

Мукозальные вакцины против бактериальных и вирусных патогенов (обзор проблем при создании рекомбинантной пробиотической мукозальной вакцины)

А. Н. Суворов*, Т. А. Крамская, Т. В. Гупалова, Ю. А. Дешева, Г. Ф. Леонтьева

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Резюме

Слизистые оболочки человеческого организма играют важнейшую роль в развитии, поддержании и регуляции барьерных функций и иммунного гомеостаза, являясь неотъемлемой составляющей общей системы иммунитета. Мукозальные вакцины запускают иммунные процессы в лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками организма. Важной задачей мукозальной иммунизации является выбор вектора доставки антигена, который может обеспечить эффективность вакцинации. Авторы статьи на протяжении многих лет исследуют пробиотические свойства энтерококков. В качестве вектора доставки вакцинных антигенов используется безопасный и полезный для организма штамм пробиотика *Enterococcus faecium* L3. Первоначально в геном пробиотического штамма *E. faecium* L3 был успешно введен ген, кодирующий белок Bac, – фактор патогенности стрептококков группы В (*Streptococcus agalactiae*). Было установлено, что при интравагинальном, пероральном и интраназальном способах мукозальной иммунизации пробиотиком L3-Bac+, экспрессирующим антигенные детерминанты патогенных стрептококков, у лабораторных животных формируется защита от бактериальной инфекции. Впоследствии комбинантные технологии были усовершенствованы, и разработан универсальный способ включения участка гена интереса в структуру гена основного белка пилей *E. faecium* L3. К настоящему времени на базе данной технологии были получены и протестированы кандидатные вакцины против возбудителей различных инфекций: *Streptococcus pneumoniae*, вируса гриппа А, а после возникновения пандемии Covid-19 – кандидатные вакцины против SARS-Cov-2. В работе одновременно с представлением собственных данных обсуждаются проблемы применения рекомбинантных пробиотических бактерий в качестве вектора доставки вакцинных антигенов.

Ключевые слова: мукозальные вакцины, рекомбинантные штаммы, пробиотики, *E. faecium* L3, бактериальные инфекции, вирусные инфекции, профилактика

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Суворов А. Н., Крамская Т. А., Гупалова Т. В. и др. Мукозальные вакцины против бактериальных и вирусных патогенов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2023;22(4):4-11. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-4-4-11>

Mucosal Vaccines against Bacterial and Viral Pathogens

AN Suvorov, TA Kramskaya, TV Gupalova, YuA Desheva, GF Leontieva

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine», St-Petersburg

Abstract

The mucosal membranes of the human body play a crucial role in the development, maintenance, and regulation of barrier functions and immune homeostasis, representing an integral component of the overall immune system. Mucosal vaccines elicit immune processes in the lymphoid tissue associated with the mucosal membranes. A critical objective of mucosal immunization is the identification of an antigen delivery vector capable of ensuring optimal vaccine efficacy. The authors of this article have conducted extensive research on the probiotic properties of enterococci over an extended period. They employ a safe and beneficial probiotic strain, *Enterococcus faecium* L3, as a delivery vector for vaccine antigens. Initially, the gene encoding the pathogenicity factor Bac, derived from group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*), was successfully integrated into the genome of the probiotic strain *E. faecium* L3. Intravaginal, oral, and intranasal mucosal immunization methods utilizing the L3-Bac+ probiotic, which expresses antigenic determinants of pathogenic streptococci, were found to confer protection against bacterial infection in laboratory animals. Subsequently, recombinant technologies were refined, leading to the development of a universal method for incorporating a region of interest from the gene into the structure of the major pili protein gene of *E. faecium* L3. Using this technology, candidate vaccines against various infections, including *Streptococcus pneumoniae*, influenza A virus, and SARS-CoV-2 following the onset of the Covid-

* Для переписки: Суворов Александр Николаевич, д. м. н., чл.-корр. РАН, руководитель отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ», 197376, Санкт-Петербург, ул. ак. Павлова, 12. +7(921) 934-28-12, alexander_suvorov1@hotmail.com. ©Суворов А. Н. и др.

** For correspondence: Suvorov Alexander N., Dr. Sci. (Med.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Molecular Microbiology, Federal State Budgetary Scientific Institution "IEM", 12, ak. Pavlov str., St-Petersburg, 197376, Russia. +7 (921) 934-28-12, alexander_suvorov1@hotmail.com. ©Suvorov AN, et al.

19 pandemic, have been obtained and tested. In this study, alongside the presentation of our own data, the challenges associated with utilizing recombinant probiotic bacteria as vectors for vaccine antigen delivery are discussed.

Keywords: mucosal vaccines, recombinant strains, probiotics, *E. faecium* L3, bacterial infections, viral infections, prevention
No conflict of interest to declare.

For citation: Suvorov AN**, Kramskaya TA, Gupalova TV, et al. Mucosal vaccines against bacterial and viral pathogens. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2023;22(4):4-11 (In Russ.). <https://doi:10.31631/2073-3046-2023-22-4-4-11>

Вакцинная профилактика является одним из наиболее эффективных способов защиты от инфекционных заболеваний и их распространения [1]. Современные вакцинные препараты, входящие в Национальный календарь профилактических прививок, преимущественно представляют собой ослабленные или инактивированные патогены (бактериальные или вирусные), измененные токсины, комплексы рекомбинантных белков, очищенные субъединичные структуры патогенов. Введение вакцинных антигенов в организм осуществляется практически всегда инъекционным путем, причём в состав вакцины входят дополнительные вещества с адъювантными или стабилизирующими свойствами.

Ключевым индикатором эффективного иммунного ответа на вакцинацию служит высокий уровень специфических иммуноглобулинов в крови [3–5]. Такой подход с некоторыми вариациями успешно используется при оценке вакцин во всех странах мира.

