine. *Vaccine*. 2017;35(9):1306–1315. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.01.030
70. Entwistle C, Hill S, Pang Y, et al. Safety and immunogenicity of a novel multiple antigen pneumococcal vaccine in adults: a phase 1 randomised clinical trial. *Vaccine*. 2017;35(51):7181–7186. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.076
71. Rosch JW. Promises and pitfalls of live attenuated pneumococcal vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014;10(10):3000–3003. doi: 10.4161/21645515.2014.970496
72. Jang A-Y, Ahn KB, Zhi Y, et al. Serotype-Independent Protection Against Invasive Pneumococcal Infections Conferred by Live Vaccine With Igt Deletion. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1212. doi: 10.3389/fimmu.2019.01212

73. Arimoto T, Igarashi T. Role of lipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt) and lipoprotein-specific signal peptidase II (LspA) in localization and physiological function of lipoprotein MsmE in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008;23(6):515–519. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00455.x
74. Wichgers Schreur PJ, Rebel JMJ, Smits MA, et al. Lgt processing is an essential step in *Streptococcus suis* lipoprotein mediated innate immune activation. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22299. doi: 10.1371/journal.pone.0022299
75. Tomlinson G, Chimalapati S, Pollard T, et al. TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. *The Journal of Immunology*. 2014;193(7):3736–3745. doi: 10.4049/jimmunol.1401413
76. Michaelsen TE, Kolberg J, Aase A, et al. The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2004;59(1):34–39. doi: 10.1111/j.0300-9475.2004.01362.x
77. Wu F, Yao R, Wang H, et al. Mucosal and systemic immunization with a novel attenuated pneumococcal vaccine candidate confers serotype independent protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Vaccine*. 2014;32(33):4179–4188. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.019
78. Xu X, Wang H, Liu Y, et al. Mucosal immunization with the live attenuated vaccine SPY1 induces humoral and Th2-Th17-regulatory T cell cellular immunity and protects against pneumococcal infection. *Infection and Immunity*. 2015;83(1):90–100. doi: 10.1128/IAI.02334-14
79. Zhang X, Cui J, Wu Y, et al. *Streptococcus pneumoniae* Attenuated Strain SPY1 with an Artificial Mineral Shell Induces Humoral and Th17 Cellular Immunity and Protects Mice against Pneumococcal Infection. *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8. P.1983.
80. Wang G, Cao R-Y, Chen R, et al. Rational design of thermostable vaccines by engineered peptide-induced virus self-biomineralization under physiological conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(19):7619–7624. doi: 10.1073/pnas.1300233110.

Об авторах

- **Ирина Мироновна Грубер** – д. м. н., профессор, заведующая лабораторией экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Малый Казённый переулок, 5А. +7 (495) 916-20-47, igruber_instmech@mail.ru.
- **Ольга Максимовна Кукина** – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Малый Казённый переулок, 5А. +7 (495) 916-20-47, kukina1994@mail.ru. 0000-0003-0875-4141.
- **Надежда Борисовна Егорова** – д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Малый Казённый переулок, 5А. +7 (903) 552-14-73, vmegorova@mail.ru.
- **Ольга Валерьевна Жигунова** – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Малый Казённый переулок, 5А. +7 (495) 916-20-47, kileva@mail.ru.

Поступила: 08.09.2020. Принята к печати: 22.01.2021.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Irina M. Gruber** – Dr. Sci (Med), professor Head of the Laboratory of Experimental Microbiology Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Malyy Kazonnyy pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (495) 916-20-47, igruber_instmech@mail.ru.
- **Olga M. Kukina** – junior researcher of the Laboratory of Experimental Microbiology Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Malyy Kazonnyy pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (495) 916-20-47, kukina1994@mail.ru. 0000-0003-0875-4141.
- **Nadezhda B. Egorova** – Dr. Sci (Med), professor, Honored Scientist of the Russian Federation, leading researcher of Laboratory Therapeutic Vaccines Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Malyy Kazonnyy pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (903) 552-14-73, vmegorova@mail.ru.
- **Olga V. Zhigunova** – junior researcher of the Laboratory of Experimental Microbiology Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Malyy Kazonnyy pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (495) 916-20-47, kileva@mail.ru.

Received: 08.09.2020. Accepted: 22.01.2021.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

ИНФОРМАЦИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Создание сотрудничающего центра ВОЗ на базе Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

Пресс-релиз от 20 Февраля 2021 г.

Сотрудничающий центр ВОЗ – это учреждение, назначенное Генеральным директором ВОЗ в качестве одного из звеньев международной сотрудничающей сети, проводящей мероприятия в поддержку программ ВОЗ на всех уровнях.

Сотрудничающие центры ВОЗ принимают участие в деятельности, основываясь на плане работы, подготовленном Центром совместно с ВОЗ в соответствии с его правилами. Мероприятия могут осуществляться на национальном, межрегиональном, региональном, межрегиональном и глобальном уровнях.

В Российской Федерации более 20 сотрудничающих центров ВОЗ, выполняющих различные функции.

Институт «Микроб» уже на протяжении ряда лет (с 2015 г.) является ведущим исполнителем по реализации при поддержке Правительства Российской Федерации ряда программ оказания материально-технической и научно-методического содействия странам-партнерам России по противодействию инфекционным болезням и наращиванию национального потенциала реагирования на угрозы в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера.

Основными направлениями взаимодействия с участием РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора являются оказание материально-технической поддержки странам-партнерам за счет поставок мобильных лабораторий, питательных сред, диагностических препаратов и расходных материалов; проведение совместных работ по эпизоотологическому обследованию природно-очаговых территорий, выполнение совместных НИР, подготовка специалистов и проведение совместных учений. Взаимодействие осуществляется со странами СНГ, а также с Монголией, Китаем, Вьетнамом,

Гвинеи, Гвинеи-Бисау, Демократической Республикой Конго.

Институт с 2018 г. осуществляет взаимодействие с ВОЗ и GOARN (Глобальная сеть предупреждения о вспышках болезней и ответных действий) по вопросу стандартизации мобильных лабораторий.

Основная задача Центра – повышение готовности стран к реагированию на угрозы биологического характера, в том числе эпидемий и пандемий инфекционных болезней.

Совокупность исторического опыта санитарно-эпидемиологической службы России по организации масштабных противозидемических мероприятий, обеспечения биологической безопасности и современные технологии в области создания новых средств диагностики и профилактики, математического моделирования с целью прогнозирования эпидемиологической ситуации позволяют обеспечивать эффективное проведение мероприятий, направленных на сдерживание эпидемического распространения COVID-19 в Российской Федерации, что позволило избежать введения в России масштабных локдаунов в осенне-зимний период 2020–2021 гг.

Практический опыт и новые научные знания, полученные в ходе борьбы с пандемией, несомненно, требуют осмысления и серьезного анализа. Но уже очевидно то, что человечество должно быть готово к таким вызовам. И для этого надо укреплять все компоненты системы реагирования на них, включая развитие научных исследований и повышать эффективность международного сотрудничества в сфере оперативного ответа на подобные угрозы.

Источник: <https://www.rosпотребнадзор.ru>