Общепринятый парентеральный путь вакцинации стимулирует преимущественно системный иммунный ответ. Введенный подкожно или внутримышечно вакцинный антиген инициирует воспалительную реакцию в месте укола, быстро всасывается, попадает в кровь и прямо взаимодействует с иммунными клетками, что обеспечивает развитие системной реакции. Для усиления адаптивного иммунного ответа и формирования иммунологической памяти в состав вакцинных препаратов специально добавляют адъюванты, относительно безопасные для человеческого организма [6]. Успешная, с точки зрения целей вакцинации, системная иммунная реакция может сопровождаться появлением сопутствующих осложнений, связанных с развитием естественной скоординированной реакции организма на энергичное проникновение чужеродных факторов. Системный иммунный ответ, необходимый для борьбы с инфекцией и формирования иммунологической памяти, в некоторых случаях может вызывать такие неблагоприятные последствия, как температурная реакция, шок, нарушения в работе сердечно-сосудистой системы или другие серьёзные осложнения, когда может потребоваться медицинское вмешательство с применением противовоспалительных или иммуномодулирующих препаратов [7–9].

Роль первой преграды на пути подавляющего большинства патогенных микроорганизмов играет

слизистая оболочка, состояние которой определяет возможность инициации инфекционного процесса [10]. Иммунная система слизистых оболочек организма играет огромную роль в развитии, поддержании и регуляции иммунного гомеостаза, являясь важной составляющей многокомпонентной системы иммунитета. Показано, что отделы слизистой оболочки разных систем организма тесно взаимодействуют между собой. Особенно тесно такая взаимосвязь осуществляется между пищеварительным и респираторным трактами. Показано, что после нанесения вакцинного препарата на слизистую оболочку определенного органа иммунные реакции возникают на слизистых оболочках других органов [11].

В арсенале современных профилактических средств имеется ряд лицензированных вакцинных препаратов, вводимых на слизистые оболочки, то есть неинъекционным способом. В настоящее время зарегистрировано девять мукозальных вакцин (против холеры, тифа, полиомиелита, ротавируса, гриппа, аденовируса), которые, за исключением назальной гриппозной вакцины, предполагают пероральный путь введения [12].

При пероральном пути вакцинации происходит стимуляция как местного, так и системного иммунного ответа. Пероральные вакцины вводятся неинвазивно, что является несомненным преимуществом и делает их особенно подходящими для крупномасштабных кампаний по иммунизации, особенно в районах с ограниченными ресурсами, где доступ к медицинским работникам и стерильному инъекционному инструментарию может быть ограничен. Пероральные вакцины могут быть стабильными при комнатной температуре или в холодильнике, что упрощает их хранение и распределение. Устранение необходимости в инъекционных иглах снижает риск травм и инфекций, передающихся через кровь.

Чужеродные, в том числе вакцинные, антигены проходят путь от ротовой полости до просвета кишечника, постепенно проникая через эпителиальный барьер слизистой оболочки к лимфоидной ткани с помощью дендритных клеток и макрофагов, а в кишечнике преимущественно посредством специализированных эпителиальных М-клеток [13]. После прохождения эпителиального барьера антигены встречаются с компактно расположенными специализированными клетками иммунной системы (дендритными клетками, макрофагами, Т-лимфоцитами разных классов и В-лимфоцитами).

Лимфоидная ткань пищеварительного тракта организована в структуры Пейеровых бляшек, брыжеечных лимфатических узлов, лимфоидных фолликулов аппендикса, миндалин ротовой полости, в скопление лимфоидных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки. Различные не структурированные в виде лимфоидной ткани иммунные клетки, включая лимфоциты и дендритные клетки, рассеяны по всему кишечнику [14].

Серьёзным ограничением при создании эффективных пероральных вакцин является быстрое разрушение вакцинных антигенов под воздействием слюны, желудочного сока, желчи и кишечных ферментов. Это обстоятельство обусловило появление многочисленных экспериментальных разработок систем доставки вакцинных антигенов, включая нано- и микрочастицы [15].

Проблему эффективной доставки вакцинного антигена к иммунным клеткам кишечника можно решить путем использования пробиотических бактерий, устойчивых к воздействию указанных факторов. Безопасность многих пробиотиков хорошо исследована. Пробиотические микроорганизмы способны сохранять жизнеспособность после прохождения желудочного барьера, улучшают межэпителиальные связи слизистой оболочки ЖКТ, а также могут генерировать ряд поверхностных структур, усиливающих эффективность вакцинации. В качестве пробиотических векторов для вакцинации используются штаммы, в состав которых внесены генетические конструкции (обычно плазмидные), обеспечивающие экспрессию антигенов патогенных микроорганизмов [16–18]. Следует отметить, что преимущество плазмид, содержащих в своей структуре гены патогенов, состоит в вероятном увеличении дозы целевых генов за счет мультикопийности плазмидных векторов. Недостатком плазмидных конструкций является их невысокая стабильность в клетке бактерии.

В отделе молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ» более двадцати лет проводятся исследования роли пробиотических микроорганизмов в микроэкологии человека, а также разрабатываются разнообразные вакцинные препараты против бактериальных и вирусных инфекций.

Разработка вакцинных препаратов для профилактики инфекционных заболеваний первоначально шла в направлении создания рекомбинантных полипептидных вакцин.

Было показано, что поверхностные белки стрептококков группы В (СГВ) могут служить компонентами вакцины, эффективной против СГВ-инфекции [19]. Методами генной инженерии были созданы рекомбинантные конструкции, соответствующие иммуногенным участкам ряда стрептококковых поверхностных белков *S. pneumoniae* [20].

Рекомбинантные белки в качестве вакцинных препаратов оказались более эффективными при парентеральном введении лабораторным животным и в меньшей степени подходили для

мукозальной иммунизации, вероятно, в связи с быстрой элиминацией в результате протеолиза. Возникла необходимость поиска оригинальных способов аппликации вакцинных рекомбинантных белков. Было решено в качестве векторов для мукозальной иммунизации использовать безопасные и полезные для организма штаммы пробиотиков.

Вакцинные препараты с применением пробиотических векторов (преимущественно на основе лактобактерий) разрабатываются в мировой практике уже некоторое время и в лабораторных условиях доказали свою эффективность [21]. Чаще всего для введения вакцинных генов в пробиотическую бактерию используются автономно реплицирующиеся плазмиды. Именно это обстоятельство является определённым ограничением для универсального применения этого подхода при конструировании рекомбинантных пробиотических мукозальных вакцин. Плазмидные конструкции при всем удобстве генетического манипулирования имеют ряд недостатков, связанных с трудностью определения дозы гена и степени стабильности вакцинных штаммов. Для преодоления указанных ограничений нами была использована технология инсерционного мутагенеза, позволяющая вводить гены интереса непосредственно в бактериальную хромосому.

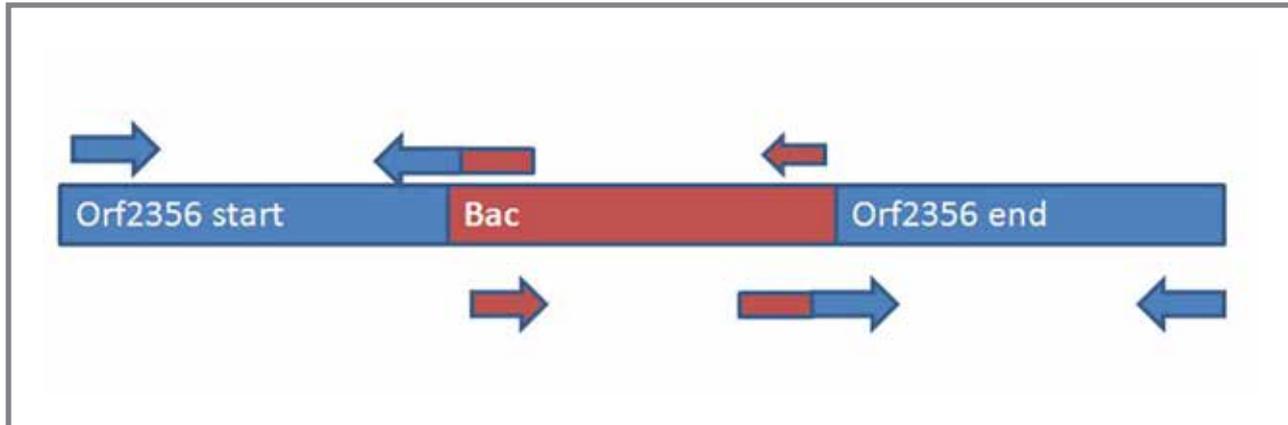
Первая полученная на основании этого подхода конструкция представляла собой вакцинный штамм пробиотика, специфичный в отношении белка Вас-фактора патогенности *S. agalactiae* (СГВ).

В качестве бактерии-реципиента был использован хорошо изученный пробиотический штамм *Enterococcus faecium* L3, обладающий целым рядом уникальных свойств. Штамм *E. faecium* L3 обладает выраженной антагонистической активностью в отношении целого ряда патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий, способностью восстанавливать микробиоценоз кишечника на фоне воздействия антибиотиков на организм хозяина [22].

Геном штамма *E. faecium* L3 был нами просеквенирован, а генетическая карта бактериальной хромосомы была проанализирована с целью получения данных генетического кодирования его поверхностных белков и антимикробных пептидов [23]. Для создания первого авторского рекомбинантного штамма пробиотика со стабильной вставкой участка гена *bas*, кодирующего белок Вас, отвечающий за неиммунное связывание иммуноглобулинов класса А, был определен ген пробиотического штамма, пригодный для встройки вакцинного гена.

По результатам биоинформационного анализа в геноме был выбран участок кодирования поверхностного белка *orf2356* с предполагаемой функцией адгезина. Данный белок обладает участком с консервативной последовательностью LPxTG, ответственной за «пришивание» С-терминальной области белка к структуре пептидогликана бактерии

Рисунок 1. Генетическая конструкция для встройки гена *Vac* в область кодирования гена *orf2356*. Стрелками обозначены ДНК-праймеры, использованные для получения химерной генетической конструкции
Figure 1. Scheme of insertion of the *Vac* gene into the coding region of the *orf2356* gene. Arrows indicate the DNA primers used to obtain the chimeric genetic construct



Примечание: *Orf* – открытая рамка считывания ДНК, *Vac* – ген, кодирующий бета С-белок стрептококков.
 Note: *Orf* is an open reading frame of DNA, *Vac* is a gene encoding beta C-protein of streptococci.

[24], что указывает на его поверхностную локализацию.

Задача была решена путём замены центрального участка кодирования *orf2356* участком гена стрептококкового белка *Vac* при сохранении открытой рамки считывания. В результате проведенных манипуляций в геном пробиотического штамма *E. faecium* L3 был успешно введён участок гена, кодирующего фактор патогенности стрептококков группы В – белок *Vac* (рис. 1).

Рекомбинантный штамм пробиотика получил наименование *E. faecium* L3 *Vac*+. При дальнейшем исследовании его иммуногенных и протективных свойств на модели экспериментальных мышей был сделан вывод о том, что при различных способах мукозальной иммунизации пробиотиком, экспрессирующим антигенные детерминанты патогенного стрептококка, удаётся достигнуть успешной защиты от гомологичного варианта СГВ [25].

Иммуногенные свойства вакцинного штамма *E. faecium* L3-*Vac*+ были исследованы при трёх способах введения – вагинальном, интраназальном и пероральном. Все три способа мукозальной вакцинации модифицированным пробиотиком стимулировали местный секреторный и системный специфический гуморальный иммунные ответы. У мышей, получавших *E. faecium* L3-*Vac*+, в крови, вагинальных, назальных и оральных смывах обнаруживали прирост *Vac*-специфических антител (IgA и IgG) в процессе иммунизации, что свидетельствовало о развитии реакций местного и системного иммунных ответов. Для оценки протективной эффективности сформированного иммунного ответа проводили сравнение устойчивости контрольных и вакцинированных мышей к интравагинальному, внутрибрюшному или интраназальному инфицированию штаммом Н36 (1bc) СГВ, несущим в своем геноме ген белка *Vac*. Заражение животных проводили примерно через 10–14 дней после

окончания курса вакцинации. Критерием оценки служила скорость очищения животных от бактерий. Установлено, что у иммунных животных выведение возбудителя из организма происходило быстрее, чем у неиммунных мышей (рис. 2).

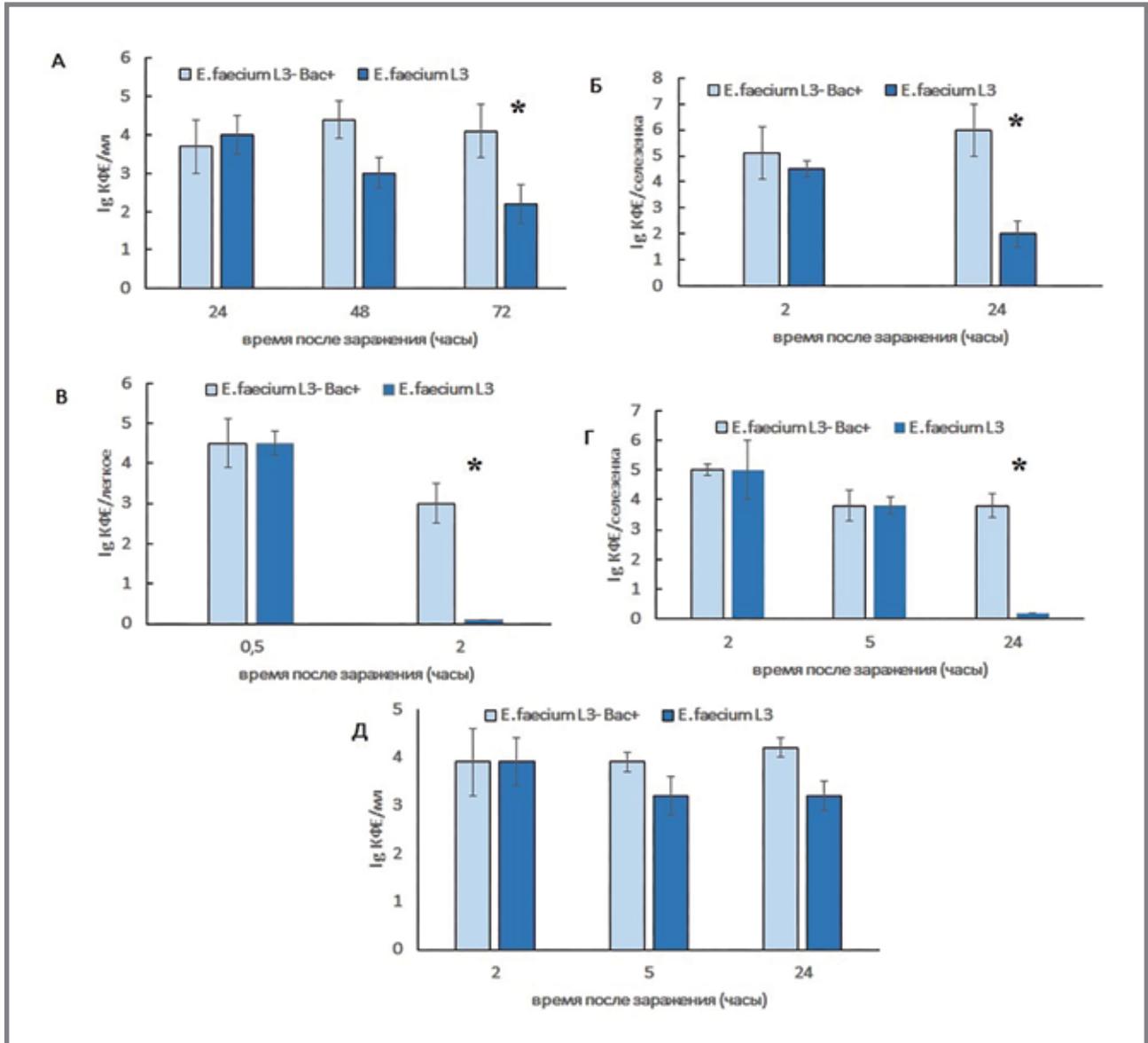
У животных, вагинально иммунизированных живой пробиотической вакциной, наблюдалось ускоренное, по сравнению с контролем, снижение концентрации СГВ в вагинальных смывах через 72 часа после вагинального заражения (рис. 2 А).

После пероральной вакцинации уже через 24 часа после внутрибрюшного заражения зарегистрировано значительное очищение иммунных мышей от СГВ, тогда как в селезёнке контрольных мышей наблюдался прирост бактерий (рис. 2 Б).

Закономерность ускоренного очищения от возбудителя при трёх вариантах заражения СГВ наблюдалась у мышей, иммунизированных интраназально. Через 2 часа после интраназального (рис. 2 В) и 24 часа после внутрибрюшного (рис. 2. Г) заражения в лёгких и селезёнках иммунных мышей стрептококк отсутствовал, тогда как из тканей контрольных животных в течение 24 часов его выделяли в значительных количествах. После интравагинального заражения в смывах вагинальной полости иммунных мышей через 5 и 24 часа также обнаруживали достоверно меньшее количество СГВ по сравнению с контролем (рис. 2 Д).

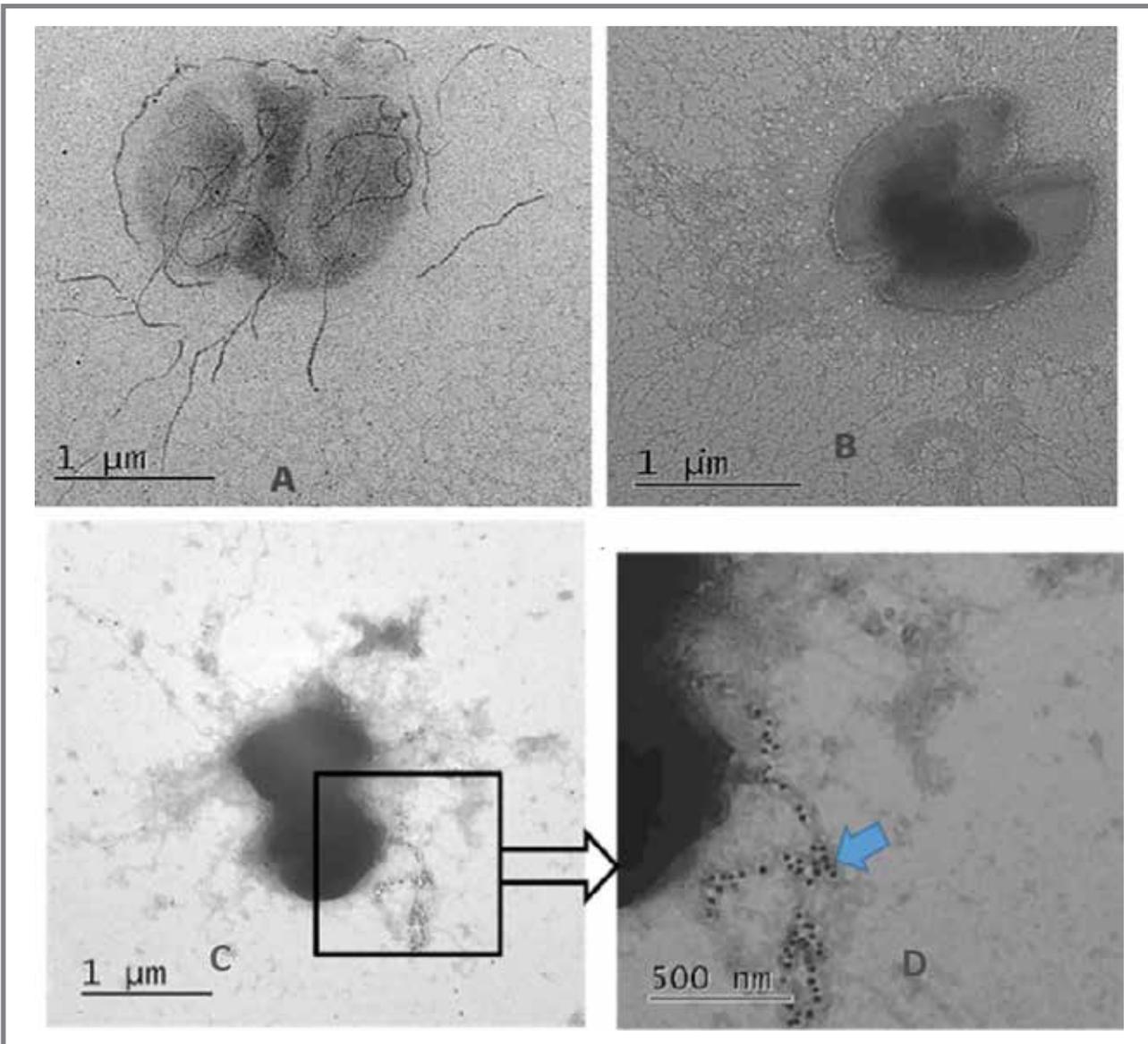
Полученные результаты позволили заключить, что использованный способ генетической модификации пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3 обеспечивал экспрессию белка СГВ штаммом энтерококка, причем рекомбинантный белок вызывал индукцию специфического иммунного ответа, способного ограничивать развитие СГВ-инфекции у мышей. Данное исследование иллюстрировало успешный пример создания живой вакцины для профилактики СГВ-инфекций.

Рисунок 2. Оценка СГВ инфекции на различных стадиях инфекционного процесса у мышей, вакцинированных вагинально, перорально и интраназально живой мукозальной пробиотической вакциной *E. faecium* L3-Bac+
Figure 2. Evaluation of different stages of GBS infection in mice vaccinated vaginally, orally, and intranasally with live mucosal probiotic vaccine *E. faecium* L3-Bac+



Примечание: (А) Мыши Balb/c вакцинированы вагинально в 1, 2, 3, 4 и 5 дни эксперимента путем введения *E. faecium* L3-Bac+ в вагинальную полость в дозе 2×10^7 КФЕ/мышь. Через 14 дней после последней вакцинации мышей заражали вагинально СГВ штамм H36 (1bc) в дозе 109 КФЕ / мышь. Анализировали концентрацию СГВ в вагинальных смывах через 24, 48 и 72 часа от начала инфекции. (Б) Мыши Balb/c вакцинированы перорально в 1, 2, 3, 6, 7, 22, 23 и 24 день эксперимента путем введения *E. faecium* L3-Bac+ в питьевую воду. Расчетная доза вакцинации 2×10^8 КФЕ/мышь. Через 14 дней после последней вакцинации мышей заражали внутрибрюшинно СГВ штамм H36 (1bc) в дозе 5×10^6 КФЕ/мышь. Анализировали содержание СГВ в селезенке через 2 и 24 часа от начала инфекции. (В–Д) Мыши Balb/c вакцинированы интраназально в 1, 2, 21, 22, 42 и 43 день эксперимента путем введения *E. faecium* L3-Bac+ в дозе $1,5 \times 10^8$ КФЕ / мышь. Через 10 дней после последней вакцинации мышей заражали интраназально (В), внутрибрюшинно (Г) и вагинально (Д) СГВ штамм H36 (1bc) в дозе $1,5 \times 10^8$ КФЕ / мышь, 5×10^6 КФЕ/мышь и 10^9 КФЕ / мышь, соответственно. Анализировали содержание СГВ в легких, селезенке и вагинальных смывах. В качестве контроля использованы мыши, получавшие исходный вариант *E. faecium* L3 по аналогичной для каждой постановки схеме. Каждая точка на диаграммах представляет собой среднее значение из 10 измерений. Данные обрабатывали с помощью программы Statistica версии 8.0. (СтатСофт, США). Средние значения и стандартные ошибки средних были рассчитаны для представления количества бактерий. Тест ANOVA использовался для сравнения двух независимых групп. * $p < 0,05$ – уровень статистической значимости выявленных различий.
 Note: (A) Balb/c mice were vaccinated vaginally on days 1, 2, 3, 4 and 5 of the experiment by injecting *E. faecium* L3-Bac+ into the vaginal cavity at a dose of 2×10^7 CFU/mouse. On day 14 after the end of vaccination, mice were infected vaginally with GBS strain H36 (1bc) at a dose of 109 CFU/mouse. The concentration of GBS in vaginal washings was analyzed at 24, 48 and 72 hours from the onset of infection. (B) Balb/c mice were vaccinated orally on days 1, 2, 3, 6, 7, 22, 23 and 24 of the experiment by introducing *E. faecium* L3-Bac+ into the drinking water. Estimated vaccination dose 2×10^8 CFU/mouse. On day 14 after the end of vaccination, mice were challenged intraperitoneally with GBS strain H36 (1bc) at a dose of 5×10^6 CFU/mouse. The GBS content in the spleen was analyzed 2 and 24 hours after the onset of infection. V-D Balb/c mice were vaccinated intranasally on days 1, 2, 21, 22, 42 and 43 of the experiment by injecting *E. faecium* L3-Bac+ at a dose of 1.5×10^8 CFU/mouse. On day 10 after the end of vaccination, mice were infected intranasally (B), intraperitoneally (Г) and vaginally (D) with GBS strain H36 (1bc) at a dose of 1.5×10^8 CFU/mouse, 5×10^6 CFU/mouse and 109 CFU/mouse, respectively. The load of GBS in the lungs, spleen and vaginal lavages was assessed. Mice treated with the original version of *E. faecium* L3 according to the same scheme for each setting were used as controls. Each point in the charts represents the average of 10 measurements. Data was processed using Statistica software, version 8.0. (StatSoft, USA). Means and standard errors of the means were calculated to represent bacterial number. ANOVA test was used to compare two independent groups. The p -value(s) <0.05 were considered to be statistically significant.

Рисунок 3. Иммуноэлектронная микроскопия структуры пилей вакцинных штаммов *E. faecium* L3, экспрессирующих вирусные белки
Figure 3. Immunoelectron microscopy of pilus structures in *E. faecium* L3 vaccine strains expressing viral proteins



Примечание: (A) *E. faecium* L3, экспрессирующий шиповидный белок S коронавируса; (B) исходный *E. faecium* L3; (C-D) *E. faecium* L3, экспрессирующий NA вируса гриппа А. (A-C) - увеличение 60 000×; (D) увеличение в 90 000 раз. Образцы обрабатывали первичными антителами к вирусным белкам S или NA и далее вторичными козьими антителами против IgG человека, конъюгированными с золотом. Изображения на рисунке были представлены в оригинальных статьях: (A-B) Suvorov A, Gupalova T, Desheva Y, et al. Construction of the Enterococcal Strain Expressing Immunogenic Fragment of SARS-Cov-2 Virus. *Front Pharmacol.* 2022;12:807256. Published 2022 Jan 5. doi:10.3389/fphar.2021.807256. (C-D) Desheva Y, Leontieva G, Kramskaya T, et al. Developing a Live Probiotic Vaccine Based on the Enterococcus faecium L3 Strain Expressing Influenza Neuraminidase. *Microorganisms.* 2021;9(12):2446. Published 2021 Nov 27. doi:10.3390/microorganisms9122446

Note: (A) *E. faecium* L3 expressing the spike protein S of coronavirus; (B) wild-type *E. faecium* L3; (C-D) *E. faecium* L3 expressing the NA protein of influenza A virus. (A-C) – magnification of 60,000×; (D) – magnification of 90,000×. Samples were processed with primary antibodies against viral proteins S or NA, followed by secondary goat anti-human IgG antibodies conjugated with gold. The images in the figure were presented in the original articles: (A-B) Suvorov A, Gupalova T, Desheva Y, et al. Construction of the Enterococcal Strain Expressing Immunogenic Fragment of SARS-Cov-2 Virus. *Front Pharmacol.* 2022;12:807256. Published 2022 Jan 5. doi:10.3389/fphar.2021.807256. (C-D) Desheva Y, Leontieva G, Kramskaya T, et al. Developing a Live Probiotic Vaccine Based on the Enterococcus faecium L3 Strain Expressing Influenza Neuraminidase. *Microorganisms.* 2021;9(12):2446. Published 2021 Nov 27. doi:10.3390/microorganisms9122446

Для увеличения количества копий вакцинного белка, экспрессируемого пробиотической бактериальной клеткой, был разработан способ включения гена целевого белка в структуру одного из пилевых белков пробиотической бактерии *E. faecium* L3-белка EbrC.

Структурный белок пилей EbrC энтерококков образует полимерные цепи в координации с белками, кодируемыми ebr опероном. В результате

их взаимодействия осуществляется сборка, секреция и прикрепление к поверхности энтерококка длинных множественных нитей, отвечающих за адгезию, формирование биоплёнок и колонизацию, существенно отстоящих от клеточной стенки и легко доступных иммунной системе хозяина [26].

Результатом цикла исследований стала разработка технологической платформы для создания широкого круга живых вакцин разнообразной

специфичности на основе предложенного пробиотического штамма *E. faecium* L3. С помощью электронной иммуномикроскопии (рис. 3) было показано, что встроенные белки патогенных микроорганизмов локализуются на поверхности энтерококка в составе микрофибрилл-пилей [27,28]. Это доказывает, что основной белок пилей, модифицированный чужеродным белком, процессируется в энтерококке и выводится на поверхность бактерии.

К настоящему времени на основе данной технологии были разработаны и протестированы кандидатные вакцины против возбудителей различных инфекций: *Streptococcus pneumoniae* [29], вируса гриппа А [27,30], а после возникновения пандемии Covid-19 – кандидатные вакцины против SARS-Cov-2 [28].

Исследование всех сконструированных с помощью авторского метода пробиотических вакцинных препаратов показало, что встроенные в геном *E. faecium* L3 фрагменты генов патогенных бактерий и вирусов способны обеспечивать формирование специфического системного и секреторного иммунного ответов после перорального введения экспериментальным животным. Вакцинированные животные приобретают повышенную устойчивость к инфицированию гомологичным возбудителем по сравнению с невакцинированным контролем.

Несмотря на то, что пандемия SARS-CoV-2 объявлена завершённой, остаются многочисленные медицинские проблемы, связанные с её последствиями. Переведённый в разряд возбудителей сезонных инфекций, коронавирус не потерял своей опасности для населения. Проблема сохранения коллективного иммунитета в условиях генетической изменчивости вируса неизбежно потребует своего решения [31]. В настоящее время подготовленный пробиотический рекомбинантный вакцинный кандидат, обеспечивший эффективную защиту против SARS-Cov-2, готовится для представления в Минздрав России целью получения разрешения на проведение клинических испытаний. Однако нашедшая экспериментальное подтверждение идея использования рекомбинантных пробиотических живых вакцин может столкнуться с рядом проблем при переходе к её практической реализации. Возможные сложности могут возникнуть при оценке иммуногенности на этапе доклинических и клинических испытаний. Живые пробиотические вакцины при пероральном введении доставляют экспрессированные на их поверхности вакцинные антигены на поверхность слизистой оболочки кишечника. Специфический адаптивный иммунный ответ, индуцированный на слизистых оболочках, включает выработку антител (преимущественно IgA, а также IgG), активацию Т-клеток и образование

иммунных клеток памяти [32]. Преимущественный IgA ответ и менее яркая системная специфическая реакция с умеренным уровнем специфических IgG в сыворотке крови не согласуется с общепринятой системой оценки иммуногенности вакцин при доклинической оценке и в процессе проведения клинических испытаний. Разработка и использование адекватных критериев оценки эффективности мукозальных пробиотических вакцин потребует понимания и учёта особенностей индукции специфического иммунного ответа при доставке антигена через слизистую оболочку.

Одной из ключевых проблем введения в практику живых рекомбинантных пробиотических вакцин является вопрос безопасности. Живые вакцины на основе генетически модифицированных организмов (ГМО) традиционно вызывают опасения. Потребуется всесторонняя оценка безопасности, чтобы гарантировать отсутствие риска для здоровья человека, включая потенциальные неблагоприятные эффекты, непреднамеренные последствия генетических модификаций или неконтролируемое размножение в организме хозяина.

Как следствие, процесс утверждения живых вакцин регулирующими органами может быть сложным, занимать много времени и потребовать особого рассмотрения и регулирования. При этом в период внедрения вакцины в практику критически важно сформировать адекватное общественное мнение путем предоставления обоснованной четкой информации о безопасности, преимуществах препарата, основанных на отсутствии необходимости в инъекциях и обеспечивать холодовую цепь.

При переходе к клиническим испытаниям и практическому использованию могут возникать проблемы стоимости производства. Расширение производства рекомбинантных пробиотических живых вакцин для удовлетворения потребностей крупномасштабных программ вакцинации требует междисциплинарного подхода, предполагающего сотрудничество между учёными, регулирующими органами, производителями и заинтересованными сторонами в области общественного здравоохранения. Тщательные научные исследования, надёжные оценки безопасности, чёткая нормативно-правовая база и эффективные коммуникационные стратегии являются ключом к успешному прохождению пути от создания до практического внедрения рекомбинантных пробиотических живых вакцин.

Исследования поддержаны научно-образовательным центром «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины». Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение №075-15-2022-302 (20.04.2022)

Литература/ References

- Johansson EL, Wassén L, Holmgren J, Jertborn M, Rudin A. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infect Immun*. 2001;69(12):7481–6. doi:10.1128/IAI.01403-13
- Ma Y, Luo Y, Huang X, Song F, Liu G. Construction of *Bifidobacterium infantis* as a live oral vaccine that expresses antigens. *Microbiology*. 2012;158:498–504. doi:10.1099/mic.0.049932-0.
- De Azevedo M, Karczewski J, Lefèvre F, et al. In vitro and in vivo characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of *L. monocytogenes* Internalin. *BMC Microbiol*. 2012; 12: 299. DOI: 10.1186/1471-2180-12-299
- Laiño J, Villena J, Zelaya H, Moyano R.O., Salva S., Alvarez S., Suvorov A. Nasal immunization with recombinant chimeric pneumococcal protein and cell wall from immunobiotic bacteria improve resistance of infant mice to streptococcus pneumoniae infection. *PLoS ONE*. 2018;13(11):e0206661. doi: 10.1371/journal.pone.0206661
- Грабовская К. Б., Леонтьева Г. Ф., Мерингова Л. Ф. и др. Протективные свойства некоторых поверхностных белков стрептококков группы В. *Журн. микробиол.*, 2007;5:44–50. /Grabovskaya K., Leontieva G., Meringova L., et al. Protective properties of some surface proteins of the streptococcus group B. *Journal of microbiology*. 2007;5:44–50 (in Russ.).
- Suvorov A, Dukhovlinov I, Leontieva G., et al. Chimeric protein PSPF, a potential vaccine for prevention Streptococcus pneumonia infection. *Journal of Vaccines and Vaccination*. 2015;6:6. doi 2157-7560/1000304
- Mojgani N., Shahali Y., Dadar M. Immune modulatory capacity of probiotic lactic acid bacteria and applications in vaccine development. *Benef Microbes*. 2020;11(3):213–226. doi: 10.3920/BM2019.0121.
- Tarasova E., Yermolenko E., Donets V, et al. The influence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. *Beneficial Microbs*. 2010; 1: 265–270. doi: 3920|BM2010.0008
- Karaseva A, Tsapieva A, Pachebat J, Suvorov A. Draft Genome Sequence of Probiotic *Enterococcus faecium* Strain L-3. *Genome Announc*. 2016; 28;4(1):e01622–15. doi: 10.1128/genomeA.01622-15. PMID: 26823581; PMCID: PMC4732334
- Davies JR, Svensäter G, Herzberg MC. Identification of novel LPXTG-linked surface proteins from *Streptococcus gordonii*. *Microbiology (Reading)*. 2009; 155(6):1977–1988. doi:10.1099/mic.0.027854-0
- Pinkston K.L., Singh K.V., Gao P, et al. Targeting pili in enterococcal pathogenesis. *Infect.Immun.*2014;82(4):1540–1547. doi:10.1128/IAI.01403-13
- Gupalova T., Leontieva G., Kramskaya T., et al. Development of experimental GBS vaccine for mucosal immunization. *PLoS One*. 2018;13(5):e0196564. doi: 10.1371/journal.pone.0196564
- Gupalova T., Leontieva G., Kramskaya T., et al. Development of experimental pneumococcal vaccine for mucosal immunization. *PLoS One*. 2019;28;14(6):e0218679. doi: 10.1371/journal.pone.0218679. PMID: 31251760; PMCID: PMC6599147.
- Desheva Y, Leontieva G., Kramskaya T., et al. Developing a Live Probiotic Vaccine Based on the *Enterococcus faecium* L3 Strain Expressing Influenza Neuraminidase. *Microorganisms*. 2021; 27;9(12):2446. doi: 10.3390/microorganisms9122446
- Desheva Y, Leontieva G., Kramskaya T., et al. Associated virus-bacterial vaccine based on seasonal LAIV and *S. pneumoniae* chimeric peptide provide protection against post-influenza pneumococcal infection in mouse model. *Virulence*. 2022;13(1):558–568. doi: 10.1080/21505594.2022.2049496
- Mezhenskaya D, Isakova-Sivak I, Gupalova T, et al. A Live Probiotic Vaccine Prototype Based on Conserved Influenza A Virus Antigens Protect Mice against Lethal Influenza Virus Infection. *Biomedicine*. 2021;21;9(11):1515. doi: 10.3390/biomedicine9111515
- Suvorov A, Gupalova T, Desheva Y, et al. Construction of the Enterococcal Strain Expressing Immunogenic Fragment of SARS-Cov-2 Virus. *Front Pharmacol*. 2022;5(12):807256. doi: 10.3389/fphar.2021.807256.

Об авторах

- Александр Николаевич Суворов** – д. м. н., чл.-корр. РАН, рук. отдела молекулярной микробиологии, ФГБНУ «ИЭМ». alexander_suvorov1@hotmail.com. ORCID 0000-0003-2312-5589.
- Татьяна Анатольевна Крамская** – к. б. н., ст. н. сотр., ФГБНУ «ИЭМ». Tatyana.kramskaya@gmail.com. ORCID 0000-0002-9408-6647.
- Татьяна Виталиевна Гупалова** – д. б. н., вед. н. сотр., ФГБНУ «ИЭМ». tvgupalova@rambler.ru.
- Юлия Андреевна Дешева** – д. м. н., вед. н. сотр., ФГБНУ «ИЭМ». desheva@mail.ru.
- Галина Федоровна Леонтьева** – к. б. н., вед. н. сотр., ФГБНУ «ИЭМ». galeonte@yandex.ru. ORCID 0000-0002-9876-6594.

Поступила: 20.04.2022. Принята к печати: 22.06.2023.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- Alexander N. Suvorov** – Dr. Sci. (Med.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Molecular Microbiology, Federal State Budgetary Scientific Institution «IEM». alexander_suvorov1@hotmail.com. ORCID 0000-0003-2312-5589.
- Tatyana A. Kramskaya** – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «IEM», Tatyana.kramskaya@gmail.com. ORCID 0000-0002-9408-6647.
- Tatyana V. Gupalova** – Dr. Sci. (Biol.), leading researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «IEM». tvgupalova@rambler.ru.
- Yulia A. Desheva** – Dr. Sci. (Med.), leading researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «IEM». desheva@mail.ru.
- Galina F. Leontieva** – Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «IEM». galeonte@yandex.ru. ORCID 0000-0002-9876-6594.

Received: 20.04.2022. Accepted: 22.06.2023.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.